



Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2, síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Departament de Medicina i Cirurgia

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2, síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

TESI DOCTORAL

Dirigida per la Dra. Montse Guardiola i el Dr. Josep Ribalta

Programa de doctorat en BIOMEDICINA

Reus, setembre de 2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
UNITAT DE RECERCA EN LÍPIDS I ARTERIOSCLEROSI

C/Sant Llorenç, 21
43201 – Reus – Tarragona
Tel. 977 759 367
Fax 977 759 322
montse.guardiola@urv.cat

FAIG CONSTAR que:

Aquest treball, titulat **Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2, síndrome metabòlica o diabetis tipus 3**, que presenta **Iris Oliva Rodríguez** per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d'aquesta universitat.

Reus, juny de 2017

Els directors de tesi doctoral,



Dra. Montse Guardiola Guionnet



Dr. Josep Ribalta Vives

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Aquesta tesi doctoral ha esta finançada per:

Ajuts destinats a universitats, centres de recerca i fundacions hospitalàries per a la contractació de personal novell investigador (FI-DGR 2017, FI_B2/00037) pel Departament d'Empresa i Coneixement i amb el suport del Fons Social Europeu.



Generalitat de Catalunya
Departament d'Empresa i Coneixement
Secretaria d'Universitats i Recerca



Unió Europea
Fons social europeu
L'FSE inverteix en el teu futur

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

“Res no és permanent, excepte el canvi” –H.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Agraïments

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Crec que el meu interès per la ciència va començar fa molts anys, quan de petita em van regalar un llibre sobre àtoms i vaig llegir que si engrandíssim un neutró a la mida d'una bala (*canica* per dir-ho malament), la totalitat de la mida de l'àtom seria com un camp de futbol. Després, va arribar aquell microscopi, que ara és *vintage*, que no era res més que tres lupes amb un motlle de plàstic amb forma de microscopi embolcallant-les, on hi mirava des de pedres fins a la pell de les cebes. Un cop vaig arribar a la secundària, però, vaig veure clarament que dins de la ciència, el que més m'agradava era la genètica i pel treball de recerca em vaig dedicar a muntar gàbies, creuar ratolins de tots colors i analitzar-los fenotípicament.

Al final, em vaig decantar per les ciències de la salut. Molta gent encara em pregunta com algú que va estudiar nutrició humana i dietètica, ha acabat fent una tesi doctoral sobre genètica i epigenètica de les dislipèmies. Sincerament, no tinc resposta, només sé que si alguna cosa realment t'agrada i et motiva, mai serà impossible. Clar està, que en aquest camí no he estat mai sola i no només he de, sinó també vull agrair tot el suport, la confiança i la paciència...

Als meus directors de tesi, Montse i Josep. Ha sigut una etapa de la vida molt curiosa (curiosa, per definir-ho d'alguna manera), ja que no només m'heu format com a investigadora sinó que també he après a conèixer-me més i a millorar la meua forma de treballar en equip. *Jefa*, moltes gràcies per *curtir-me*, inculcar-me aquesta autoexigència en tot el que faig i escoltar-me quan m'atacaven els nervi(t)s. Josep, gràcies per ensenyar-me a donar-hi dos toms a totes les idees i no aixecar el cul de la cadira *escopetejadament*. I, sobretot, gràcies a tots dos: per fer-me PENSAR. (#EquipCapesRocks!).

A la URLA, gràcies a tots per l'ajuda i l'aprenentatge que m'heu transmès des de diferents vessants sobre les dislipèmies i les malalties cardiovasculars. També agrair tots els moments de riures que hem passat, en especial a les *Russian Red* (no per ordre); Sara, m'agraden totes les teves notetes pel lab i els esmorzars; Alba, m'agrada com agafes el boli i poses els morros quan trobes una *contradicción*; Sandra, m'agrada que t'agradi que t'abracin i *Jefa*, m'agrada la teua gran capacitat de comunicació no-verbal que tens.

A ma mare, mon pare i la Ramona. Perquè hi ha coses que s'han de portar de casa. Per l'aprenentatge de tot allò que no s'acostuma a llegir als llibres,

per la paciència en els meus moments radicals, pels ànims, per les xerrades filosofals, per fer-me esforçar a arribar un pas més enllà, per fer-me parar a reflexionar i per donar-me sempre l'oportunitat d'intentar qualsevol cosa, ara i des de sempre... moltes gràcies.

A tu, teta, per fer-me suport encara que no sabessis com fer-ho, per fer-me riure infinitament, per empiar-me per fer-me reaccionar i per ser-hi sempre! Ja saps, del 0 al 10.. deu mil milions! (o tres!)

Als amics, els que érem i els que som! Gràcies per no entendre mai res del que us explicava, però intentar-ho posant-hi ganes ni que fossin els primers cinc minuts. Gràcies pels vermuts al bar(t) amb moltes olives, per les excursions *muntanyils/ferrades/escalades*, pels bronzejats i paelletes a la platja, pels dies que se'n van de les mans i saps com comences però no com acabes, pels festivals, concerts i festes majors arreu, per les escapades exprés, per les tardes de jocs (molts jocs), per les tardes de diumenge que celebres haver-te fet gran... que m'han servit per desconnectar els dies de curtcircuit i *neuronas-fritas*.

Diuen que una imatge val per mil paraules, així que a l'inici de la tesi vaig decidir escriure paraules a l'atzar però que em recordessin moments viscuts al llarg d'aquesta etapa (i potser una mica abans i tot!). Així que desitjo que trobeu la vostra/es.

A tots/es, merci!

Holita. Ulee. Guingueta, venenu i orus. Pregunta!. Despacito, despacito, despacito... pum!. Jefa. Unità de l'hípids i azteriosclerosi. Què estudies? realment vols que t'ho expliqui?. Això és de ser una xoxa!. Mudito. No em toquis el voraviu. Pastelitos. ISO. Clarooo!. Porta'm una postal! (però amb *sellu* que té més valor). De forma modesta però significativa. Aigua de Veri. On vas? doncs no tornis!. Polo dracula. Vaig a fer de *kelly*. Fantástico. Tres rallitas. No se'm normalitza. Qué?!. T'estic curtint. CURIE. Girafes. La cova. Saguuuu?. Pastís de tres xocolates. Mojipool. Lo voy a apuntar en mi lista de cosas que me importan una p*** mierda!. Igor. A veeer. Puc engegar l'aire?. Sort a la vida. Pedra de l'alegria. Bu. Ras-Ras. Qui m'ha robat la pipeta?. No ni na'!. -Si?!, -Montse?, -no. Pato. Via ferrada. Pa!. Mercedes como has dormido?. Rucu-rucu tesil. És més. Imagine. Això és paper en brut?. Divendres a les 18:00h. Infusionat amb llimona. Guapito. Barcelona. Madrid. Gothebörg. Amsterdam. Cadis. Ambrosio m'està atacant. Però, estudies o treballes?. Patata i bejoca. Illuminatti. Yo-Yo. Vinc a fer teràpia. Muere tomate, muere!. Saps d'on ve la frase "donar carabasses"?. El teu fill sembla que porta perruca. Llegeixo. Pet shop boys - Sonar 2013. Acuagyn. Ver, oïr y callar. Albada. Piraguada 2014. Merda!, bon dia a tu també!. Arròs amb bou. Pitonisa Lola. Cri-cri, cri-cri. Com estas oliveta?. Txe-txe-ta. Lolita. Ha saltat la 49! siiiii, ja ho sabem. Retromonger. Xoxito (altramuz) pa' ti. Per què et diuen Jimmy?. Aaahh si si si... . R57, tóxico para las abejas. Ras, gots fora i amunt. Clic. Capucchino. Maco perquè si. Donde no hay mata, no hay patata. Pos eso. Ooomm!. Brandy huevo Totote. Pantxeta sexy. Sí, vull!. Animalot de sèquia. 5+. S'ha de ser net i polit. Ovella-vaca. Atac del pollo. Anem a tirar fitxes!. La liris. Foc. Això no és un risoto, és arròs bullit. Dot. Moment kinder-bueno. Raval Robuster, 21. Boníssim. Eeeso si, otra cosa no, pero eso, eso si le gusta a mi niña cosita loca. McBite. Oiga. Brownie pa' ti. Appuuff...quina fenyada. Vaig a posar puntes, m'acompanyes?. Uolo, uolo, uolo!. Me'n vaig a plantar patates. Pometa. Que feito. Més enllà dels gens. Inguminyóis!. Et diré una cosa. Ajá!. Simpàtica selectiva. Pobre gatet. Helado de pepino. Esmorzars Zasca. #hastagsfinlamort. Pel de panotxa. Vols una xuxe?. Cómete el bambú, cómete el bambú. Mosasa. Multa a 91'7km. Hi ha coses urgents, i coses importants. ASAP. Tens un xiclet?. 6a. Amooooo(fa). Que calli!. Bueno, bueno, bueno, així que Montse i Meritxell!. Perdóneseme, era mi primerito dia. Black 8 ball pool. Me puedes explicar esta contradicción?. Cap d'ou. Cabra. Vaig a italia; a Itàlia? No, a italià!. Dos punts. Control+Alt+Supr. Pizpireta. Et queda una mica iou-iou. Cafessos a 40 cèntims. Capicua real. Apamplada. Vomito purpurina. Rabbit killer fest I/II/III. Aparcao'. Russian red. Ets molt lenta. Idees coetils. Con dios. Fins demà!. (o nooo!).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Índex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

ÍNDEX

Resum	1
Justificació	7
Introducció	11
1. Lípids i malalties cardiovasculars	13
1.1 Lípids, determinants genètics i MCV	15
1.2 Lípids, determinants epigenètics i MCV	16
2. Metabolisme lipídic	19
2.1 Lipoproteïnes	19
2.2 Metabolisme exogen	21
2.3 Metabolisme endogen	24
2.3.1 Desenvolupament de l'arteriosclerosi	27
2.4 Transport revers de colesterol	28
3. Dislipèmia aterògena	31
3.1 VLDL ₁	32
3.1.1 Augment de la producció de VLDL ₁	32
3.1.2 Disminució del catabolisme de les VLDL ₁	33
3.1.3 Canvis fisicoquímics de les VLDL ₁	34
3.2 LDL petita i densa	34
3.3 HDL petita i disfuncional	35
3.4 Lipoproteïnes romanents	36
3.5 Hiperlipèmia postprandial	36
4. Genètica de la dislipèmia aterògena	39
4.1 <i>APOA5</i>	41
4.1.1 ApoA-V: descobriment i mecanisme d'acció	42
4.1.2 <i>APOA5</i> : variabilitat genètica	45
4.1.3 <i>APOA5</i> : regulació de l'expressió	46
4.2 <i>PCSK9</i>	47
4.2.1 <i>PCSK9</i> : descobriment i mecanisme d'acció	47
4.2.2 <i>PCSK9</i> : variabilitat genètica	50
4.2.3 <i>PCSK9</i> : regulació de l'expressió	50

5. Epigenètica de la dislipèmia aterògena	53
5.1 Metilació del DNA i altres modificacions epigenètiques	53
5.2 Regulació epigenètica de gens implicats en el metabolisme lipídic	55
5.2.1 Regulació epigenètica d'APOA5	56
5.2.2 Regulació epigenètica de PCSK9	57
Hipòtesi i objectius	59
Resultats i articles	65
1. Resum de resultats	67
2. Articles	71
2.1. <i>Tissue-specific DNA methylation profiles regulate liver-specific expression of the APOA1/C3/A4/A5 cluster and can be manipulated with demethylating agents on intestinal cells.</i> Atherosclerosis (2014). Guardiola M, <u>Oliva I</u> , et al.	71
2.2. <i>APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate circulating triacylglycerol levels.</i> Clinical Science (2016). <u>Oliva I</u> , Guardiola M, et al.	83
2.3. <i>Two PCSK9 variants associated with lower concentrations of Tg-rich lipoproteins and methylation in the promoter modulate atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes and the metabolic syndrome.</i> Submitted (2017). <u>Oliva I</u> , Guardiola M, et al.	95
2.4. <i>Polymorphisms predisposing to Alzheimer's disease also influence lipoprotein profile in patients with metabolic disturbances.</i> Submitted (2017). <u>Oliva I</u> , Guardiola M, et al.	121
Discussió	152
Conclusions	163
Referències	167
Llistat abreviatures	205

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Resum

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Aproximadament, un 40% dels pacients amb nivells de colesterol LDL normals, presenten un alt risc de malaltia cardiovascular. Aquest és el cas dels pacients amb alteracions metabòliques com la diabetis tipus 2, l'obesitat o la síndrome metabòlica, els quals es caracteritzen per presentar un perfil lipoproteic alterat, que es coneix amb el nom de *dislipèmia aterògena*.

La dislipèmia aterògena es caracteritza per un augment de les lipoproteïnes VLDL (en concret, de la seva subfracció més gran), un augment de les LDL petites i denses (les quals són més oxidables), una disminució de les HDL (malgrat que, en proporció, hi ha un augment de les HDL petites) i un augment de les lipoproteïnes romanents.

Les dislipèmies són un dels principals factors de risc de desenvolupar malalties cardiovasculars i estan influenciades per factors modificables (com la dieta, l'obesitat, el tabac) i no modificables com l'edat, el gènere o la predisposició genètica. En relació amb els factors genètics, els estudis d'associació del genoma complet han determinat que les variants genètiques són capaces d'explicar només entre el 25-30% de la predisposició genètica individual total de les alteracions lipídiques, cosa que deixa entreveure que hi ha altres factors genètics, encara no estudiats, que poden modular el perfil lipídic, per exemple, les modificacions epigenètiques o gens encara no relacionats amb el metabolisme lipídic.

Per tant, la nostra hipòtesi és que:

Els factors genètics i epigenètics, sols o combinats, ens poden ajudar a entendre els mecanismes que regulen la predisposició genètica a la dislipèmia relacionada amb malalties complexes com la diabetis tipus 2, la síndrome metabòlica o, inclús, la diabetis tipus 3, característica de l'Alzheimer.

Els objectius proposats per acceptar o refusar aquesta hipòtesi són:

1. Determinar el patró metilació del clúster APOA1/C3/A4/A5 en diferents teixits i comprovar el seu efecte sobre l'expressió del clúster en cèl·lules intestinals.

2. Determinar si l'efecte de la variabilitat genètica i els patrons de metilació de gens candidats sobre els lípids i el perfil lipoproteic actuen de forma conjunta o no, en pacients amb diabetis tipus 2 o síndrome metabòlica:

2.1 Estudi del gen *APOA5*: determinar l'efecte de les variants -1137T>C, S19W i 724C>G i tres regions de metilació del gen.

2.2 Estudi del gen *PCSK9*: determinar l'efecte de la variabilitat genètica total i de dues regions de metilació de gen.

3. Determinar si les variants que predisposen a malalties de deteriorament cognitiu, les quals cursen amb l'anomenada diabetis tipus 3, influeixen també sobre el perfil lipídic i lipoproteic en pacients amb diabetis tipus 2 o síndrome metabòlica.

Metodològicament, les tècniques emprades per a la realització dels objectius es troben detallades a la secció de mètodes dels articles publicats, inclosos en aquesta tesi. De manera resumida, es basen en extracció de DNA, anàlisis bioquímiques dels nivells lipídics plasmàtics tradicionals, determinació dels nivells de romanents plasmàtics, determinació del perfil lipoproteic per ressonància magnètica nuclear, mesura del gruix de la capa íntima-mèdia de l'artèria caròtida a través de radiofreqüència, genotipatge pel mètode RFLP i taqMan i determinació del grau de metilació de regions del DNA per conversió amb bisulfit i piroseqüenciació.

Finalment, les conclusions més rellevants d'aquesta tesi són:

- Els patrons de metilació del clúster *APOA1/C3/A4/A5* específics de teixit podrien estar directament relacionats amb la regulació de l'expressió d'aquest clúster. Per altra banda, la desmetilació del DNA en cèl·lules intestinals augmenta especialment els nivells de RNA dels gens *APOA1*, *APOA4* i *APOA5*.

- El grau de metilació de la ICG localitzada en l'exó 3 d'*APOA5* actua en combinació amb les variants S19W, -1131T>C i 724C>G del gen en la predisposició individual de presentar nivells alts de TG plasmàtics. Aquest és un exemple del fet que l'anàlisi combinada de les variants i la metilació podrien incrementar la capacitat predictiva dels gens sobre la predisposició a alts nivells de TG.

- La hipometilació de la CpG4 de la regió estudiada del promotor de *PCSK9* s'associa a una disminució de les partícules LDL totals i petites, mentre que les variants rs540796 i rs483462 protegeixen contra TG elevats, que és la principal característica lipídica dels pacients amb DT2, obesitat o síndrome metabòlica.
- El rs3025786 (gen *PSEN1*), el rs27023435 (gen *PVRL2*) i el rs1789072 (gen *DSC1*), variants que predisposen a l'Alzheimer, podrien modular també el perfil lipoproteic característic en pacients amb alt risc cardiovascular. Aquests resultats contribueixen a identificar variants en nous gens no associats a dislipèmies com a moduladors d'un perfil lipoproteic proaterogen.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Justificació

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi (URLA), del Departament de Medicina i Cirurgia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili, sota la direcció de la Dra. Montse Guardiola i el Dr. Josep Ribalta.

A causa del seu gran impacte sobre la salut pública, durant els 32 anys d'activitat, el principal interès de la URLA s'ha basat en l'estudi del metabolisme lipídic, mecanismes implicats en el desenvolupament de l'arteriosclerosi, les malalties cardiovasculars que en deriven i els seus factors de risc. De manera més precisa, el grup de recerca en genètica i epigenètica té com a objectiu l'estudi de la predisposició genètica individual a dislipèmies resultant de polimorfismes o de canvis en l'expressió gènica, induïts tant per factors externs (com la dieta, els fàrmacs o els metabòlits) com per factors interns (canvis en el patró de metilació del DNA i modificacions a les histones).

S'ha descrit àmpliament que el colesterol LDL és un factor de risc independent per desenvolupar malalties cardiovasculars i, en aquest sentit, els estudis farmacològics han demostrat que la seva disminució comporta el descens d'esdeveniments cardiovasculars i de mort. Malgrat aquestes dades, aproximadament, un 40% dels pacients amb nivells de colesterol LDL normals, presenten un alt risc de malaltia cardiovascular. Aquest és el cas dels pacients amb alteracions metabòliques (com la diabetis tipus 2, l'obesitat o la síndrome metabòlica), els quals es caracteritzen per presentar un perfil lipoproteic alterat que es coneix amb el nom de *dislipèmia aterògena*.

A grans trets, la dislipèmia aterògena presenta nivells de triglicèrids alts, nivells de colesterol LDL normals o lleugerament elevats, i nivells de colesterol HDL baixos. Inicialment i a causa de la normalitat dels nivells de colesterol LDL, semblaria que no és un perfil perjudicial; malgrat això, l'augment de triglicèrids desencadena una sèrie de canvis quantitius, qualitius i cinètics sobre el perfil lipoproteic que converteix les lipoproteïnes en partícules més proaterogèniques. Específicament, la dislipèmia aterògena es caracteritza per un augment de les lipoproteïnes VLDL i, en concret, de la seva subfracció més gran, un increment de les LDL petites i denses (les quals són més oxidables), una disminució de les HDL (malgrat que, en proporció, hi ha un augment de les HDL petites) i un augment en la concentració de lipoproteïnes romanents.

La dislipèmia aterògena, com a tipus de dislipèmia, està influenciada per factors modificables (la dieta, l'activitat física, l'hàbit tabàquic ...) i per factors no modificables com l'edat, el sexe i la genètica. En relació amb els factors genètics, els estudis d'associació del genoma complet han determinat que les variants genètiques són capaces d'explicar una petita part (al voltant d'un 10%) de la predisposició individual total de les alteracions lipídiques. Per altra banda, es calcula que les variants identificades només representen entre el 25-30% del total de la predisposició genètica, cosa que deixa entreveure que hi ha altres factors genètics, encara no estudiats, que poden modular el perfil lipídic, per exemple, les modificacions epigenètiques.

Pels motius exposats, doncs, aquesta tesi s'ha basat a determinar si els factors genètics i epigenètics, sols o combinats, ens poden ajudar a entendre els mecanismes que regulen la predisposició genètica a la dislipèmia relacionada amb malalties complexes com la diabetis tipus 2, la síndrome metabòlica o, inclús, la diabetis tipus 3, característica de l'Alzheimer.

Aquesta tesi es divideix en diferents seccions. La introducció conté l'explicació dels temes necessaris per posar en perspectiva i seguir el treball realitzat. La major part de la introducció es focalitza en el vessant genètic i epigenètic dels gens *APOA5* (com a principal modulador dels nivells de triglicèrids) i *PCSK9* (com a principal modulador dels nivells de colesterol), i la seva implicació en el desenvolupament de la dislipèmia aterògena. Posteriorment, la hipòtesi i els objectius justifiquen els diferents estudis experimentals realitzats. L'apartat de resultats es compon de quatre articles: dos publicats i dos en revisió. Aquesta darrera secció és seguida per la discussió general dels resultats obtinguts i les conclusions finals. La secció de referències conté les referències citades en les seccions anteriors. No hi ha secció de metodologia, ja que les tècniques utilitzades estan detallades en els articles publicats, inclosos en aquesta tesi.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

1. Lípids i malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars (MCV) són la principal causa de mortalitat al món. Es calcula que 17.5 milions de persones van morir per MCV l'any 2015, la qual cosa representa un 31% de la mortalitat mundial [1].

Com a malaltia complexa, la predisposició a desenvolupar MCV depèn de diversos factors, els quals es poden dividir entre factors no modificables i modificables. L'edat, la raça, la història familiar i el sexe componen el bloc de factors no modificables, mentre que la diabetis tipus 2 (DT2), la dieta, l'obesitat, l'activitat física, l'hàbit tabàquic, la dislipèmia i la pressió arterial són els principals factors modificables.

En aquest sentit, Gehani *et al.* van demostrar per mitjà de l'estudi INTERHEART que, en conjunt, l'hàbit tabàquic, la ingesta de fruites i vegetals, l'exercici, l'alcohol, els factors psicosocials, la hipertensió, la DT2, la relació cintura-maluc i la ràtio apolipoproteïna B / apolipoproteïna A-I expliquen el 97% del risc d'incidència d'infart de miocardi atribuïble als factors modificables [2].

La dislipèmia és causada per l'augment o la disminució patològica dels nivells plasmàtics de lípids. Durant les últimes dècades, s'ha demostrat àmpliament que l'augment de colesterol promou l'acumulació lipídica a l'espai subendotelial, fet que inicia processos arterioscleròtics que finalitzaran en la formació de la placa ateromatosa i la consegüent obstrucció de l'artèria. No ha sigut fins als darrers anys que s'ha evidenciat que l'increment de triglicèrids també juga un paper clau en la promoció de processos proarterioscleròtics.

L'augment del colesterol transportat a les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) s'associa directament a la incidència de malaltia coronària; és més, s'ha descrit que, per cada increment d'1 mmol/L de colesterol LDL (cLDL), hi ha un increment de l'1.57 de risc de patir la malaltia [3]. Aquesta relació és reforçada per estudis que demostren que els tractaments amb estatines i altres fàrmacs hipocolesterolèmics redueixen tant els nivells de cLDL com la incidència d'esdeveniments cardiovasculars [4,5]. Per altra banda, el colesterol present a les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) presenta una forta relació inversa amb el risc de malaltia coronària [6]. Tot i aquesta

relació, encara no s'ha pogut determinar una relació causal entre nivells baixos de colesterol HDL (cHDL) i el desenvolupament de malaltia coronària [7,8].

La relació causal entre els nivells plasmàtics de triglicèrids (TG) i les MCV ha estat controvertida, ja que les lipoproteïnes amb un alt contingut en triglicèrids (TRL) són massa grans per infiltrar-se a la capa íntima arterial i promoure el desenvolupament de l'arteriosclerosi. La recerca en aquest àmbit dels últims 20 anys ha demostrat que altes concentracions de TG, superiors als 1.7mmol/L, estan directament associades a un augment del risc de malaltia coronària i d'accident vascular isquèmic [6,9], cosa que identifica el nivell de TG com a factor de risc de desenvolupar MCV. Malgrat això, és difícil diferenciar el risc induït directament per l'augment de TG de l'induït per la seva principal conseqüència: la dislipèmia aterògena (DA). La DA es caracteritza per nivells alts de TG, augment de LDL petites i denses, nivells baixos de cHDL, l'increment de partícules romanents (RLP) i hiperlipèmia postprandial, i és característica de pacients amb hipertriglicèridèmia (HTG).

A despit de les evidències en la relació entre la concentració de lípids plasmàtics i la MCV, s'ha descrit que un 40% dels pacients que han patit infart de miocardi presenten nivells lipídics normals [10], cosa que suggereix que hi ha altres característiques associades als lípids que els confereixen un risc residual, per exemple, la concentració del nombre de lipoproteïnes circulants, la qual es pot determinar per dos mètodes: per la determinació dels nivells d'apolipoproteïna B (apoB) circulant o mitjançant la determinació del perfil lipoproteic per ressonància magnètica nuclear (RMN). A causa de la seva mida, les partícules aterògenes (les lipoproteïnes de molt baixa densitat o VLDL, les lipoproteïnes de densitat intermèdia o IDL, les LDL i les RLP) contenen només una molècula d'apoB per lipoproteïna. Això implica que la concentració d'apoB podria indicar el nombre de partícules aterògenes circulants. Tot i que, actualment, encara hi ha controvèrsia, alguns estudis mostren que els nivells d'apoB són millors marcadors del risc cardiovascular que els nivells de cLDL i el colesterol no-HDL [11]. L'apoB, doncs, ha servit durant molts anys com a marcador del nombre de partícules, però, gràcies a noves tecnologies, avui dia és possible quantificar tant el nombre de partícules del perfil

lipoproteic com la seva mida a través de la RMN. Diversos estudis en pacients amb DT2 ja han determinat que el risc cardiovascular associat a alteracions del perfil lipoproteic és comparable al risc derivat de la concentració lipídica plasmàtica. A més a més, també s'ha evidenciat que tant el nombre de lipoproteïnes com la seva mida s'associen a la incidència de DT2 en dones, independentment d'altres factors de risc [12,13].

Aquesta hipòtesi, basada en el fet que, a més nombre de lipoproteïnes, més risc cardiovascular, és lògica tenint en compte que, a major nombre de partícules transportadores de colesterol, major risc d'arteriosclerosi, tot i que s'ha demostrat que l'aterogenitat d'aquestes partícules depèn també de la seva mida. En aquest sentit, ja s'ha descrit un increment de les LDL petites en pacients amb un alt risc arterioscleròtic [14]. Les partícules LDL més petites són més aterogèniques, ja que són més propenses a l'oxidació, l'agregació i tenen una major afinitat pels proteoglicans de la superfície endotelial, cosa que n'afavoreix la infiltració a l'espai subendotelial.

Tanmateix, no es pot obviar el fet que els lípids estan fortament determinats per factors genètics i aquests, alhora, estan altament influenciats per factors ambientals que en poden regular l'expressió.

1.1 Lípids, determinants genètics i MCV

Es calcula que, aproximadament, la meitat de la variabilitat intraindividual dels nivells lipídics es deuen a factors genètics [15]. Per tal de desxifrar l'efecte de les variants genètiques o SNP (de l'anglès, *single nucleotide polymorphism*) sobre el perfil lipídic, s'han dut a terme estudis utilitzant diferents estratègies.

Els estudis tradicionals de lligament en famílies han identificat gens amb un gran efecte sobre els lípids. Aquests gens presenten variants rares (amb una freqüència de l'al·lel minoritari <1% a la població), que, usualment, s'associen a una pèrdua de funció de la proteïna codificada (variants *loss-of-function* o LOF) i, en alguns casos, a guanys en la funcionalitat proteica (variants *gain-of-function* o GOF). Aquests canvis de funcionalitat poden alterar dràsticament el perfil lipídic i propiciar, així, el desenvolupament de MCV. Aquestes variants s'associen, usualment, a dislipèmies amb una base

genètica mendeliana, monogènica amb poca modulació ambiental i amb una prevalença baixa en la població general.

Contràriament, la majoria de dislipèmies són molt prevalents, amb una complexa contribució genètica i ambiental. Així, doncs, en les últimes dècades, els estudis d'associació basats en gens candidats o en el genoma complet (GWAS) han possibilitat la identificació de variants comunes, que, de forma conjunta, modulen el perfil lipídic. Fins avui, els GWAS han identificat 157 *loci*, que, expliquen un total del 12.4% de la variabilitat intraindividual del colesterol total (CT), un 12.2% del cLDL, un 12.1% del cHDL i un 9.6% dels TG, la qual cosa representa entre el 25-30% de l'heretabilitat genètica total lipídica [16,17]. Paral·lelament, en els últims anys i gràcies al desenvolupament tecnològic, s'han dut a terme estudis d'associació de variants rares o de baixa freqüència sobre els lípids en grans grups poblacionals, els quals han permès identificar nous gens implicats en el metabolisme lipídic [18].

Malgrat això, els estudis d'associació (degut al seu disseny) no poden determinar-ne la causalitat. Només amb els estudis de randomització mendeliana s'han pogut establir les relacions causals entre variants, nivells lipídics i MCV [19]. Aquest tipus d'estudis han establert que l'acumulació de l'efecte de variants que augmenten el cLDL implica un augment del 113% del risc d'infart de miocardi i un augment del 54% del risc en el cas de variants que incrementen els nivells de TG [20]. No s'ha trobat, fins a la data, causalitat entre variants genètiques, nivells de cHDL i MCV.

1.2 Lípids, determinants epigenètics i MCV

Com es descriu a l'apartat anterior, les variants genètiques identificades fins ara expliquen entre el 25-30% de l'heretabilitat total dels nivells lipídics. El 75% restant correspon a l'anomenada *missing heritability* (és a dir, a factors que predisposen genèticament cada individu encara per identificar). Aquesta podria ser explicada per variants rares encara no identificades, alteracions estructurals als gens, epístasi (interaccions gen-gen) i/o l'epigenètica [21].

L'epigenètica juga un paper essencial en la regulació del genoma. Els tres principals mecanismes epigenètics són la metilació del DNA, les modificacions a les histones i el control posttranscripcional pels microRNA (miRNA). Aquestes característiques regulen l'accessibilitat dels factors de transcripció al DNA o la viabilitat dels RNA missatgers (mRNA) i, per tant, controlen l'expressió gènica. A diferència de la genètica, les modificacions epigenètiques són dinàmiques, específiques de cèl·lula i teixit, variables al llarg del temps i influenciades per estímuls extrínsecs (d'origen ambiental com el tabac, la dieta o l'exercici) i intrínsecs (condicions fisiopatològiques com les condicions uterines, l'obesitat o la DT2) [22–24].

En els últims anys, diversos estudis han demostrat patrons aberrants en la metilació del DNA associats a malalties com el càncer [25,26], l'obesitat [27], la DT2 [28] i l'arteriosclerosi [29]. A més a més, els estudis de gens candidats també han determinat que alts nivells de metilació en diversos gens involucrats en el metabolisme lipídic, com l'*ABCG1*, *PLTP*, *LIPC*, *CETP* i *LPL* (*apartat 5*), es relacionen amb canvis en els nivells plasmàtics lipídics [30,31].

Per altra banda, els estudis d'associació de l'epigenoma complet (EWAS) han identificat associacions entre la metilació del DNA a diverses regions genòmiques i canvis en els nivells de CT, cLDL, cHDL, TG i metabòlits lipídics [32,33], els quals poden influenciar en el desenvolupament de MCV. Recentment, a més, també s'ha demostrat en cèl·lules del sistema immunològic que l'exposició d'aquestes cèl·lules a lipoproteïnes modificades induïx canvis epigenètics que propicien el desencadenament de mecanismes inflamatoris, la qual cosa representa les primeres etapes del desenvolupament de processos arterioscleròtics [34].

Tenint en compte dades actuals, una de les majors limitacions en aquest àmbit és la determinació de la causalitat. Avui dia no hi ha estudis que demostrin si són els canvis en els nivells lipídics plasmàtics els que modifiquen els nivells de metilació del DNA (cosa que podria influenciar l'expressió de gens clau relacionats amb les MCV) o al contrari, si els canvis en els nivells de metilació són els que modulen els nivells lipídics plasmàtics.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

2. Metabolisme lipídic

2.1 Lipoproteïnes

Degut al seu caràcter hidròfob, els lípids són transportats pel plasma en forma de lipoproteïnes, les quals són macromolècules amfipàtiques, estables i

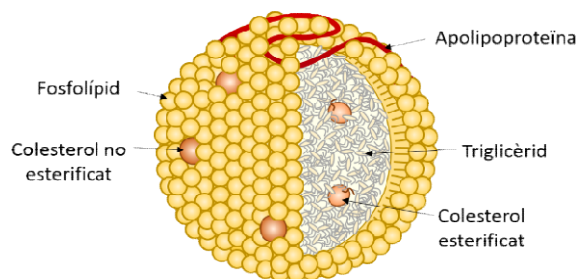


Figura 1. Esquema de l'estructura d'una lipoproteïna .

compostes per un nucli apolar (format per TG i colesterol esterificat), el qual està embolcallat per una capa composta per fosfolípids i colesterol no esterificat (ambdós lípids amfipàtics), tal com es mostra a la *figura 1*.

Les lipoproteïnes es poden classificar en funció de la seva densitat (la qual està determinada per la composició de lípids i proteïnes) en un ventall que engloba des dels quilomicrons (Qm) fins a les VLDL, IDL, LDL i HDL (*taula 1*).

Taula 1. Característiques de les lipoproteïnes

	Qm	VLDL	IDL	LDL	HDL
Diàmetre (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Densitat (g/ml)	<0.93	0.93-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.21
Proteïna (%)	2	10	11	23	55
Fosfolípids (%)	9	18	25	20	24
Colesterol NE (%)	1	7	10	8	2
Colesterol E (%)	3	12	32	37	15
Triglicèrids (%)	85	50	25	10	4
Apo A-I	X				X
Apo A-II	X				X
Apo A-IV	X				X
Apo A-V	X	X			X
Apo B48	X				
Apo B100		X	X	X	
Apo C-I	X	X	X		X
Apo C-II	X	X	X		X
Apo C-III	X	X	X		X
Apo E	X	X	X		X

NE: no esterificat. E: esterificat.

Les quatre principals funcions de les lipoproteïnes són el transport exogen de TG, el transport endogen de TG, el transport de colesterol i l'eliminació de l'excés de colesterol. Aquestes funcions poden ser atribuïbles a les diferents fraccions lipoproteïques:

- Qm: se sintetitzen a les cèl·lules intestinals i són responsables del transport dels greixos provinents de la dieta (principalment, TG) a la circulació, el fetge i altres teixits, per tant, participen en el transport exogen de TG. El 85% del seu contingut són TG (*taula 1*).

- VLDL: se sintetitzen als hepatòcits i els TG són el seu component majoritari (aproximadament, el 50%, descrit a la *taula 1*). Són responsables del transport endogen de TG des del fetge fins a la circulació i altres teixits perifèrics.

- IDL: és la partícula resultant de la hidròlisi de les VLDL per enzims lipolítics durant el seu transport en circulació. Principalment, és una partícula de traspàs entre les VLDL i les LDL.

- LDL: són partícules d'origen plasmàtic, però també poden ser sintetitzades al fetge. És el principal mètode de transport del colesterol i els seus components s'utilitzen per a la síntesi d'hormones sexuals. La seva vida mitjana és de 2-3 dies; posteriorment, s'elimina al fetge.

- HDL: són partícules formades per la lipidació de l'apolipoproteïna A-I (apoA-I, sintetitzada principalment al fetge) amb l'excés de colesterol dels teixits perifèrics. Transporten el colesterol dels teixits perifèrics al fetge per eliminar-lo.

Les apolipoproteïnes (apos) formen el component proteic de les lipoproteïnes. Són molècules implicades en la formació de les lipoproteïnes, l'estabilització de l'estructura i actuen com a coactivadores enzimàtiques o com a lligands dels receptors lipoproteïcs. Les principals apos estan resumides a la *taula 1*.

2.2 Metabolisme exogen

Els TG són els principals greixos provinents de la dieta, juntament amb petites quantitats de colesterol, èsters de colesterol i fosfolípids.

La digestió dels greixos es produeix a l'intestí prim gràcies a les sals biliars, les quals augmenten la superfície de les partícules lipídiques per afavorir-ne la hidròlisi pels enzims lipolítics. Les sals biliars se sintetitzen al fetge i se secreten al duodè a través de l'ampolla de Vàter. Els monoacilglicèrids, els àcids grassos lliures (AG), el colesterol i els lipofosfoglicèrids resultants de la lipòlisi durant la digestió dels greixos són absorbits pels microvil·lis dels enteròcits, ja sigui per difusió passiva o per transportadors específics, com el clúster de diferenciació 36 (CD36) i la proteïna Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1). Dins la cèl·lula, són reesterificats de nou al reticle endoplasmàtic (RE) on formen TG, fosfolípids i colesterol.

El gen *APOB* codifica per l'apoB, proteïna clau en el procés de la síntesi de les TRL. L'apoB existeix com a apoB100 i apoB48. L'apoB48 és resultat d'un procés de *splicing* alternatiu al gen que converteix una glutamina en un codó stop al 48% de la part N-terminal de l'apoB100. En humans, l'apoB100 es troba a les lipoproteïnes de síntesi hepàtica (VLDL i els seus romanents), mentre que l'apoB48 es troba a les lipoproteïnes d'origen intestinal (Qm i els seus romanents), malgrat que alguns estudis han descrit la presència d'apoB100 també a l'intestí [35]. Com hem esmentat abans, només hi ha una apoB per lipoproteïna, per la qual cosa la mesura plasmàtica d'apoB reflecteix el nombre de lipoproteïnes transportadores d'apoB (Qm, VLDL, IDL i LDL) circulants. La proteïna microsomal transferidora de triglicèrids (MTTP) s'uneix al domini $\alpha\beta_1$ de la part N-terminal de l'apoB per la formació de les lipoproteïnes.

La formació dels Qm s'inicia amb la lipidació de l'apoB traduïda als ribosomes del RE a través de MTTP (*figura 2*). Aquesta lipidació pot ocórrer per dues vies diferents: *a*) la MTTP no associada als adiposomes s'uneix a l'apoB naixent. Subseqüentment, el complex MTTP-ApoB pot extreure molècules lipídiques de la membrana del RE i transferir-les a l'apoB naixent. Durant les repeticions d'aquest procés, es forma una gota lipídica que és utilitzada per MTTPs per la lipidació d'apoB fins a la formació de la lipoproteïna primordial; *b*) la MTTP associada als adiposomes s'uneix a

l'apoB, li aporta un nucli lipídic i fa que aquesta s'hi embolcalli formant les lipoproteïnes primordials. Un cop formades, les lipoproteïnes primordials expandeixen el seu nucli lipídic per la fusió amb adiposomes per una via també regulada per la MTP i donen pas a les lipoproteïnes naixents [36]. Un cop formades, les lipoproteïnes naixents són transportades a l'aparell de Golgi, on se'ls uniran fosfolípids i les apos del tipus A. El resultat és un Qm naixent, que s'alliberarà al sistema limfàtic i, posteriorment, a la circulació general a través del conducte toràctic.

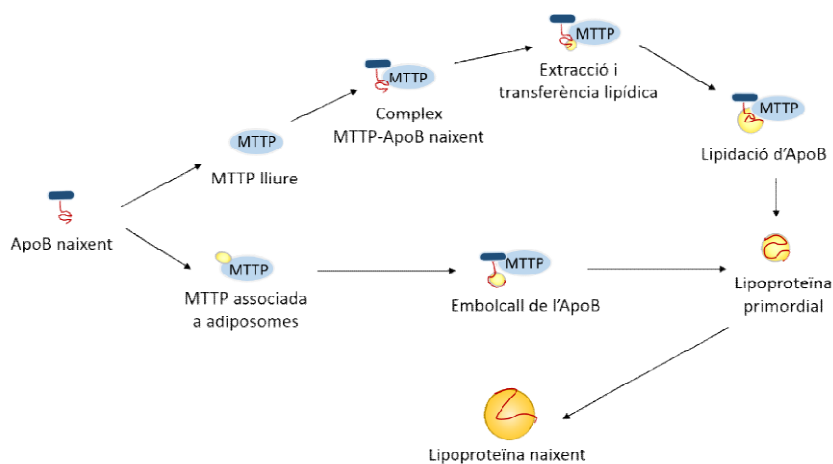


Figura 2. Esquema de la formació de les lipoproteïnes al RE rugós.

Tal com es descriu a la *taula 1*, els Qm naixents estan compostos, bàsicament, per TG, poques quantitats de fosfolípids, colesterol no esterificat i esterificat, l'apoB48, apoA-I, apoA-II i apoA-IV. Això fa que els Qm siguin bons acceptors de colesterol provinent d'altres lipoproteïnes. El procés d'intercanvi lipídic entre lipoproteïnes es duu a terme a la circulació general i és mediat, principalment, per la proteïna transferidora de fosfolípids (PLTP) i la proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP). Aquest intercanvi també repercuteix en les apos dels tipus As, Cs i E entre Qm i HDL, cosa que permet la maduració dels Qm com a substrat per a la lipoproteïna lipasa (LPL).

La CETP és una proteïna transportadora secretada, principalment, pel fetge que es troba unida a les HDL en circulació. La proteïna facilita l'intercanvi dels èsters de colesterol presents a les HDL cap a les TRL i les LDL, mentre que també traspasa TG de les TRL i LDL cap a les HDL. La CETP és, doncs, responsable directament de canvis estructurals a les lipoproteïnes, ja que, en presència de TG elevats, la seva acció genera LDL i HDL més petites i denses [37] i, indirectament, promou l'eliminació d'èsters de colesterol presents en circulació pel fetge. Aquest procés d'intercanvi permet a les TRL adquirir les apos essencials per la hidròlisi dels TG com l'apoC-II, apoC-III i apoA-V. L'apoC-II és l'activador de l'enzim LPL; l'apoC-III és l'inhibidor de l'activitat LPL i interfereix en el reconeixement de l'apoE pels receptors hepàtics, és a dir, també modula la captació de lipoproteïnes per part del fetge; i, finalment l'apoA-V, estimula l'acció de la LPL. La LPL és una glucoproteïna sintetitzada al cor, el múscul i el teixit adipós. Per dur a terme la seva funció, se secreta a l'endoteli vascular unida a proteoglicans d'heparan sulfat en forma d'homodímer, on hidrolitza els TG de les lipoproteïnes circulants que contenen apoC-II.

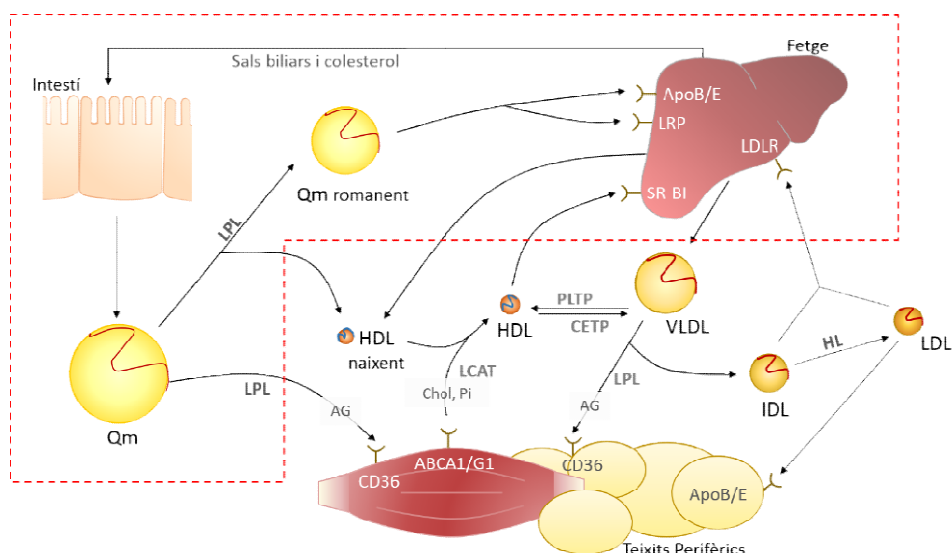


Figura 3. Esquema del metabolisme lipídic. La part corresponent al metabolisme exogen és delimitat per la línia discontinua vermella.

A mesura que els Qm circulen, es troben la LPL activa unida als proteoglicans de diferents teixits. La LPL hidrolitza el seu contingut de TG alliberant AG i glicerol. Els AG són captats pels teixits per a l'emmagatzematge o per generar energia, mentre que el glicerol s'integra a la via de gluconeogènesi. La vida mitjana dels Qm en circulació és, aproximadament, d'1h (malgrat que, a vegades, poden romandre-hi fins a 4h). Després de la hidròlisi del 80-90% del seu contingut de TG i del fet que les apoCs i As s'hagin transferit a les HDL, els Qm són més petits, densos i contenen, bàsicament, colesterol i apoE. Aquest tipus de lipoproteïnes s'anomenen *Qm romanents* (figura 3).

L'apoE és una apolipoproteïna clau en el metabolisme de les TRL (Qm i VLDL), ja que és la responsable del reconeixement d'aquestes lipoproteïnes pels seus receptors (el receptor LDL o LDLR i la proteïna relativa al LDLR o LRP) al fetge i als teixits perifèrics, cosa que facilita, així, l'eliminació dels romanents de les TRL de la circulació. L'apoE se sintetitza, principalment, al fetge i, en menor proporció, a l'intestí.

Els receptors de la família LDLR presents a la superfície dels hepatòcits permeten la internalització de les partícules romanents de les TRL, les quals han augmentat el seu contingut de colesterol, on s'eliminaran o metabolitzaran. Les apos com l'apoE o la B100 són els principals lligands per aquests receptors. A més a més, l'apoA-V, degut a la seva capacitat d'unió als receptors de la família LDL i als proteoglicans d'heparan sulfat presents a la superfície hepàtica, també pot reconèixer i modular l'eliminació de les TRL circulants.

2.3 Metabolisme endogen

Els AG presents al fetge poden ser de tres orígens: derivats de la captació de romanents o HDL de la circulació, captats de la circulació on es troben units a albúmina i deriven de la lipòlisi al teixit adipós (principalment, en dejú o en estats patològics) o sintetitzats *de novo* a partir de glucosa, lactosa o alanina (majoritàriament, en estat post-prandial).

El fetge secreta TG d'origen endogen en forma de VLDL, llur procés d'encoblament és molt semblant al dels Qm (resumit a la figura 4).

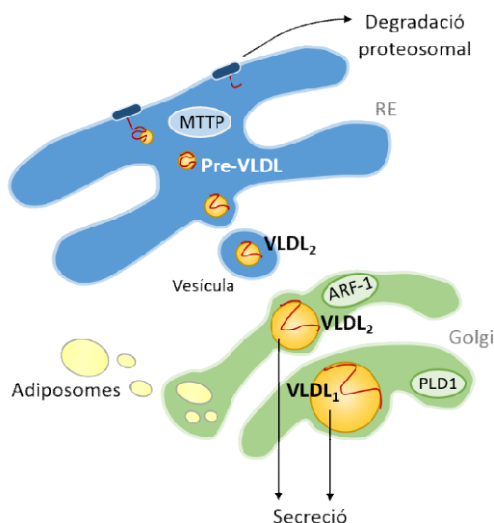


Figura 4. Encoblament de les VLDL als hepatòcits. Al RE es sintetitza l'apoB100 on es lipida per la MTP per formar les pre-VLDL (si no, és degradada al proteosoma). La pre-VLDL es transporta al aparell de Golgi on passa a VLDL₂ (partícula mitjana/petita) i, en cas que el pool lipídic intracel·lular sigui alt, a VLDL₁ (partícula gran).

Les VLDL naixents contenen un 50% de TG i són més petites que els Qm. Les seves apos són l'apoA-V, apoC-I, apoE, i a diferència dels Qm, presenten apoB100 en comptes d'apoB48 (*taula 1*). Durant el seu procés de maduració a la circulació (*figura 5*), les VLDL guanyen colesterol i apos provinents de les HDL gràcies a la CETP. Un cop les VLDL han estat enriquides amb apoE i Cs, la LPL ancorada als capil·lars hidrolitza els TG del seu nucli apolar (gràcies a la seva estimulació per l'apoA-V) i la partícula comença a perdre superfície juntament amb apoCs i fosfolípids, els quals són transferits a les HDL.

Per acció de la LPL, la VLDL es transforma en IDL, la qual és més petita i densa. Les IDL són les lipoproteïnes amb el contingut més alt de colesterol no esterificat i les seves principals apos són la B100 i la E (*taula 1*). Aproximadament, la meitat de les partícules IDL són captades pel fetge i eliminades de la circulació o es transformen en LDL per acció de la lipasa hepàtica (HL).

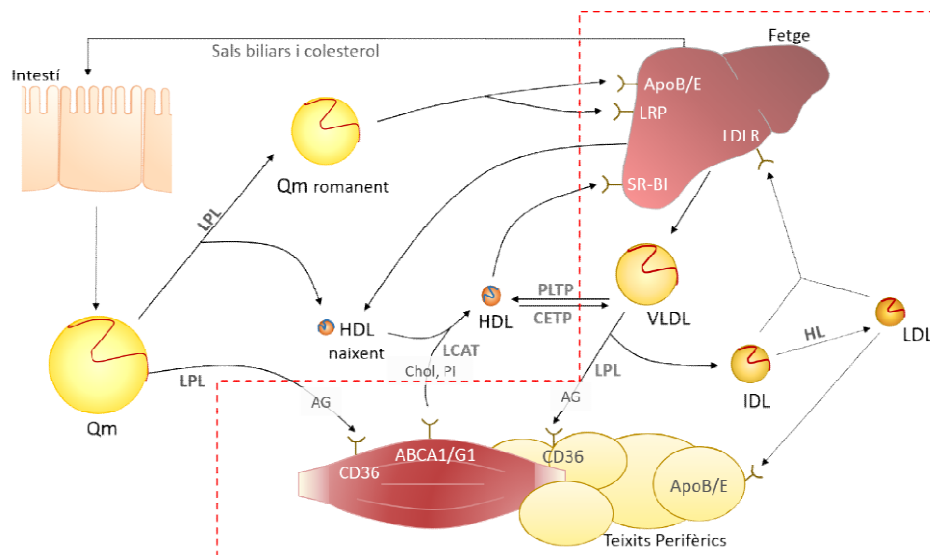


Figura 5. Esquema del metabolisme lipídic. La part corresponent al metabolisme endogen és delimitat per la línia discontinua vermella.

L'HL és un enzim lipolític (codificat al gen *LIPC*) que utilitza com a principal substrat els fosfolípids. Té un paper clau en la remodelació de les LDL i les HDL, i es troba ancorat al fetge, on hidrolitza els TG transportats en ambdues lipoproteïnes, que, subseqüentment, s'internalitzaran al fetge. A banda del seu paper hidrolític, també actua com a lligand per la captació de lipoproteïnes a través dels receptors de la superfície de membrana i els proteoglicans.

Les LDL són lipoproteïnes d'origen plasmàtic, malgrat que també poden ser sintetitzades al fetge. Són petites, gairebé la meitat del seu contingut és colesterol (la qual cosa les converteix en la principal forma de transport de colesterol en circulació) i només tenen una molècula d'apoB100. La seva mitjana de vida és de 2-3 dies. L'eliminació es duu a terme, principalment, al fetge (mitjançant els LDLR), on l'excés de colesterol s'excreta amb la bilis. En canvi, la resta de components lipídics són catabolitzats a l'intestí o s'utilitzen per a l'esteroidogènesi (producció d'hormones sexuals) i per a la formació de membranes cel·lulars.

La proproteïna convertasa subtilsin/kexina tipus 9 (PCSK9) és clau en la regulació de la presència de LDLR a la superfície dels hepatòcits, ja que

s'uneix als LDLR i en promou la degradació lisosomal (*apartat 4*); per tant, modula també l'eliminació de les LDL pel fetge.

2.3.1 Desenvolupament de l'arteriosclerosi

Ja ha estat demostrat per diversos estudis epidemiològics que el colesterol transportat per les LDL té un paper clau en el desenvolupament de la isquèmia coronària i altres esdeveniments cardiovasculars [38,39]. En resum, davant un excés de colesterol circulant, l'endoteli de les artèries grans i mitjanes s'activa i permet la infiltració i l'acumulació de lipoproteïnes a l'espai subendotelial. L'oxidació d'aquestes LDL permet l'alliberament a la matriu extracel·lular de diferents fosfolípids que activen l'expressió de molècules d'adhesió per part de les cèl·lules endotelials. L'expressió d'aquestes molècules atrau monòcits que penetren i es diferencien en macròfags, els quals expressaran receptors *scavenger* i els tipus Toll a la seva superfície.

Els macròfags, a diferència d'altres cèl·lules, no tenen una regulació de la síntesi de receptors dependent del colesterol intracel·lular. Els receptors *scavenger* reconeixen LDL oxidades/acetilades i les internalitzen, per la qual cosa s'acumulen en els macròfags i aquest fet propiciarà la conversió d'aquestes cèl·lules en cèl·lules escumoses. Posteriorment, les cèl·lules escumoses dipositen el seu contingut lipídic a l'espai subendotelial, cosa que contribueix al desenvolupament de la placa arterioscleròtica. Per altra banda, els receptors tipus Toll inicien una cascada de senyalització que permet als macròfags alliberar òxid nítric i enzims proteolítics, entre altres molècules, que degradaran la matriu extracel·lular, produiran una desestabilització de la placa arterioscleròtica i n'augmentaran el risc de ruptura i trombosi.

Malgrat que el desenvolupament de l'arteriosclerosi sempre s'ha associat a les LDL, les noves evidències demostren que les TRL també hi juguen un paper clau, tot i que no són clars els mecanismes implicats.

Les TRL són proinflamatòries, cosa que representa un factor clau en l'inici del desenvolupament de l'arteriosclerosi. La seva associació amb la inflamació es deu, principalment, a tres mecanismes (revisat a [40]): a)

induint l'expressió de molècules d'adhesió cel·lular; *b*) els AG provinents de la seva lipòlisi indueixen inflamació, apoptosi cel·lular i la producció d'espècies reactives a l'oxigen, i *c*) són transportadores de lipopolisacàrids provinents de la lisi de la flora intestinal, els quals indueixen respostes proinflamatòries.

Durant el període postprandial, es produeix un increment de partícules aterògenes en circulació, com els Qm, les VLDL i les RLP. Tenint en compte que, durant la major part del dia, els individus no es troben en estat de dejú, és congruent pensar que les alteracions ens els nivells de TG i les lipoproteïnes en estat postprandial poden induir al desenvolupament de l'arteriosclerosi. A més a més, com hem esmentat, l'increment de TG indueix a canvis en el perfil lipoproteic, que el fan més proaterogen (*apartat 3*).

2.4 Transport revers de colesterol

Fins ara, s'ha vist com el colesterol exogen i endogen es distribueix al cos. Malgrat això, el fetge i els òrgans que sintetitzen hormones esteroïdes són els únics que poden eliminar el colesterol. Per tant, és necessari un mecanisme d'eliminació de l'excés de colesterol a la resta de teixits per evitar el desenvolupament de processos fisiopatològics.

El transport revers de colesterol és mediat per les HDL (*figura 6*). Les HDL són la fracció lipoproteica més heterogènia, ja que les seves subfraccions difereixen en mida, densitat, composició lipídica i apos. Les HDL naixents són discoïdals i deriven de la síntesi al fetge o intestí d'apoA-I o de l'alliberament d'apoA-I de les TRL per la LPL. L'apoA-I és sintetitzada, principalment, al fetge i, en menor mesura, a l'intestí prim. Com és la proteïna predominant a les HDL, la mesura de la concentració d'apoA-I reflecteix la concentració d'HDL circulant.

Aquest transport revers de colesterol és el procés pel qual les HDL capten l'excés de colesterol als teixits perifèrics i el transporten al fetge, on serà eliminat per la bilis. El procés es pot dividir en tres grans etapes: l'eflux de colesterol de les cèl·lules, l'esterificació del colesterol i el destí metabòlic d'aquests èsters de colesterol.

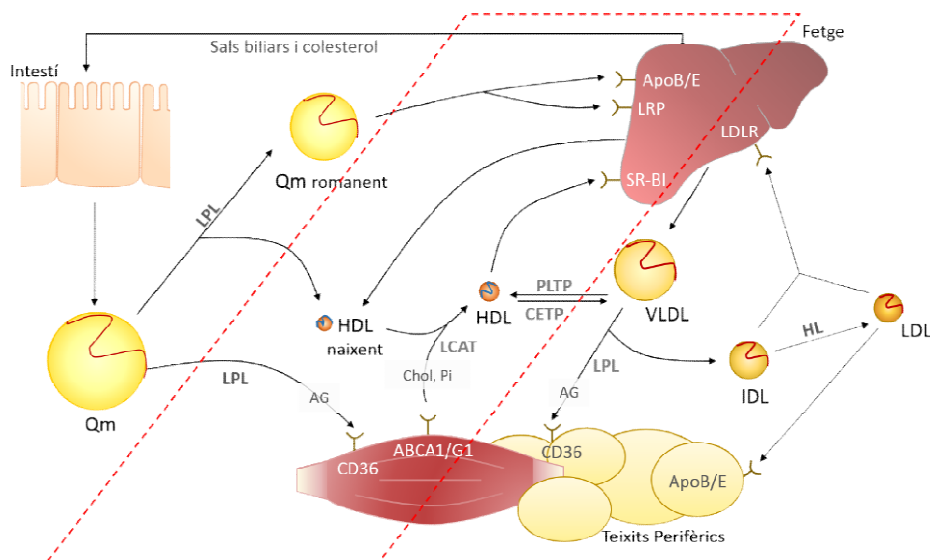


Figura 6. Esquema del metabolisme lipídic. La part corresponent al transport revers de colesterol és delimitat per la línia discontinua vermella.

Les HDL naixents tenen la capacitat de capturar el colesterol dels teixits perifèrics i dels macròfags. Malgrat que no és clar el mecanisme pel qual el colesterol de les cèl·lules passa a les HDL, s'han postulat dues teories:

- Per difusió: el colesterol passa directament a les HDL naixents sense necessitat de receptor.
- Dependent de receptor: la lipidació de les HDL naixents es produeix com a resultat de l'eflux de colesterol dels teixits perifèrics mediat pels transportadors de membrana *ATP-binding cassette subfamily A member 1* (ABCA1) i *ATP-binding cassette subfamily G member 2* (ABCG2).

Actualment, s'accepta la teoria que ambdós processos podrien co-existir i que el predomini de l'un o de l'altre és dependent del tipus cel·lular.

El colesterol no esterificat alliberat pel teixit perifèric és ràpidament esterificat per la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), que és un enzim unit a la superfície de les HDL i activat per l'apoA-I. El colesterol esterificat passa al nucli de la partícula i, per tant, durant el procés d'esterificació de les HDL, aquestes adquireixen una forma esfèrica i guanyen volum, transformant-se en HDL₃ (HDL naixent), i posteriorment, en HDL₂ (HDL madura).

La destinació dels èsters de colesterol presents a les HDL és variable. L'HDL pot ser reconeguda pels receptors hepàtics SR-BI (membre 1 de la classe B dels receptors *scavenger*), LRP i el receptor de l'apoE (APOER) . Un cop internalitzades, el colesterol pot ser utilitzat, principalment, per la formació de lipoproteïnes, per la síntesi d'àcids biliars o pot ser secretat per la bilis. Una altra possibilitat és que els èsters de colesterol de les HDL es transfereixin a les TRL a través de la PLTP i la CETP.

3. Dislipèmia aterògena

Les alteracions metabòliques com la resistència a la insulina (IR), la hiperglucèmia o l'augment d'adipocitoquines típiques de pacients amb DT2, obesitat o síndrome metabòlica, indueixen a canvis quantitatius, qualitatius i cinètics sobre lípids i lipoproteïnes, que converteixen en partícules proaterògenes. La prevalença d'aquest perfil lipoproteic alterat, anomenat DA, és entre el 35-50% en aquest tipus de pacients [41–43]. A grans trets, la IR genera una sèrie de canvis en el metabolisme lipídic (detallats més endavant en aquesta secció), que indueixen a un increment dels TG, i aquest augment, junt amb nivells normals o lleugerament alts de cLDL, una disminució del cHDL i un augment de RLP, configura un perfil lipoproteic de DA.

La DA, més específicament, es caracteritza per un increment en la síntesi hepàtica de VLDL grans (VLDL₁) a causa de la IR i, per tant, per un augment de la concentració plasmàtica d'apoB100. Per acció de la CETP, les VLDL₁ generen partícules LDL petites i denses (sdLDL), mentre disminueix el colesterol transportat per les HDL. A més, l'efecte de la HL sobre les VLDL, IDL i LDL genera RLP difícils d'eliminar i altament aterògenes. Dit d'una altra manera, la IR genera partícules que, sota circumstàncies normals, no són abundants com les sdLDL o els RLP. Com a conseqüència de l'augment de TG, l'eliminació de les partícules HDL disminueix i, a més, s'ha relacionat també amb l'increment del temps d'hiperlipèmia postprandial.

Per altra banda, la IR és present també en altres patologies com la diabetis tipus 3 (DT3). La DT3 es considera una comorbiditat neuroendocrina que representa l'evolució de la DT2 a malalties de deteriorament cognitiu (MDC) com l'Alzheimer [44] i, per tant, podria explicar la similitud entre la DA típica de pacients amb DT2 o síndrome metabòlica i el perfil lipídic alterat característic dels pacients amb MDC (caracteritzat per TG alts, alts nivells de cLDL amb un increment de les LDL petites i baixos nivells de cHDL [45–47]).

3.1 VLDL₁

Com s'ha descrit anteriorment (*apartat 2*) en situacions fisiològiques, la producció de VLDL per part del fetge depèn de la disponibilitat de TG. Els TG utilitzats per formar les VLDL són sintetitzats als hepatòcits com a resposta preventiva a un influx augmentat d'AG. Hi ha tres orígens principals d'aquests AG: *a*) AG alliberats del teixit adipós per l'acció de la lipasa sensible a hormones i la lipasa dels TG; *b*) de la captació de Qm romanents i HDL, i *c*) per la síntesi de *novo*, principalment, en estat postprandial. Durant aquest procés de síntesi de VLDL, una de les principals hormones reguladores és la insulina.

En pacients amb alteracions metabòliques, l'augment de TG plasmàtics es deu, principalment, a un augment de la producció, una disminució del catabolisme i un enriquiment lipídic de les VLDL. Ja hi ha estudis que han determinat un increment en la producció de VLDL en pacients obesos, no diabètics i insulinoresistents [48,49], i també han correlacionat la sobreproducció de VLDL amb la IR i el fetge gras en pacients amb DT2 [50,51].

3.1.1 Augment de la producció de VLDL₁

Fins a la data, s'han determinat diferents vies per les quals la IR afavoreix la producció de VLDL₁ al fetge:

- Reducció de la inhibició de la lipasa sensible a hormones al teixit adipós, que augmenta la lipòlisi al teixit adipós i allibera a la circulació AG, els quals estimulen la síntesi de TG als hepatòcits [52].
- Reducció de la degradació d'apoB al fetge. La IR afavoreix la disminució de l'activitat de la fosfoinositol 3-kinasa (PI3K), cosa que conduirà a la disminució de la degradació de l'apolipoproteïna pel complex proteosòmic i, per tant, més disponibilitat per ser lipidada i secretada [53,54].
- Augment de l'expressió d'*MTTP* a través de la translocació al nucli del seu factor de transcripció FoxO1, el qual, normalment, es troba inhibit per PI3K [55,56].

S'han suggerit altres vies, com l'augment de l'activitat dels factors fosfolipasa D1 (PLD1) i el factor 1 de la ribosilació de l'ADP (ARF-1), ambdós

involucrats en la formació de VLDL₁ [57,58] (*figura 4*), o la possible disminució del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3), el qual és un fosfolípid que disminueix la transferència de lípids a les pre-VLDL a través de la reducció de l'activitat de PI3K [59,60]. Tot i això, aquestes darreres són hipòtesis per confirmar.

A més, en pacients amb IR o DT2, la lipogènesi *de novo* es troba augmentada [61,62]. Aquesta liponeogènesi es deriva de l'increment en l'expressió de les proteïnes d'unió a elements de resposta a carbohidrats (ChREBP) i a esterols 1c (SREBP-1c). Es creu que ambdós factors de transcripció, ChREBP i SREBP-1c, activen gens clau de la lipogènesi *de novo* hepàtica, com l'acetil CoA Carboxilasa o la AG Sintasa [63–65].

Finalment, també s'ha descrit que nivells plasmàtics baixos d'adiponectina (hormona sintetitzada al teixit adipós implicada en el metabolisme lipídic i glicosídic) tenen un paper clau en l'increment de la producció de VLDL en la DT2. Per una banda, la hipoadiponectinèmia augmenta els nivells plasmàtics d'AG i, per tant, propicia la producció de VLDL; per altra banda, regula l'expressió de factors de transcripció implicats en la liponeogènesi [66].

3.1.2 Disminució del catabolisme de les VLDL₁

Paral·lelament a l'augment de la producció de VLDL, hi ha una disminució del catabolisme d'aquestes que afavoreix la HTG en pacients amb DT2. Aquest efecte és degut, principalment, a la disminució de l'activitat de la LPL per dos possibles factors:

- IR: la insulina és un activador de la LPL. S'ha suggerit que, en estats de resistència/dèficit relatiu d'insulina, l'activitat de la LPL sobre les VLDL disminueix [67,68], fet que augmenta la mitjana de vida d'aquestes partícules en circulació.
- ApoC-III: l'augment d'apoC-III en plasma (inhibidor de la LPL) s'ha associat a una disminució en l'eliminació de les VLDL en pacients obesos insulino-resistents [69].

3.1.3 Canvis fisicoquímics de les VLDL₁

Els pacients amb alteracions metabòliques com la IR, intolerància a la glucosa o obesitat produeixen VLDL alterades. S'ha determinat que hi ha un augment en la proporció de VLDL₁ per comparació a les VLDL mitjanes i petites [70,71]. Les VLDL₁ són més aterògenes per la seva relació amb una major disfunció endotelial [72], per induir a la formació de cèl·lules escumoses degut a la seva afinitat amb els macròfags [73] i per un augment en el seu contingut d'àcid palmític, la qual cosa pot promoure la secreció de factors proinflamatoris en les cèl·lules vasculares musculars llises [74].

Una altra possible modificació que contribueix a la disminució del seu catabolisme és la glicosilació de les apos; aquesta modificació a les apoB i E s'ha relacionat amb una menor afinitat pel seu receptor apoB/E, mentre que la glicosilació de l'apoC-II (cofactor de la LPL) s'associa a una menor activació de la LPL [75,76].

3.2 LDL petites i denses

Els nivells de cLDL a la DA són comparables o lleugerament superiors als de la població general [71]. Per tant, l'augment de l'aterogenitat de les LDL en població amb DT2, obesitat o síndrome metabòlica no es deu a la quantitat i sí, a canvis en el catabolisme i la composició de les partícules.

Estudis amb pacients amb DT2 han establert una reducció del catabolisme de les LDL [77], cosa que fa que augmenti la vida mitjana de les partícules en circulació i, per tant, són més vulnerables a modificacions i dipòsit dins la paret arterial. La reducció del catabolisme de les LDL es basa, principalment, en una menor expressió dels LDLR degut a nivells baixos d'insulina [78] i a modificacions fisicoquímiques de les partícules que disminueixen la seva unió pel receptor.

Com en el cas de les VLDL, s'ha observat un augment de la glicosilació de les apos presents a les LDL en individus amb DT2, que redueix la seva afinitat pel receptor i incrementa la formació de cèl·lules escumoses [75,76,79]. A més, també s'ha determinat un augment de l'oxidació de les LDL [80], cosa que també redueix la unió partícula-receptor, augmenta

l'expressió de molècules d'adhesió, incrementa la formació de cèl·lules escumoses i promou la inflamació [81,82].

Finalment, s'ha descrit un increment de les sdLDL en població diabètica [71]. Aquest és conseqüència directa de l'augment de les VLDL₁ en aquests pacients, que estimula l'activitat de la CETP i afavoreix la formació de partícules sdLDL riques en TG, en comptes de partícules LDL grans [83]. Les sdLDL són més aterògenes, ja que s'ha demostrat que són més fàcilment oxidables i, per tant, penetren amb més facilitat a l'espai endotelial i promouen la formació de cèl·lules escumoses, la disfunció endotelial i la inflamació, promovent així la progressió de l'arteriosclerosi [84–86].

3.3 HDL petita i disfuncional

Els nivells de cHDL i apoA-I plasmàtics en individus amb DA són inferiors als de la població general [87]. A més a més, s'ha determinat que les partícules HDL són més petites en pacients amb DT2 [71].

Diversos estudis han determinat que l'augment d'HDL petites es deu a un increment del catabolisme de les HDL per dues vies diferents: *a*) increment de l'activitat de l'HL degut a la disminució dels nivells d'insulina [88], i *b*) augment del contingut de TG i disminució de colesterol de l'HDL per una via dependent de CETP, la qual cosa fa l'HDL millor substrat per enzims lipolítics generant una disminució global de les HDL, però, en proporció, augmentant la subfracció petita [89]. També s'ha suggerit un paper de l'adiponectina sobre el metabolisme de l'HDL, malgrat que encara roman indeterminat.

En l'àmbit fisicoquímic, les apos presents a l'HDL es poden glicosilar en estats d'IR, però, fins a la data, no se n'han descrit les conseqüències. Per altra banda, en DT2, s'ha descrit un canvi de la composició lipídica a la superfície de l'HDL, el qual li confereix una major rigidesa i afinitat per enzims lipolítics, que, alhora, alliberaran AG altament bioactius (com l'àcid araquidònic o el palmític), que promouran processos proinflamatoris [90,91]. També s'ha detectat una pèrdua de funcionalitat de l'HDL petita degut a la seva capacitat reduïda de promoure l'eflux de colesterol de les cèl·lules, com a conseqüència de la reducció de l'expressió d'ABCA1/G1

[92–94]. A més, a causa del seu canvi composicional, l'HDL petita té una menor capacitat antioxidant i menor acció vasorelaxant [95,96].

3.4 Lipoproteïnes romanents

Com s'ha comentat anteriorment (*apartat 2*), després de la secreció de TRL per l'intestí i el fetge, els TG s'hidrolitzen de les lipoproteïnes per acció de la LPL i la HL, cosa que permet la captació d'AG pels teixits perifèrics. A mesura que els TG són eliminats de les lipoproteïnes, la densitat d'aquestes augmenta: els Qm passen a Qm romanents i les VLDL passen a IDL i, finalment, a LDL. Les TRL, doncs, tenen un contingut inicial petit d'èsters de colesterol (*taula 1*) i, per tant, les RLP que es formen per la hidròlisi de TG són més petites i tenen una composició incrementada d'èsters de colesterol [97].

Les RLP es componen per un conjunt de partícules molt heterogènies provinents de Qm i VLDL, que, tot i no poder travessar la paret endotelial per la seva mida, contenen, aproximadament, 40 vegades més èsters de colesterol que les LDL [98]. Com s'ha esmentat anteriorment (*apartat 2*), hi ha estudis que demostren que nivells elevats de RLP poden accelerar el desenvolupament l'arteriosclerosi i MCV [99,100], ja que, degut a la seva mida més petita, poden travessar la paret arterial i, pel seu alt contingut en colesterol, acceleren la formació de cèl·lules escumoses (revisat a [40]). A més a més, s'ha descrit que pacients amb IR o DT2 tenen nivells augmentats de RLP [101,102].

Cal remarcar, també, que la formació de RLP depèn de l'activitat de la LPL i els factors que la regulen, ja siguin altres proteïnes (apoCs, apoA-V, apoE i la família de les proteïnes tipus angiopoietina) o estímuls fisiològics (com els nivells d'insulina) [103].

3.5 Hiperlipèmia postprandial

Les alteracions en el catabolisme dels TG han demostrat l'augment el temps d'hiperlipèmia postprandial, cosa que ha esdevingut una característica típica de la DA [104,105]. La hiperlipèmia postprandial és

més prevalent en pacients amb DT2, obesitat o síndrome metabòlica [106] i, a més, ha estat associada a una major disfunció endotelial i estrès oxidatiu [107,108].

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

4. Genètica de la dislipèmia aterògena

Com hem exposat fins ara, la DA és una dislipèmia caracteritzada per canvis quantitius, qualitius i cinètics de les lipoproteïnes que està altament modulada per l'estat metabòlic de cada individu. No obstant això, i com hem explicat anteriorment (*apartat 1*), els estudis en l'àmbit han determinat que la genètica explica entre el 10-12% de la variabilitat lipídica intraindividual.

Es calcula que el 75% dels gens que poden propiciar el desenvolupament de MCV no estan relacionats directament amb el metabolisme lipídic [20]; no obstant això, ja s'han descrit polimorfismes de gens implicats en el metabolisme lipídic que estan associats a components de la DA com en el cas de *LPL*, *CETP* i *LIPC* [109]. A la taula següent, es detallen les associacions ja demostrades entre gens i els seus SNPs que afecten alguna de les tres principals característiques de la DA en pacients amb un alt risc cardiovascular:

Taula 2. Gens i SNPs associats a característiques lipídiques de la DA

Gen	SNP	Efecte	Ref.
TG i VLDL₁			
<i>APOA1</i>	c.-2500C>T*	↑	[110]
	rs670	↑	[110]
<i>APOA4</i>	rs5110	↑	[111]
	p.Thr347Ser*	↑	[110]
<i>APOA5</i>	rs662799	↑	[112–117]
	rs3135506	↑	[110,112,114,118]
	rs651821	↑	[110,119]
<i>APOC3</i>	rs2854116	↑	[120]
<i>LPL</i>	rs1801177	↑	[121]
	p.Ser45Asn*	↑	[121]
	rs118204078	↑	[121]
	rs268	↑	[121]
	rs328	↓	[120–122]
<i>NR1H4</i>	p.Gly14Ser*	↑	[123]
<i>TNF</i>	rs1800629	↑	[124]
sdLDL			
<i>APOA1</i>	c.-75G>A*	↑	[125]

<i>APOA4</i>	p.Thr347Ser*	↑	[125]
<i>APOA5</i>	rs662799	↑	[110,112,113,116,118,126]
	rs3135506	↑	[112,118]
	rs651821	↑	[110,119]
<i>APOC3</i>	rs5128	↑	[110]
<i>CETP</i>	rs708272	↓	[120,127,128]

HDL petita i disfuncional

<i>CETP</i>	rs708272	↓	[120,122,127]
<i>LIPC</i>	rs1800588	↓	[122]
<i>NR1H4</i>	p.Gly14Ser*	↑	[123]

RLP

<i>APOA5</i>	rs662799	↑	[116]
	rs651821	↑	[100]
<i>APOE</i>	rs7412	↑	[129–131]
	rs190853081	↑	[132]
<i>LPL</i>	rs268	↑	[100,133]
	rs1801177	↑	[100]
	rs118204057	↑	[100]
	rs328	↑	[100]
<i>SULF2</i>	rs2281279	↑	[134]
<i>TRIB1</i>	rs2954029	↑	[100]

*No té assignat l'identificador Rs. ↑: augmenta els nivells. ↓: disminueix els nivells.

Tal com es descriu a la *taula 2*, ja hi ha evidències de variants genètiques en gens clau en el metabolisme lipídic i lipoproteic que alteren característiques típiques de la DA i, per tant, predisposen o protegeixen enfront del seu desenvolupament. Per exemple, Guardiola *et al.* van descriure en una població dislipèmica amb alt risc cardiovascular que l'al·lel rar de les variants rs662799 i rs3135506 d'*APOA5* no només s'associen a un increment de TG, sinó també a un perfil lipoproteic aterogen caracteritzat per un increment del nombre de partícules VLDL totals, LDL petites i HDL petites. A més a més, van observar que aquesta alteració en el perfil lipoproteic és més comuna en individus que es trobaven al tercil més alt de gruix íntima-media carotídi (com a mesura subclínica d'arteriosclerosi)[112]. Aquest fet demostra que, en la seva

població d'estudi, les variants d'*APOA5* modulen el perfil lipoproteic induint un perfil proaterogen associat a l'arteriosclerosi subclínica.

Per altra banda, en els últims 10 anys, la nostra unitat i altres, han demostrat també la relació entre proteïnes circulants implicades en el metabolisme lipídic com PCSK9 (proteïna convertasa subtilsin/kexina tipus 9) [135], PPAR (receptor actiu per la proliferació del peroxisoma) [136,137], RBP4 (proteïna d'unió a retinol tipus 4) [138] o FABP4 (proteïna d'unió a àcids grassos lliures tipus 4) [139] i el seu possible efecte modulador sobre els lípids. Fins a la data, però, les dades de com les variants genètiques dels seus gens codificants podrien afectar el perfil lipoproteic són escasses.

Degut al gran nombre de gens implicats en metabolisme lipídic i al possible paper que també podrien jugar-hi altres gens encara no relacionats amb el metabolisme lipídic, en aquesta tesi ens centrem en l'estudi del gen *APOA5* i el gen *PCSK9* com a principals moduladors lipídics dels TG i del colesterol, respectivament, i en la cerca de nous gens relacionats amb un perfil lipoproteic alterat.

4.1 *APOA5*

Com fins ara hem vist, les apos són el component proteic de les lipoproteïnes i s'encarreguen tant de l'estabilitat de la molècula com de la unió d'aquesta a enzims i receptors cel·lulars.

Tan sols fa 14 anys que es va identificar el gen *APOA5*, l'últim component del clúster *APOA1/C3/A4/A5* [140], localitzat en una petita regió del braç llarg del cromosoma 11. Els gens codificats en aquesta regió genòmica són claus en el metabolisme lipoproteic [141] i per això, s'han estudiat intensament les seves variants genètiques en relació amb la MCV i el perfil lipídic. Resumidament:

- *APOA1*, gen que codifica per l'apoA-I. Com hem esmentat anteriorment, aquesta apolipoproteïna se sintetitza, principalment, al fetge i en menor mesura, a l'intestí prim. És el principal component proteic de l'HDL i juga un paper clau en el transport revers de colesterol: forma i estabilitza les partícules d'HDL, interactua amb els transportadors ABCA1/ABCG1, activa

LCAT i és el lligand de SR-BI (revisat a [142]). El dèficit d'apoA-I a causa de variants genètiques en l'*APOA1* s'associen a una disminució dels nivells plasmàtics d'HDL, malaltia coronària arterial prematura i opacitat corneal [143]. Així mateix, també s'han descrit variants del gen associades a nivells més alts de TG i l'augment de LDL petites (*taula 2*).

- *APOC3* és el gen codificant de l'apoC-III. L'apoC-III és sintetitzada al fetge i també a l'intestí prim. Forma part de les apos presents a Qm, VLDL i HDL. Aquesta apolipoproteïna modula els nivells de TG: controla l'absorció intestinal d'AG, interfereix en la unió de l'apoE present a les TRL amb els seus receptors hepàtics augmentant així el seu temps en circulació, promou la síntesi de VLDL₁ i inhibeix la LPL (revisat a [144]). El dèficit d'apoC-III d'origen genètic es relaciona amb nivells més baixos de TG i cLDL, més alts d'HDL i menys arteriosclerosi [143]. Variants de l'*APOC3* s'han associat a un increment tant de la concentració de VLDL₁ com de sLDL petites (*taula 2*).

- *APOA4* és el gen que codifica per l'apoA-IV. L'apoA-IV és sintetitzada a l'intestí prim en resposta a l'augment lipídic en estat postprandial i es troba als Qm i HDL. Les seves funcions s'associen a l'encoblament dels Qm, mediador en el transport revers de colesterol, regulador de la sacietat, funció gàstrica i de l'homeòstasi de la glucosa (revisat a [145]). Variants de l'*APOA4* s'han associat a nivells alts de TG i augment de LDL petites (*taula 2*), nivells baixos de HDL i progressió de l'arteriosclerosi [146,147].

La relació genètica d'aquests tres components del clúster de les apos amb el metabolisme lipídic i el desenvolupament de MCV, doncs, ha estat àmpliament demostrada. Tot i això, les variacions al gen de l'*APOA5* són les més fortament associades a l'augment dels nivells plasmàtics de TG (principal factor promotor per al desenvolupament del perfil lipoproteic de DA).

4.1.1 ApoA-V: descobriment i mecanisme d'acció

El gen *APOA5*, localitzat al cromosoma 11 a la posició 11p23, va ser descobert l'any 2001 per dos grups independents. Per una banda, Pennacchio *et al.* van identificar el gen comparant la seqüència de DNA

entre ratolins i humans. La creació de dos models animals de ratolí va demostrar el gran impacte de l'*APOA5* sobre els nivells de TG: els ratolins transgènics d'*APOA5* humà presentaven un terç dels nivells de TG en comparació dels controls, mentre que els ratolins *knockout* per l'*APOA5* tenien 4 cops més TG plasmàtics que els controls [140]. Per altra banda, Van der Vliet *et al.* van identificar l'*APOA5* buscant nous factors implicats en el procés de regeneració hepàtica que es produeix com a resposta al dany hepàtic [148].

L'*APOA5* és un gen petit (3048 parells de bases) format per 4 exons i 3 introns que codifica una proteïna de 366 aminoàcids (l'apoA-V). En humans, l'*APOA5* s'expressa al fetge i, en menor mesura, a l'intestí prim [140,149]. L'apoA-V es troba als Qm, VLDL i HDL (*taula 1*). En comparació d'altres apolipoproteïnes, les concentracions plasmàtiques d'apoA-V són molt baixes (menys d'1µg/mL), cosa que representa una mil·lèsima part de les concentracions d'apoB [150]. S'ha estimat que hi ha una molècula d'apoA-V per cada 24 partícules de VLDL [151]. Degut a la seva baixa concentració i al fet que l'apoA-V pot ser reutilitzada i transferida entre lipoproteïnes, s'ha postulat que la seva funció és més catalítica que estructural [152].

Fins a la data, hi ha tres possibles mecanismes pels quals l'apoA-V pot influenciar en els nivells plasmàtics de TG: *a*) com a activador de la hidròlisi de Qm i VLDL mitjançada per LPL; *b*) com a lligand de receptors de la família dels LDLR promovent la captació hepàtica de lipoproteïnes romanents, i *c*) com a modulador intracel·lular de la síntesi de VLDL.

- Activador de la LPL: en models *in vivo* s'ha determinat que l'apoA-V és transferida de les HDL als Qm i les VLDL, on promou la unió de les lipoproteïnes a la superfície de les cèl·lules endotelials a través de la seva unió als proteoglicans (units, alhora, a la LPL) i la proteïna d'unió a HDL tipus 1 ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPIHBP1). S'ha descrit que l'apoA-V és un potent estimulador de la LPL. D'aquesta forma, el complex apoA-V/LPL/GPIHBP1 accelera la hidròlisi de les TRL, nodrint el teixit d'AG i formant lipoproteïnes romanents [153–155] (*figura 7*).

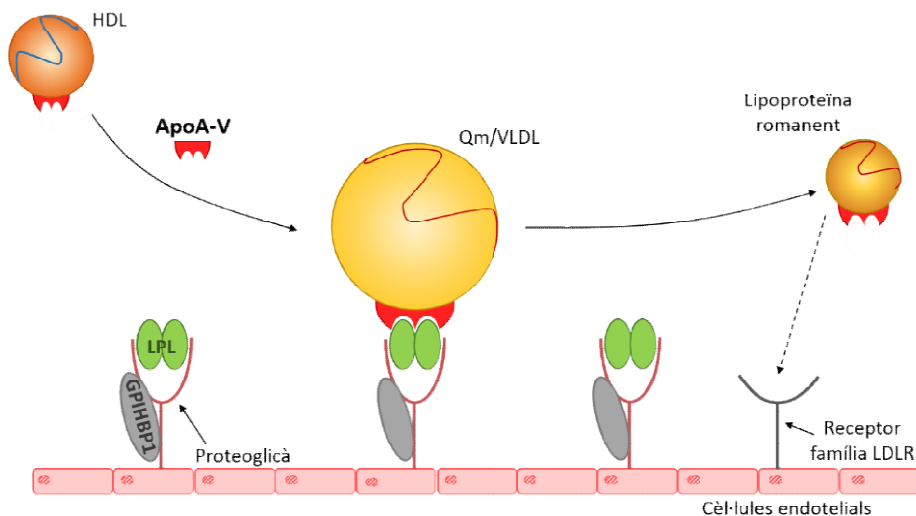


Figura 7. Esquema de la funció d'apoA-V. L'apoA-V és transferida de les HDL a les VLDL i s'uneix al complex format per GPIHBP1/LPL/proteoglicà per tal d'hidrolitzar la lipoproteïna. Per acció de la hidròlisi dels TG, es forma una lipoproteïna romanent, la qual pot ser unida a través d'apoA-V a receptors de membrana de la família dels LDLR (principalment a LRP i SORLA) i pot ser internalitzada a la cèl·lula.

- Lligand dels LDLR: com hem esmentat abans i per la seva estructura, l'apoA-V pot unir-se als proteoglicans de la superfície cel·lular, però també als receptors cel·lulars de la família de receptors LDLR (principalment, al LRP i al receptor relatiu a la sortilina o SORLA), afavorint l'endocitosi hepàtica dels romanents de les TRL i disminuint així els nivells de TG plasmàtics [156,157].

- Modulador de la producció de VLDL: es creu que només el 20% del total d'apoA-V es troba als hepatòcits [158]. Malgrat que hi ha moltes controvèrsies, estudis en models animals i *in vitro* han donat evidències quimicoestructurals per les quals l'apoA-V podria disminuir la lipidació de les VLDL durant la seva producció hepàtica al RE [159] i, per tant, disminuir els nivells plasmàtics de TG, afavorint la formació de VLDL petites, però no interferint en el nombre de partícules produïdes. Contràriament, altres estudis han determinat que, pel fet que l'apoB i l'apoA-V estan localitzades en diferents compartiments cel·lulars (RE i gotes lipídiques,

respectivament), la unió de l'apoA-V amb les VLDL es duu a terme durant la secreció de la lipoproteïna i no durant la formació [160]; en aquest sentit, la funció de l'apoA-V a les gotes lipídiques no és clara, però podria estar relacionada amb l'emmagatzematge intracel·lular de TG/ formació de les gotes lipídiques [158] no només als hepatòcits, sinó també en altres teixits amb capacitat d'emmagatzemar TG, com els adipòcits [161].

Com s'ha esmentat, a més del seu paper sobre el metabolisme lipídic, s'ha identificat una altra funció de l'apoA-V amb relació a la resposta de fase aguda en processos inflamatoris. En estudis *in vivo* i en humans, s'ha demostrat que, durant la resposta de fase aguda, hi ha una disminució de l'expressió d'apoA-V, la qual no es correlaciona amb canvis en els nivells de TG plasmàtics [162]. Aquestes dades demostren que l'apoA-V està implicada en altres processos clau en el desenvolupament de la MCV com la inflamació, però que no estan directament relacionats amb el metabolisme lipídic.

4.1.2 APOA5: variabilitat genètica

Des de la seva descoberta, s'ha demostrat àmpliament no només la relació de variants en l'*APOA5* i els nivells de TG en diferents tipus poblacionals (normolipidèmics, dislipèmics, diabètics, etc.), sinó també la seva relació amb altres paràmetres associats a MCV i els seus factors de risc (obesitat, IR, colesterol total, cHDL...).

En caucàsics, les variants de l'*APOA5* s'hereten majoritàriament en tres haplotips: l'haplotip *APOA5**1 és el tipus salvatge o *wild type* (WT) present al 69% de la població; l'*APOA5**2 caracteritzat per l'SNP -1131T>C (rs662799) present en un 4% de la població, i l'*APOA5**3, caracteritzat pel S19W (rs3135506), també present en un 4% de la població [163,164]. Diversos grups han intentat demostrar la funcionalitat d'ambdues variants representants dels haplotips minoritaris d'*APOA5*:

- Rs662799 o -1131T>C: aquest SNP es troba a la regió promotora de l'*APOA5*. Tot i que no s'ha descrit un efecte directe sobre els nivells plasmàtics d'apoA-V, es creu que el seu efecte sobre els TG és causat per l'efecte combinat amb altres SNPs de l'*APOA5* (rs651821, rs2266788 i

rs2072560) o de l'APOC3, amb els quals està en total desequilibri d'unió [165,166]. Cada al·lel rar d'aquesta variant s'ha associat a un increment dels TG plasmàtics de 0.25mmol/L, una probabilitat de patir malaltia coronària arterial de 1.18 cops més alta i de 1.44 cops per l'infart de miocardi [167,168].

- Rs3135506 o S19W: aquest SNP resulta del canvi d'una serina per un triptòfan a la posició d'escissió -5 de la regió del pèptid senyal de l'apoA-V. La variant provoca una reducció de la translocació de l'apoA-V al RE i, per tant, en disminueix els nivells al plasma, cosa que resulta en un increment de TG [165]. L'al·lel rar s'ha associat amb el gruix íntima-media carotídi (com a diagnòstic subclínic d'arteriosclerosi), infart de miocardi i síndrome metabòlica [169–171].

A banda d'aquestes dues principals variants, altres variants rares d'*APOA5* també s'han associat a HTG severes, a un increment del risc d'infart de miocardi i a alteracions del perfil lipoproteic [172–174], la qual cosa denota el paper clau del gen sobre els TG. Aquest fet ha sigut recolzat pels estudis GWAS, ja que han identificat variants d'*APOA5*, com el 724C>G o rs964184, fortament associades a TG i MCV [175,176].

4.1.3 *APOA5*: regulació de l'expressió

Amb relació a l'*APOA5* com a membre del clúster de les apos, s'ha descrit en cèl·lules hepàtiques i intestinals que l'*enhancer* present a la regió promotora d'*APOC3* pot regular de forma específica de cada teixit la transcripció d'*APOC3*, *APOA1* i *APOA4*. Aquesta regulació, però, no afecta el gen *APOA5* [177].

Per altra banda, diversos estudis han identificat receptors nuclears i altres factors de transcripció de resposta a hormones que alteren l'expressió d'*APOA5*. Els receptors nuclears PPAR α (PPAR tipus α), FXR (receptor X farnesoid), ROR (receptor orfe relatiu a RAR), HNF4 (factor nuclear 4 hepàtic) i Nur77 (factor de creixement nervi IB) [149,178–181] i les hormones tiroides T3 [182], s'han associat en estudis *in vitro* a un augment de l'expressió d'*APOA5*. Contràriament, s'ha determinat una disminució de l'expressió de forma dosi dependent d'*APOA5* per la insulina [183], cosa que

concorda amb el fet que els pacients que presenten obesitat o DT2 tenen nivells inferiors d'apoA-V plasmàtics que els individus sans [184].

4.2 PCSK9

L'any 2003 es va identificar el gen *PCSK9*, que codifica pel novè membre de la subfamília de les subtilases; la PCSK9 [185]. S'ha descrit que PCSK9 juga un paper en processos com la regeneració hepàtica, la diferenciació neuronal i infeccions víriques [186–188], però el seu principal rol és com a modulador de l'homeòstasi del colesterol, concretament, sobre el metabolisme de la LDL a través de la degradació del receptor LDLR [185]. Tot i això, i malgrat que és una proteïna clau en referència al control dels nivells de cLDL plasmàtics, seguidament s'exposen els indicis que suggereixen que PCSK9 també podria tenir un paper modulador sobre la resta de lipoproteïnes.

4.2.1 PCSK9: descobriment i mecanisme d'acció

Abifadel M *et al.* van identificar el gen *PCSK9* com a tercer *locus* (després dels gens *APOB* i *LDLR*), associat a la hipercolesterolèmia autosòmica dominant en una família d'origen francès [185]. *PCSK9* és un gen localitzat al cromosoma 1 a la posició 1p32.3, de 25304 parells de bases format per 12 exons i 11 introns, i llur proteïna codificada és de 692 aminoàcids. En humans, *PCSK9* s'expressa, principalment, al fetge, l'intestí prim i al ronyó. Fins a la data, només s'ha descrit la secreció hepàtica de PCSK9 a la circulació, tot i que també s'ha trobat present al fluid cerebroespinal [189] i a les plaques arterioscleròtiques [190].

Com s'ha esmentat anteriorment, la principal funció de PCSK9 és la de modulador del catabolisme de les LDL. Resumidament (*figura 8*): al fetge, PCSK9 se sintetitza com a zimogen al lumen del RE, on pateix una escissió autocatalítica que forma l'enzim madur. Com s'ha explicat, PCSK9 actua com a degradador dels LDLR, fet que es promou tant per via intracel·lular com extracel·lular. La PCSK9 naixent pot unir-se directament al LDLR a l'aparell de Golgi i dirigir-lo directament als lisosomes per a la seva degradació (mecanisme intracel·lular). Per altra banda, la PCSK9 secretada s'uneix al LDLR i, un cop aquest és internalitzat per endocitosi, promou la

degradació lisosomal del complex (revisat a [191] i [192]). Fins a la data, la fisiologia de PCSK9 en altres teixits (com l'intestí prim) no ha estat del tot estudiada (revisat a [193]).

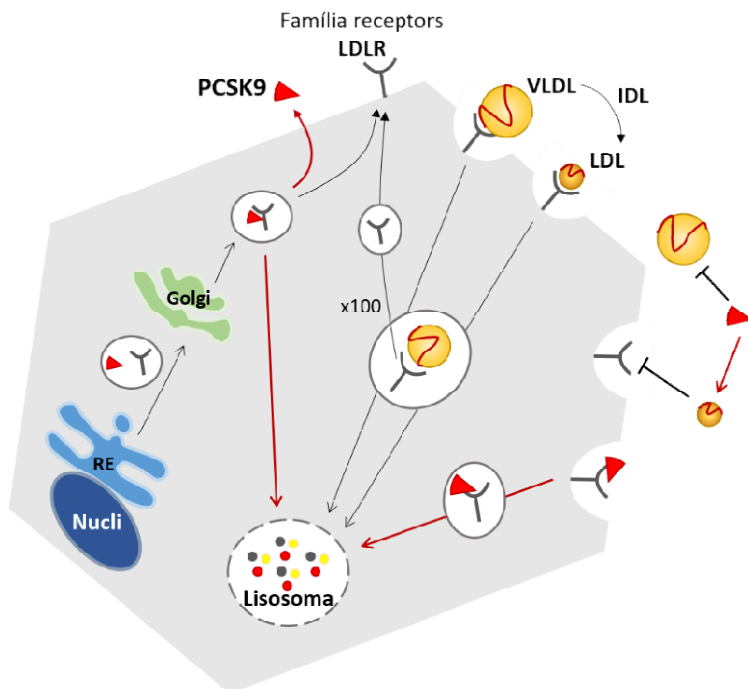


Figura 8. Esquema de la funció de PCSK9 sobre la família de receptors LDLR. Tant PCSK9 com el receptor són sintetitzats al RE. Els receptors de la família dels LDLR són externalitzats a la superfície cel·lular, on s'uneixen a lipoproteïnes (tant VLDL com LDL) i les internalitzen per endocitosis. Un cop internalitzada la vesícula, el receptor es pot dissociar de la lipoproteïna i ser reciclat a la superfície de membrana fins a 100 cops, mentre que la lipoproteïna és degradada al lisosoma. PCSK9 pot interferir en aquest sistema de tres formes: *a*) unint-se al LDLR intracel·lularment i dirigint-lo, un cop emanat de l'aparell de Golgi, directament al lisosoma per a la seva degradació; *b*) unint-se al LDLR extracel·lularment i, un cop aquest és internalitzat, n'evita la dissociació i, finalment, tot el complex es degrada al lisosoma, i *c*) PCSK9 pot unir-se a l'apoB100 present a les LDL (però no a la present a les VLDL) i evitar-ne la unió amb el LDLR i la seva internalització.

PCSK9 és considerat el principal regulador del metabolisme del cLDL en humans pel seu paper modulador sobre els receptors LDL, fet que ha rebut el suport tant d'estudis d'intervenció per a la disminució de cLDL (revisat a

[194]) com d'estudis genètics poblacionals (descrits més endavant en aquesta secció).

A banda, hi ha estudis que relacionen PCSK9 circulant no només amb el cLDL, sinó també amb el metabolisme de les TRL. Tot i que no es coneix amb certesa el mecanisme d'acció pel qual es relacionen, a continuació, es detallen algunes de les evidències:

- Augment de Qm: s'ha demostrat *in vitro/ vivo* que PCSK9 augmenta la síntesi de Qm als enteròcits promovent la captació lipídica, incrementa l'expressió de transportadors com NPC1L1 i CD36 [195] i també la síntesi d'apoB tant a nivell transcripcional com post-transcripcional [196]. Aquest fet podria augmentar la concentració postprandial de romanents de TRL característica de la DA.

- Regulació de la família dels LDLR: s'ha determinat *in vivo* que PCSK9 pot degradar tant el LDLR com altres membres de la seva família, principalment, el receptor de les VLDL (VLDLR) i el tipus 2 de l'APOER (APOER2), cosa que suggereix una connexió entre PCSK9 i l'eliminació de TRL [197]. En la mateixa línia, en models animals s'ha determinat que PCSK9 regula els nivells de VLDLR a la superfície dels adipòcits i, per tant, regula tant l'emmagatzematge com la síntesi *de novo* de TG en aquest teixit [198].

- Prevenició de la degradació d'apoB: models *in vitro/ vivo* suggereixen que part de la PCSK9 circulant internalitzada als hepatòcits s'uneix a l'apoB naixent i en prevé la seva degradació, cosa que, alhora, afavorirà la síntesi de VLDL [199]. Aquests resultats són contraris als d'altres estudis que no troben relació entre PCSK9 i el metabolisme de l'apoB, la qual cosa podria reflectir discrepàncies entre dissenys experimentals.

- Augment de l'acumulació hepàtica de TG: l'estudi de biòpsies de pacients amb fetge gras d'origen no alcohòlic ha determinat que hi ha una correlació positiva entre l'augment dels nivells de PCSK9 circulant i l'emmagatzematge de TG hepàtic, fet que, alhora, contribueix a la severitat de l'esteatosi característica d'aquest tipus de pacients [200].

- Perfil lipoproteic proaterogen: s'ha determinat que, en pacients amb alteracions metabòliques (IR, obesitat, síndrome metabòlica, etc.), hi ha una correlació positiva entre els nivells circulants de PCSK9 i un perfil lipoproteic mesurat per RMN característic de la DA [135].

- Homeòstasi de la glucosa: malgrat que no hi ha una postura clara, alguns estudis remarquen una relació entre nivells circulants de PCSK9, glucosa, insulina i IR [201,202]. Experiments *in vitro/ vivo* han demostrat un augment de PCSK9 en resposta a la insulina [203]. També s'ha descrit que els pacients amb DT2 (hiperinsulinèmics) presenten nivells incrementats de PCSK9 plasmàtica que s'associen, a més, amb un perfil lipoproteic de DA [204].

4.2.2 PCSK9: variabilitat genètica

La variabilitat genètica de *PCSK9* és el major determinant dels nivells de cLDL en humans [205,206]. Ja s'ha descrit que les variants del tipus *GOF* causen hipercolesterolèmia i s'associen a malaltia coronària prematura, mentre que les *LOF* estan associades a nivells baixos de cLDL i són cardioprotectores (revisat a [207–209]). Arran d'aquest descobriment, la investigació sobre el tractament amb inhibidors de PCSK9 per a la disminució del cLDL i el seu benefici cardiovascular s'ha desenvolupat ràpidament [210].

La DA, però, no es caracteritza per nivells anormals de cLDL. Són poques les dades sobre l'impacte de les variants genètiques de *PCSK9* sobre les variables del perfil lipídic lipoproteic diferents dels nivells de cLDL. Malgrat això i tenint en compte la capacitat d'unió de PCSK9 no només amb el LDLR, sinó amb tota la seva família de receptors, l'estudi de la variabilitat genètica de *PCSK9* podria ajudar a desxifrar la relació entre PCSK9 i el metabolisme de les TRL.

4.2.3 PCSK9: regulació de l'expressió

L'expressió de *PCSK9* també està regulada per receptors nuclears, factors de transcripció i estímuls fisiològics (revisat a [211] i [212]). Entre aquests, estudis *in vitro/ vivo* SREBP-1a, SREBP-2, HNF-1 α (receptor nuclear 1 α hepàtic) i PPAR γ (PPAR tipus γ) han demostrat que augmenten l'expressió del PCSK9 [213–215], mentre que FXR i LXR (receptor X hepàtic) la disminueixen [216,217]. En referència a la insulina com a estímul fisiològic clau en el desenvolupament de la DA, s'ha determinat que la insulina promou l'expressió de *PCSK9* (revisat a [203,218]), la qual cosa concorda

amb el fet que els pacients amb DT2 presenten nivells superiors de PCSK9 comparats amb individus control.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

5. Epigenètica de la dislipèmia aterògena

Ja s'ha descrit com canvis tant dels nivells lipídics plasmàtics com del perfil lipoproteic poden induir al desenvolupament de MCV, i també s'ha exposat com tot aquest procés depèn, en part, de la predisposició genètica individual. Es calcula que el coneixement adquirit sobre la predisposició genètica fins ara només en representa una petita part; la resta, aproximadament un 70%, es creu que es podria explicar a través de diferents factors com alteracions estructurals dels gens, epístasi i modificacions epigenètiques entre d'altres [21].

En els últims anys, els estudis han demostrat que les modificacions epigenètiques juguen un paper clau en el desenvolupament de DT2, obesitat o síndrome metabòlica (revisat a [219] i [220]). Malgrat això, no s'ha demostrat com l'epigenètica influeix sobre el desenvolupament de la DA.

5.1 Metilació del DNA i altres modificacions epigenètiques

Les modificacions epigenètiques es caracteritzen per regular l'expressió dels gens sense afectar la seqüència genòmica, ja sigui a nivell transcripcional com posttranscripcional. Les tres principals modificacions epigenètiques (*figura 9*) són la metilació del DNA (que és la més estudiada), les modificacions a les histones i la regulació posttranscripcional mitjançada pels microRNAs (miRNAs).



Figura 9. Esquema de les principals modificacions epigenètiques.

La metilació del DNA es basa en l'addició d'un grup metil al cinquè carboni de les citosines, procés clau en el desenvolupament dels mamífers i la funcionalitat normal en adults. En humans, la major part de la metilació es localitza en els dinucleòtids CG (CpG), malgrat que també s'ha demostrat la metilació en els dinucleòtids CA en una proporció ínfima. Les DNA metil-transferases (DNMT) estableixen i mantenen la metilació del DNA; la DNMT3A i la DNMT3B s'encarreguen de la metilació *de novo* del DNA, mentre que la DNMT1 és l'encarregada del manteniment de l'estat de metilació [221,222].

Les CpG estan poc representades al llarg del genoma i entre el 60-80% acostumen a estar metilades. Menys del 10% de les CpG es troben en regions petites (de 0.3-3kb) amb una alta densitat de CpG, les anomenades illes CpG (ICG). Al voltant del 40% dels gens contenen ICG al seu promotor (regions d'inici de la transcripció) o al cos del gen (regions de regulació de la conformació de la cromatina), que, contràriament a les CpG localitzades en altres regions genòmiques, sovint estan hipometilades [223,224]. Normalment, la metilació del DNA s'associa a una compactació de la cromatina i, per tant, a una repressió de l'expressió gènica.

La conformació de la cromatina, però, no només depèn del grau de metilació del DNA, sinó també de les modificacions a les histones. Cada 146 parells de bases de DNA s'enrotllen al voltant de les histones H2A, H2B, H3 i H4 formant, juntament amb l'H1, el nucleosoma [225]. La promoció o repressió de l'expressió gènica es regula mitjançant modificacions (metilacions, acetilacions i fosforilacions) a les regions N-terminal de les cues de les histones [226,227] (*figura 9*).

Les modificacions a les histones poden resultar en diferents conseqüències transcripcionals en funció del residu modificat i de la histona que es modifiqui. Per exemple, s'ha descrit que, a la H3, la metilació de la lisina 4 s'associa a promotors i *enhancers* actius; la metilació de la lisina 36 s'associa a l'expressió genètica i, en canvi, la metilació de la lisina 27 s'associa a un estat repressiu de la cromatina [228].

Finalment, els miRNA poden regular l'expressió gènica de forma posttranscripcional a través dels elements de reconeixement de miRNA

(MRE) que es troben a l'extrem 3'UTR dels seus RNA missatgers (mRNA) diana (*figura 9*).

Breument, els miRNA són cadenes petites de RNA codificats en gens altament regulats. Aquests gens codificants transcriuen miRNA primaris, els quals són exportats del nucli al citoplasma, on són processats per una RNAsa, anomenada *Dicer*, que genera els miRNA madurs. Els miRNA madurs s'uneixen al complex proteic RISC (complex inductor del silenci del RNA), que serà l'encarregat del silenciament gènic. El complex RISC-miRNA s'uneix als MRE afavorint la desestabilització i degradació del mRNA diana, en el cas que la unió sigui complementàriament perfecta, o, la disminució de la traducció del mRNA diana, quan la complementarietat de la unió és parcial (revisat a [229]).

La regió més important de la unió del complex miRNA-mRNA són 7-9 parells de bases als MRE anomenats *seed site* (MRESS) [230], ja que l'efectivitat de la unió depèn de característiques fisicoquímiques del MRESS [231].

5.2 Regulació epigenètica de gens implicats en el metabolisme lipídic

Tot i que no hi ha estudis que relacionin modificacions epigenètiques amb la DA o les seves característiques lipídiques, alguns autors han evidenciat com diverses modificacions epigenètiques en gens clau del metabolisme lipídic es correlacionen amb els nivells plasmàtics lipídics i lipoproteics en pacients amb MCV. Per exemple, la metilació del promotor del gen *LPL* està positivament correlacionada amb el cHDL i la mida de les partícules HDL, mentre que la correlació és inversa en la metilació del promotor de *CETP* i *ABCA1* [30,232].

També s'han descrit casos en els quals les modificacions epigenètiques interaccionen amb la variabilitat genètica i alteren els nivells lipídics. Per exemple, l'apoE presenta tres isoformes ($\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$) determinades pel genotip de dos SNPs del gen *APOE* (rs429358 i rs7412), les quals estan localitzades a la ICG de l'exó 4 del gen. S'ha demostrat que ambdues variants poden crear/destruir llocs CpG, i, per tant, provocar canvis en el grau de metilació del gen. A més, el grau de metilació d'*APOE* s'ha associat

positivament als nivells plasmàtics de colesterol total [233]. Un altre cas es dona al gen *LPL*, on s'ha determinat que el rs13702 localitzat a l'extrem 3'UTR modula els nivells lipídics a través de la modificació de la MRESS del miRNA-410 [234].

Tal com s'ha fet en l'apartat anterior, en aquesta tesi ens centrarem a exposar les modificacions epigenètiques que s'han descrit en els dos gens d'estudi: l'*APOA5* i el *PCSK9*.

5.2.1 Regulació epigenètica d'*APOA5*

En els últims anys, la recerca referent a com les modificacions epigenètiques sobre l'*APOA5* poden influenciar tant el perfil lipídic com el risc de patir malalties com la DT2 o l'obesitat ha començat a generar resultats.

Diversos EWAS, realitzats tant en cèl·lules circulants com en teixit adipós, han identificat una regió de metilació de caràcter quantitatiu (mQTL) al promotor de l'*APO5*. Llurs canvis del grau de metilació s'associen a canvis en els nivells de TG circulants, lipèmia postprandial, obesitat i DT2 [32,235,236]. Aquesta mQTL de l'*APOA5* ha sigut identificada com Cg12556569 i està localitzada 332 parells de bases *upstream* del rs662799 (variant característica de l'*APOA5*2*) [235].

S'ha explicat però, que la variabilitat de la metilació a Cg12556569 està altament associada a l'SNP identificat per GWAS 724C>G de l'*APOA5* [235,237]. Es creu que l'al·lel C del 724C>G indueix, d'alguna forma, alts nivells de metilació a Cg12556569, els quals podrien estar associats a baixos nivells d'expressió d'*APOA5*, fet que podria contribuir a un mal funcionament del metabolisme lipídic i a l'acumulació de TRL.

Com s'ha esmentat anteriorment, la metilació del DNA pot variar en resposta a estímuls externs com la dieta, l'exercici o els fàrmacs. En aquest cas, s'ha determinat que els canvis lipídics deguts al tractament amb fenofibrats per a la HTG no s'associen a canvis en el patró de metilació de l'*APOA5* [238].

Paral·lelament, estudis *in vitro/ vivo* també han demostrat que variants genètiques en l'*APOA5* influencien la regulació epigenètica posttranscripcional. L'any 2014 Caussy *et al.* van demostrar en cèl·lules hepàtiques d'origen humà que l'al·lel comú de l'SNP rs2266788, localitzat a l'extrem 3'UTR del gen (el qual pertany a l'haplotip *APOA5*2* i està fortament associat a nivells plasmàtics alts de TG), crea un lloc d'unió per al miRNA-485-5p [239]. Per mitjà d'estudis funcionals, es va determinar que aquesta unió miRNA-*APOA5* propicia la repressió de l'expressió del gen. Per altra banda, aquell mateix any, un altre grup va provar en individus asiàtics que l'al·lel rar del rs2266788 destrueix el lloc d'unió per al miRNA-3201, la qual cosa resulta amb un augment de la vida mitjana del mRNA d'*APOA5*, que n'incrementa els nivells d'expressió [240].

5.2.2 Regulació epigenètica de *PCSK9*

Molt poc s'ha determinat sobre el control epigenètic de *PCSK9*. Tot i això, els escassos estudis publicats fins a la data deixen entreveure que *PCSK9* sí que està sotmès al control epigenètic:

- En ratolins i com a resposta a una dieta alta en greix, se sobreexpressa Sirt6 (una desacetilasa d'histones). S'ha demostrat que Sirt6 és reclutada per factors de transcripció a la regió promotora de *Pcsk9*, on desacetila les lisines 9 i 56 de la H3. Aquesta modificació a la cua de la histona propicia la supressió de l'expressió del gen i la disminució dels nivells de cLDL circulants [241].
- El rs17111557 localitzat a la regió 3'UTR de *PCSK9* està associat al cHDL en població normolipèmica. S'ha predit *in silico* que l'al·lel T d'aquesta variant podria crear un lloc d'unió per al miRNA-548t, i aquest modificaria l'expressió del gen [242]. No hi ha estudis *in vitro/ vivo* que confirmin aquesta hipòtesi.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Hipòtesi i objectius

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

HIPÒTESI

Els factors genètics i epigenètics, sols o combinats, ens poden ajudar a entendre els mecanismes que regulen la predisposició genètica a la dislipèmia relacionada amb malalties complexes com la diabetis tipus 2, la síndrome metabòlica o, inclús, la diabetis tipus 3, característica de l'Alzheimer.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Objectius

Els objectius proposats per comprovar aquesta hipòtesi són:

1. Determinar el patró metilació del clúster *APOA1/C3/A4/A5* en diferents teixits i comprovar el seu efecte sobre l'expressió del clúster en cèl·lules intestinals.
2. Determinar si l'efecte de la variabilitat genètica i els patrons de metilació de gens candidats sobre els lípids i el perfil lipoproteic actuen de forma conjunta o no en pacients amb diabetis tipus 2 o síndrome metabòlica:
 - 2.1 Estudi del gen *APOA5*: determinar l'efecte de les variants -1137T>C, S19W i 724C>G i tres regions de metilació del gen.
 - 2.2 Estudi del gen *PCSK9*: determinar l'efecte de la variabilitat genètica total i de dues regions de metilació de gen.
3. Determinar si variants que predisposen a malalties de deteriorament cognitiu influeixen també sobre el perfil lipídic i lipoproteic en pacients amb diabetis tipus 2, síndrome metabòlica o diabetis tipus 3.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

RESUM DE RESULTATS I ARTICLES

En aquest apartat es resumeixen els resultats dels 4 articles que formen aquesta tesi. D'aquests articles, dos ja estan publicats (*Atherosclerosis* 2014; *Clinical Science* 2016) i dos més es troben en procés de revisió. Davant de cada article hi ha un resum d'aquest. De forma esquemàtica, els resultats obtinguts en aquesta tesi són:

- Els promotors dels gens *APOA1*, *APOC3* i *APOA5* presenten un grau de metilació inferior al fetge que en altres teixits. En canvi, el gen *APOA4* està parcialment metilat al fetge i l'intestí, mentre que està altament metilat en altres teixits.
- El tractament amb agents desmetilants disminueix entre el 24-37% el grau de metilació del clúster *APOA1/C3/A4/A5* i augmenta l'expressió d'*APOA1*, *APOA4* i *APOA5* entre un 22-600% en cèl·lules intestinals.
- El promotor i la ICG de l'exó 3 d'*APOA5* estan hipermetilats, mentre que l'exó 2 està hipometilat en leucòcits de pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.
- El grau de metilació de la ICG de l'exó 3 d'*APOA5* correlaciona positivament amb els nivells de TG plasmàtics i amb un perfil lipoproteic característic de dislipèmia aterògena en pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.
- Ser portador de qualsevol de les variants S19W, -1131T>C i/o 724C>G d'*APOA5* s'associa a un increment de TG del 57.5% en comparació dels WT.
- Els polimorfismes i la metilació de la ICG d'*APOA5* actuen de forma conjunta, ja que els portadors de S19W, -1131T>C i/o 724C>G amb una metilació $\geq 82\%$ a la ICG presenten 2.35 cops més TG que els WT amb nivells de metilació inferiors.
- El promotor de *PCSK9* està hipometilat, mentre que l'intró 10 està hipermetilat en leucòcits de pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.
- El grau de metilació de la quarta citosina estudiada del promotor de *PCSK9* (CpG4) està positivament correlacionada amb la concentració de partícules LDL totals, mitjanes i petites. A més, el fet de presentar nivells

de metilació inferiors al 14% en aquesta citosina s'associa a una disminució del 10% del colesterol, un 14% menys en les LDL totals i una disminució del 19% en les LDL mitjanes i petites en pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.

- Els portadors dels polimorfismes rs540796 o rs483462 de *PCSK9* presenten disminucions del 30% i 35% en els nivells de TG respectivament, i una disminució mitjana del 40% en la concentració de VLDL (totals, grans, mitjanes i petites) en comparació dels WT.

- Els portadors dels polimorfismes rs540796 o rs483862 estan un 20% més representats en el tercil més baix dels nivells de TG i de concentració de VLDL grans en comparació del tercil més alt.

- Els portadors de la variant R46L (rs11591147) de *PCSK9* presenten una disminució del 25%, 20% i 45% en els nivells plasmàtics de cLDL, d'ApoB i de *PCSK9*, respectivament. A més, també presenten una disminució mitjana del 30% en el nombre de partícules LDL totals, mitjanes i petites.

- Les 5 variants associades als nivells de colesterol dels RLP en pacients amb deteriorament cognitiu són el rs3025786 (gen *PSEN1*), el rs27023435 (gen *PVRL2*), el rs1789072 (gen *DSC1*), el rs3788428 (gen *PLA2G3*) i el rs1049296 (gen *TF*).

- Els portadors de rs3025786 presenten una disminució del 25% de TG i 40% menys de partícules VLDL i les seves subfraccions (grans, mitjanes i petites) en comparació dels WT en una població amb DT2 o síndrome metabòlica.

- Els portadors de rs27023435 presenten una disminució del 25% en el nombre de partícules VLDL i les seves subfraccions (grans, mitjanes i petites) en comparació dels WT en una població amb DT2 o síndrome metabòlica.

- Els portadors de rs1789072 presenten un increment del 27% de colesterol, 38% de cLDL i un 30% més de partícules LDL i les seves subfraccions més petites (mitjanes i petites) en comparació dels WT en una població amb DT2 o síndrome metabòlica.

- Els portadors del rs3788428 presenten nivells un 7% més baixos del gruix íntima-media carotídi i estan un 10% més representats en els individus sense presència de placa carotídi en comparació dels WT en una població amb DT2 o síndrome metabòlica.
- El rs1049296 no s'associa a variables lipídiques, del perfil lipoproteic o relacionades amb l'arteriosclerosi subclínica en pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Tissue-specific DNA methylation profiles regulate liver-specific expression of the APOA1/C3/A4/A5 cluster and can be manipulated with demethylating agents on intestinal cells.

Montse Guardiola, Iris Oliva, Amy Guillaumet, Álex Martín-Trujillo, Roser Rosales, Joan-Carles Vallvé, Fàtima Sabench, Daniel del Castillo, Silvio Zaina,
David Monk *and* Josep Ribalta.

Atherosclerosis, 237 (2014) 528-535

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Diversos estudis en humans han determinat el paper clau del clúster *APOA1/C3/A4/A5* sobre el metabolisme lipídic. Com s'ha explicat a l'apartat 4, el clúster de l'*APOA1/C3/A4/A5* presenta una expressió hepàtica i intestinal molt diferenciada. Per altra banda, s'ha determinat que l'expressió específica dels gens és deguda a processos epigenètics, com la metilació del DNA, que controlen l'accessibilitat al DNA dels factors de transcripció i la compactació de la cromatina. Tenint en compte aquestes dades, era lògic pensar que l'expressió depenent de teixit del clúster es devia a elements reguladors com els factors epigenètics.

La hipòtesi d'aquest estudi, doncs, va ser que l'expressió depenent de teixit del clúster *APOA1/C3/A4/A5* seria inversa al nivell de metilació del DNA, i que la repressió en teixits amb una expressió molt baixa (com en l'intestí) es podria invertir amb fàrmacs desmetilants. Es van analitzar els patrons de metilació del clúster en mostres de DNA de diferents teixits humans (fetge, intestí, leucòcits, cervell, ronyó, pàncrees, múscul i esperma) utilitzant l'*Infinium HumanMethylation450 BedChip array*. Els patrons de metilació es van confirmar per PCR amb bisulfit i piroseqüenciació. Per determinar si el patró específic de metilació es correlacionava amb l'expressió del clúster, vam exposar cèl·lules TC7/Caco-2 intestinals al fàrmac desmetilant 5-Aza-2'-deoxi-citidina i vam avaluar la re-expressió intestinal del clúster mitjançant RT-qPCR.

Els resultats van determinar que els promotors de l'*APOA1*, *APOC3* i *APOA5* estaven menys metilats en el fetge en comparació d'altres teixits, mentre que el promotor de l'*APOA4* estava altament metilat en la majoria de teixits i només parcialment en fetge i intestí. En les cèl·lules TC7/Caco-2, el tractament amb 5-Aza-2'-deoxi-citidina va induir a una disminució entre el 24-37% en els nivells de metilació del clúster *APOA1/C3/A4/A5* i una concomitant reexpressió dels gens entre el 22 i el 600%.

CONCLUSIÓ: Els patrons de metilació del clúster *APOA1/C3/A4/A5* específics de teixit podrien estar directament relacionats amb la regulació de l'expressió d'aquest clúster. Per altra banda, la desmetilació del DNA en cèl·lules intestinals augmenta especialment els nivells de RNA dels gens *APOA1*, *APOA4* i *APOA5*.



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Tissue-specific DNA methylation profiles regulate liver-specific expression of the *APOA1/C3/A4/A5* cluster and can be manipulated with demethylating agents on intestinal cells



Montse Guardiola^a, Iris Oliva^a, Amy Guillaumet^b, Àlex Martín-Trujillo^b, Roser Rosales^a, Joan Carles Vallvé^a, Fátima Sabench^c, Daniel del Castillo^c, Silvio Zaina^{d,e}, David Monk^b, Josep Ribalta^{a,*}

^a Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, Spain

^b Imprinting and Cancer Group, Epigenetics and Cancer Biology Program (PEBC), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), Barcelona, Spain

^c Unitat de Recerca en Cirurgia, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Spain

^d Cancer Epigenetics Group, Epigenetics and Cancer Biology Program (PEBC), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), Barcelona, Spain

^e Department of Medical Sciences, Division of Health Sciences, León Campus, University of Guanajuato, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2014

Received in revised form

17 October 2014

Accepted 19 October 2014

Available online 22 October 2014

Keywords:

Apolipoproteins

Genetics

Gene expression

Lipoproteins/metabolism

Intestine

ABSTRACT

Objective: The tissue-specific expression profiles of genes within the *APOA1/C3/A4/A5* cluster play an important role in lipid metabolism regulation. We hypothesize that the tissue-specific expression of the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster will show an inverse pattern with DNA methylation, and that repression in non- or low-expressing tissue, such as the intestine, can be reversed using epigenetic drugs. **Methods and results:** We analyzed DNA samples from different human adult tissues (liver, intestine, leukocytes, brain, kidney, pancreas, muscle and sperm) using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. DNA methylation profiles in *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster were confirmed by bisulfite PCR and pyrosequencing. To determine whether the observed tissue-specific methylation was associated with the expression profile we exposed intestinal TC7/Caco-2 cells to the demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine and monitored intestinal *APOA1/C3/A4/A5* transcript re-expression by RT-qPCR. The promoters of *APOA1*, *APOC3* and *APOA5* genes were less methylated in liver compared to other tissues, and *APOA4* gene was highly methylated in most tissues and partially methylated in liver and intestine. In TC7/Caco-2 cells, 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induced a decrease between 37 and 24% in the methylation levels of *APOA1/C3/A4/A5* genes and a concomitant re-expression mainly in *APOA1*, *APOA4* and *APOA5* genes ranging from 22 to 600%. **Conclusions:** We have determined the methylation patterns of the *APOA1/C3/A4/A5* cluster that may be directly involved in the transcriptional regulation of this cluster. DNA demethylation of intestinal cells increases the RNA levels especially of *APOA1*, *APOA4* and *APOA5* genes.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plasma lipid levels are a major susceptibility factor for cardiovascular disease, for which both genetic and environmental factors determine plasma lipid levels [1]. The gene products encoded by

the Apolipoprotein AI-CIII-AIV cluster on chromosome 11q23-24 are important regulators of lipid metabolism. Defined mutations in this cluster significantly affect plasma lipid profiles in both humans and mice.

The *APOA1/C3/A4* genes are located within an interval of ~17 kb. The full extent of the cluster was determined when the human *APOA5* transcript was identified in 2001 by comparative sequencing between mouse and humans. This revealed that the *APOA1/C3/A4/A5* cluster is ~44 kb in size [2].

The *APOA1* gene is predominantly expressed in the liver, but it is also produced in the intestine. It is seen to be protective against atherosclerosis as a result of its major role in high-density lipoproteins and reverse cholesterol transport [3,4] because plays a

* Corresponding author. Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain.

E-mail addresses: montse.guardiola@urv.cat (M. Guardiola), iris.oliva@urv.cat (I. Oliva), aguillaumet@idibell.cat (A. Guillaumet), amartint@idibell.cat (À. Martín-Trujillo), rosar.rosales@urv.cat (R. Rosales), jc.vallve@urv.cat (J.C. Vallvé), fatima.sabench@urv.cat (F. Sabench), daniel.del.castillo@urv.cat (D. Castillo), szaina@ugto.mx (S. Zaina), dmonk@idibell.cat (D. Monk), josep.ribalta@urv.cat (J. Ribalta).

critical role in the first step of reverse cholesterol transport by enhancing the sterol efflux from macrophages. Thus, a severe deficiency of apoA1 increases cardiovascular risk both in humans and mice [5]. In contrast, overexpression of apoA1 in transgenic mice increased HDL levels and consistently reduced cardiovascular disease [6]. ENCODE RNA-seq datasets (as visualized on the UCSC sequence browser; <http://genome.ucsc.edu>) have revealed that the APOC3 gene has a similar tissue distribution to APOA1, being primarily expressed in the liver and secreted into plasma. ApoCIII protein is strongly linked to triglyceride metabolism. It is transported in very low-density lipoprotein (VLDL), which inhibits both lipoprotein lipase and hepatic lipase, delaying catabolism of triglyceride-rich particles [7–9], also by attenuating the uptake of triglyceride-rich remnant lipoproteins by the liver [10,11]. The APOA4 gene is produced in epithelial cells mainly from jejunum and to a less extent from the ileum [12,13]. The synthesis and secretion of apoAIV is stimulated by fat absorption [14,15]. It is secreted mainly in chylomicrons and can be transferred to VLDL and HDL particles. It is a potent activator of lecithin-cholesterol acyltransferase and has been suggested to influence chylomicron assembly [16,17]. Lastly, the newest member of the APOA1/C3/A4 gene cluster, APOA5, is implicated in regulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis [18]. Several studies have shown that APOA5 deficiency results in hypertriglyceridemia. Accordingly, the *ApoA5* mouse knock-out demonstrates an inverse relationship between gene expression and plasma TG [2]. In humans there are rare mutations in APOA5 (such as Q148X, Q139X) [19,20] causing a premature truncation of the protein associated with Type I and V lipoprotein phenotypes or familial hypertriglyceridemia. These disorders are mainly characterized by plasma accumulation of triglyceride-rich particles, chylomicrons alone or chylomicrons and VLDL, both in the fasting and postprandial state.

Thus the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster is dominantly expressed in liver and intestine, but the expression of these genes display distinct hepatic and intestinal specificity. Clearly the tissue-specific expression profiles of genes within the APOA1/C3/A4/A5 cluster play an important role in the regulation of these key genes in lipid metabolism. The expression rate or the tissue specific expressions of genes organized in clusters may require elements like enhancers; complex interactions between nuclear receptors and other factors such as hormone response elements; or certain conditions involving chromatin structure or epigenetic markers [21].

In the case of the APOA1/C3/A4/A5 cluster it is well-known that the APOC3 enhancer located 590–790 nucleotides upstream the APOC3 gene, controls the expression of APOA1, APOC3 and APOA4 both in liver and intestine [22]. Meanwhile the activity of the APOC3 enhancer is influenced by nuclear factors like SP1 or HNF4. APOA5 gene promoter is also recognized by similar nuclear receptors such as HNF4, ROR α , FXR, LXR or PPAR α [23–27] modulating its expression and activity. Finally, the reported tissue-specific expression of these transcripts is likely to be also the result of epigenetic processes governing DNA accessibility to transcription factor binding and chromatin compaction. At a chromatin level it has been shown that, thanks to histone modifications, the APOC3 enhancer maintains an active chromatin subdomain in the cluster facilitating the enhancer to reach the APOA1, APOC3 and APOA4 gene promoters [28]. Another epigenetic mark such as cytosine methylation of CpG dinucleotides of DNA, can be influenced by environmental factors and regulate gene expression levels in response to external stimuli [29].

For that, we hypothesize that the tissue-specific expression of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster will show an inverse pattern with DNA methylation, and that repression in non- or low-expressing tissue, such as the intestine, can be reversed using epigenetic drugs,

which may have potential implications for the prevention and treatment of hypertriglyceridemia.

2. Materials and methods

2.1. Determination of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster methylation profile

2.1.1. Control tissue biopsies for Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array

Normal tissues were obtained from the Bellvitge Institute for Biomedical Research Tissue Bank. Peripheral blood from health individuals were collected from adult volunteers aged between 19 and 40 years old. DNA was extracted using the DNeasy blood & tissue kit, following the manufacturer's instructions (Qiagen, Madrid, Spain). Ethical approval for adult blood and the use of archived tissues was granted by the IDIBELL Ethics Committee (PR251/12).

2.1.2. Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array analysis

We analyzed publically available methylomes for different tissues (3 intestine, 2 leukocytes, 2 brains and an individual samples for kidney, pancreas, muscle and sperm) generated using the Illumina high-density Infinium HumanMethylation450 BeadChip array [30]. The data can be retrieved from the Gene Expression Omnibus accession number GSE46698. In addition, Infinium array results for 10 liver DNA samples were from the TCGA control dataset.

2.1.3. Data filtering and analysis

Before analyzing the Infinium array data, we excluded possible sources of technical biases that could influence results. We applied signal background subtraction and inter-plate variation was normalized using default control probes in BeadStudio (version 2011.1_Infinium HD). We discarded probes with a detection *p*-value >0.01. We also excluded probes that lack signal values in one or more of the DNA samples analyzed. In addition we discarded 16,631 probes as they contained SNPs present in more than 1% of the population (dbSNP 137). We utilized in-house R-package scripts evaluate the methylation of the probes mapping within the chr11:116,659,700–116,709,600 region. The heat maps used to display the DNA methylation profiles of the various tissue types were generated using the Illumina BeadStudio Data Analysis Software Module.

2.2. APOA1/C3/A4/A5 gene cluster methylation profile confirmation experiment

2.2.1. Patient material

Biopsies of hepatic and intestinal tissue were obtained from a patient undergoing bariatric surgery. The surgical procedure was performed at the Surgery service of University Hospital of Sant Joan (Reus, Spain). The sample of small intestine (jejunum) was obtained from a Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass. The section of the jejunum is performed at 80 cm from the ligament of Treitz (linear stapler of 45 mm/staples 2.5 mm). Alimentary limb: 100 cm. The gastrojejunal anastomosis is performed by a circular device of 25 mm (EEAorvill 25, Covidien®). The proximal portion of the mechanical circular anastomosis is inserted transorally through its distal fixation to an orogastric tube. This anastomosis produces a portion of tissue that allowed us to obtain the sample. At the end of the surgery, a liver biopsy (1 × 1 × 1 cm³) is routinely performed. A written informed consent was obtained for this purpose. Tissue samples were stored at –80 °C until we did the DNA extraction.

2.2.2. Bisulfite PCR and sequencing

Approximately 1 µg DNA was subjected to sodium bisulfite treatment and purified using the EZ GOLD methylation kit (ZYMO, Orange, CA). Bisulfite specific primers for each region were used with Hotstar Taq polymerase (Qiagen, West Sussex, UK) for 45 PCR cycles. All PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, UK) with a minimum of 12 clones were selected for sequencing. All primers for bisulfite PCR can be found in [Supplementary Table](#).

2.2.3. Methylation pyrosequencing

Standard bisulfite PCR was used to amplify regions of interest with the exception that one primer was biotinylated. The entire biotinylated PCR product (diluted to 40 µl) was mixed with 38 µl of Binding buffer and 2 µl (10 mg/ml) streptavidin-coated polystyrene beads. Bead-amplicon complexes were captured on a vacuum prep tool (Qiagen) and the PCR products denatured using 0.2 M NaOH. The denatured DNA was resuspended in 40 µmol of sequencing primer dissolved in 12 µl water and primers annealing was

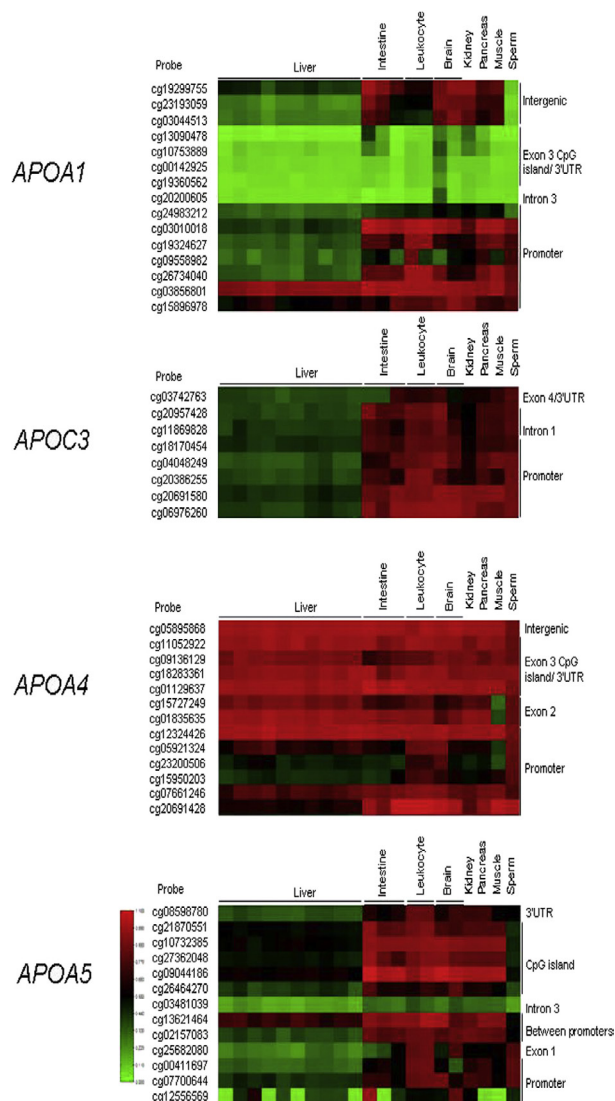


Fig. 1. Heat maps in 51 probes from Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array mapping the promoter and intergenic regions in *APOA1/C3/A4/A5* cluster genes in human tissue DNA samples. The color code corresponds to absolute methylation beta-values (0 = completely unmethylated; 1 = methylated). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

achieved by heating the sample to 80 °C for 2 min before cooling to room temperature. For sequencing, an internal primer was designed to the complementary strand. The Pyrosequencing reaction was carried out on a PyroMark Q96 instrument. The peak heights at C/T variants of CpG dinucleotides were determined using the Pyrosequencing commercial software (Biotage). All primers for bisulfite PCR can be found in [Supplementary Table](#).

2.3. Demethylation of APOA1/C3/A4/A5 genes in intestinal cell culture

2.3.1. Cell culture and 5-Aza-CdR treatments

The human colon carcinoma TC7, a clonal derivative of the Caco-2 cell line was obtained from Eucellbank (Barcelona,

Spain). The cells were passaged using standard cell culture techniques at 37 °C/5% CO₂ in Dulbecco's modified medium supplemented with 20% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies, Madrid, Spain). Growing cells were exposed to 1 µM of 5-Aza-CdR in duplicate cultures with the supplemented media changes every 24 h over a period of three days. After treatments the cells were pelleted and snap frozen for DNA and RNA extract.

We evaluated medium cytotoxicity by Cytotoxicity detection kit (LDH) (Roche Applied Science, Barcelona, Spain) and our results showed optimal conditions for cells.

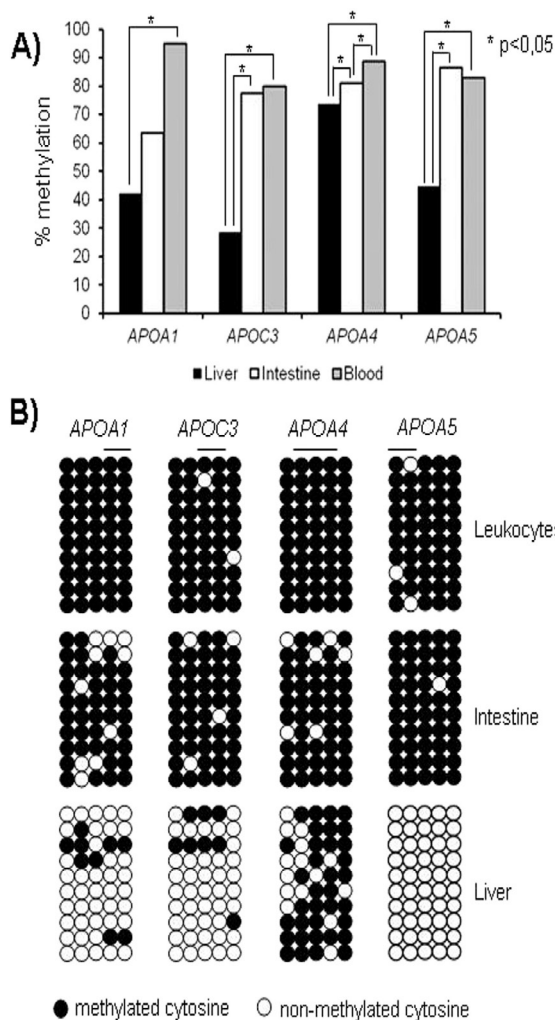


Fig. 2. Panel A: Methylation levels, as revealed by pyrosequencing, for APOA1, APOC3, APOA4 and APOA5 genes in human leukocytes ($n = 2$), liver ($n = 2$) and intestine ($n = 2$) DNA samples. Experiments were performed in duplicate and the pyrosequencing in triplicate. **Panel B:** Confirmation of methylation pattern by bisulfite PCR of amplicons targeting APOA1, APOC3, APOA4 and APOA5 promoters in human leukocyte, liver and intestine DNA samples. White circles indicate unmethylated cytosine and black circles indicate methylated cytosine. The line represents the CpG dinucleotides analyzed by pyrosequencing. At least two samples were subject to bisulfite PCR and cloning to ensure representative methylation profiles were obtained, but only one is shown.

2.3.2. RNA expression

To test whether DNA demethylation increased the gene expression, we extracted total RNA from TC7/Caco-2 cells in a 6100 Nucleic Acid PrepStation (Life Technologies, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions. We performed retro-transcriptase PCR using Random Hexamers and SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Madrid, Spain), and mRNA abundance was determined using real time-PCR utilizing Taqman Mastermix and Gene Expression Assays (Life Technologies, Madrid, Spain) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Madrid, Spain). Relative results of mRNA expression were determined by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User bulletin n°2. Revision A. Foster city [CA]: Applied Biosystems, 1997) using *GAPDH* gene expression as endogenous control because in previous studies it showed high consistency [31].

2.4. Statistical analysis

The RNA levels of the *APOA1/C3/A4/A5* transcripts in TC7/Caco-2 cells incubated with 5-Aza-CdR were statistically evaluated using the analysis of variance (ANOVA) test to compare the effects of the different concentrations. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The statistical package used was SPSS 19.0.

3. Results

3.1. DNA methylation of the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster determined by high-density arrays

To determine the tissue-specific methylation profiles of the interval containing the *APOA1/C3/A4/A5* cluster (chr11: 116,659,700–116,709,600) we analyzed datasets derived from numerous human tissues utilizing the Illumina Infinium Human-Methylation450 Beadchip arrays. This platform contains 51 probes mapping to the interval and were located within the promoter and intergenic regions. The resulting heat maps for each of the genes reveals that the locus is essentially hypermethylated in non-expressing tissues (intestine, leukocytes, brain, kidney, pancreas and muscle) but showed unique unmethylated regions in liver (Fig. 1). The promoters of the *APOA1*, *APOC3* and *APOA5* genes are all unmethylated in liver compared to other tissues, consistent with the predominant liver-specific expression profile. These profiles were confirmed using quantitative pyrosequencing. With this particular probe set, the *APOA4* gene is highly methylated in most tissues (>80%), with partial methylation (~69–74%) overlapping the promoter interval in liver and intestine (Fig. 2).

3.2. Confirmation of the DNA methylation profiles using bisulfite PCR

We performed bisulfite PCR and Sanger sequencing of individual DNA strands to confirm the methylation patterns observed at promoter regions of each gene.

The PCR amplicon targeting *APOA1* was located ~50 bp upstream of the transcription start site (TSS). This region was unmethylated in liver and fully methylated in leukocyte- and intestine-derived DNA samples consistent with the methylation of the cg09558982 and cg25734040 Infinium probes. The regions analyzed ~20 bp upstream of the *APOC3* promoter and within intron 1 of *APOA5* were also unmethylated in liver, but methylated in other tissues consistent with the Infinium array profiles for probes cg20957428, cg11869828, cg18170454, cg04048249 and cg02157083, respectively. Lastly, a 180 bp amplicon situated ~120 bp from the *APOA4* TSS was partially demethylated in liver and intestine DNA, but completely methylated in leukocyte derived-DNA samples (Fig. 2).

3.3. Intestinal *APOA1/C3/A4/A5* gene re-expression after induced demethylation

To determine if the DNA methylation observed in non-hepatic tissues was associated with the silencing of the *APOA1/C3/A4/A5* genes, we exposed the TC-7/Caco-2 intestinal cell line to 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) treatment for 3 days. To evaluate genome-wide methylation changes after treatment, we evaluated methylation changes at the DNA repetitive elements SINE (ALU-Yb8) and LINE-1, as well as α -satellites using pyrosequencing-based assays. These regions are common used as a surrogate marker for assessing global hypomethylation [32]. The TC7/Caco-2 cells had high methylation levels at ALU-Yb8 (>88%) and partial methylation

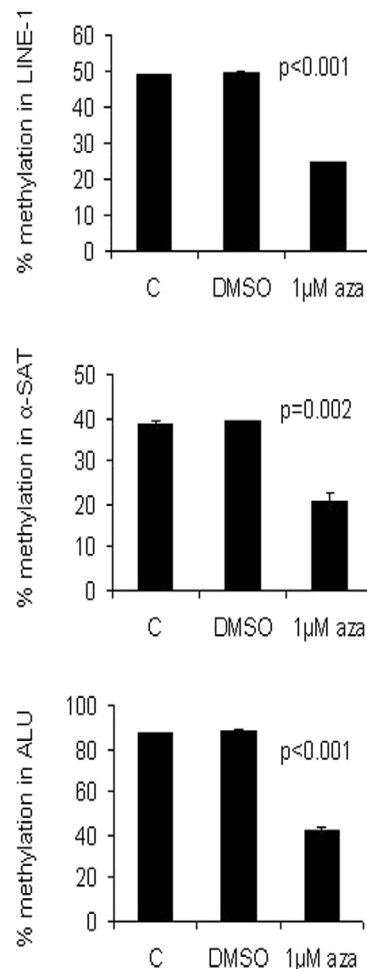


Fig. 3. Methylation levels of the DNA repetitive elements SINE (ALU-Yb8), LINE-1 and α -satellites in TC7/Caco-2 intestinal cells after 1 μ M 5-Aza-CdR treatment for 3 days. C: control TC7/Caco-2 cells not incubated with 5-Aza-CdR; DMSO: TC7/Caco-2 cells incubated with DMSO used as the vehicle for 5-Aza-CdR; 1 μ M aza: TC7/Caco-2 cells incubated with 1 μ M 5-Aza-CdR. P value correspond to comparison between C and 1 μ M aza conditions. We performed three independent experiments and the conditions were performed in duplicate. The pyrosequencing was done in triplicate.

(38–49%) at α -satellites and LINE-1 prior to treatment. The methylation at the latter two elements was slightly lower than expected for normal intestinal tissues (data not shown), which probably reflects the fact the cell line originates from an adenocarcinoma, a tumor-type characterized by relative global hypomethylation. The exposure of the TC7/Caco-2 cells to 1 μ M 5-Aza-CdR resulted in a relative ~50% decrease in methylation for all three repeat classes, confirming the efficiency of the treatment (Fig. 3).

The methylation levels at the *APOA1/C3/A4/A5* gene promoters were also assessed by quantitative pyrosequencing. Two CpG dinucleotides within the *APOA5* promoter presented with a decrease in methylation from 86% in untreated cells to 62% after 5-Aza-CdR exposure. Similar demethylation profiles were observed at the *APOA1* (16%–10% for 2 CpGs), *APOC3* (30%–8% for 2 CpGs) and the *APOA4* (64%–27% for 3 CpGs) promoters (Fig. 4). The lower initial methylation status of the *APOA1* and *APOC3* promoters in TC7/Caco-2 cells compared to intestinal derived-DNA is likely to reflect the

tumorigenic origin of the cell line. To assess whether this demethylation lead to a concomitant re-expression of the *APOA1/C3/A4/A5* genes, we performed RT-qPCR for *APOA1*, *APOA4*, *APOC3* and *APOA5*. The RNA levels of these genes were clearly increased after treatment with 1 μ M 5-Aza-CdR compared to untreated controls (Fig. 4).

4. Discussion

Although it is reported that the *APOA1/C3/A4/A5* genes are expressed almost exclusively in the liver, work by our group [31] and others have shown that these transcripts are also expressed at low levels in the small intestine [33]. In the present study we hypothesize that intestinal *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster expression is regulated by epigenetic mechanisms, including DNA methylation, and that altering these mechanisms would result in enhanced expression. Through systematic screening of high-density

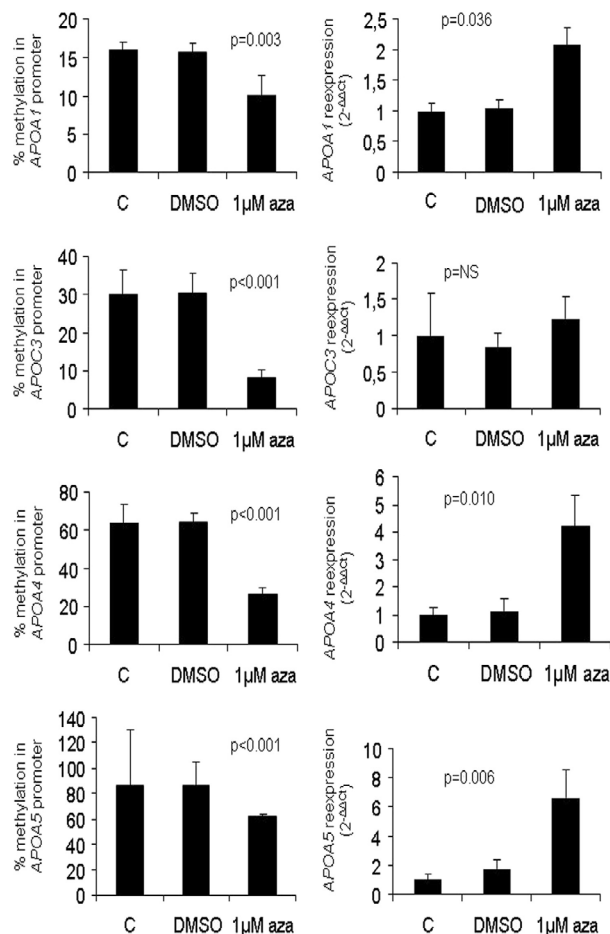


Fig. 4. Methylation and expression levels of *APOA1*, *APOC3*, *APOA4* and *APOA5* genes in intestinal TC7/Caco-2 cells after 1 μ M 5-Aza-CdR treatment for 3 days. C: control TC7/Caco-2 cells not incubated with 5-Aza-CdR ($n = 3$); DMSO: TC7/Caco-2 cells incubated with DMSO used as the vehicle for 5-Aza-CdR ($n = 3$); 1 μ M aza: TC7/Caco-2 cells incubated with 1 μ M 5-Aza-CdR ($n = 3$). P value corresponds to comparison between C and 1 μ M aza conditions. We performed three independent experiments and the conditions were performed in duplicate. The pyrosequencing was done in triplicate.

methylation array data in various tissues we identify regions that may be directly involved in the regulation of *APOA1/C3/A4/A5* cluster expression. By comparing the DNA methylation profile obtained from liver with non- and low-expressing tissues, including intestine, we show that the promoters of the *APOA5*, *APOC3* and *APOA1* genes are lowly methylated in liver but hypermethylated in other tissues. Interestingly, the *APOA4* promoter also presents with decreased methylation in liver samples compared to other tissues, but still remains partially methylated.

Our results are consistent with those reported previously by Shemer et al. showing a comparison of the methylation pattern of the cluster during development among embryos and adult tissues [34], and also consistent with the expression profiles expected from low CpG content promoters. CpG dinucleotides, which are usually methylated in mammals, are four-to five fold under-represented in the mammalian genome due to a spontaneous deamination of methylated cytosines (C), leading to C to thymine transition [35]. The only exception to global CpG methylation and depletion are CpG islands, discrete unmethylated CpG rich genomic regions present in ~70% of gene promoters [36–40]. These unmethylated CpG islands containing promoters are often found at ubiquitously expressed genes, while low CpG density promoters generally exhibit tissue-specific methylation and regulate the expression of tissue-specific transcripts [41]. All of the gene promoters within the *APOA1/C3/A4/A5* cluster are CpG poor promoters in fitting with their restricted liver-specific expression patterns.

CpG islands are not only present within promoter regions, but can be located with intra-as well as intergenic regions. In contrast to promoter CpG islands, these genomic features are prone to be methylated during development [42]. Although the function of these islands is unclear, it has been proposed that they act as alternative promoters in early stages of the development [42,43]. Three genes within the *APOA1/C3/A4/A5* cluster contain intergenic CpG islands that display different methylation profiles. The CpG island overlapping exon 3 of *APOA5* presents with a tissue-specific methylation profile similar to the promoter regions, namely decreased methylated in liver compared to other tissues (Fig. 1). The CpG island within the *APOA4* gene is fully methylated in all tissues (Fig. 1), while the CpG island overlapping exon 3 of *APOA1* is uniformly unmethylated and is also the promoter of a long non-coding RNA (DQ656025) that is transcribed antisense to *SIK3*, the gene adjacent to *APOA1*. Intriguingly the tissue-specific methylation profile of the *APOA1* interval we observe using state-of-the-art technology is very similar to that described nearly 25 years ago using Southern blot hybridization [33], confirming our results. The position of a similar sized and CG content CpG island overlapping the last exons of *APOA5*, *APOA4* and *APOA1* suggests that the coding sequences, which encodes numerous arginine codons, have exerted selection pressures to help maintain these islands.

We previously described that *APOA5* is expressed at low levels in intestinal samples from mice and humans [31] and that compared with its expression in the liver, intestinal *APOA5* expression levels were approximately 32,000 and 1000-fold lower in humans and mice, respectively, while its protein levels were 6-fold lower in an intestinal cell line compared to that in hepatic cells. So, even if we have been able to increase intestinal *APOA5* levels, we have not been able to reach the expression levels in the liver. This may be because there are other known elements or mechanisms responsible of the transcriptional control of *APOA5* gene in the liver [23,24,26,28,44–48] that may not be present in the intestine, namely tissue-specific transcription factors.

A limitation to consider when interpreting the results is that in human tissues and in our case, especially in intestine, there are more cell types other than the enterocytes that would mask the signature of minor cell components.

We believe gaining insight into the mechanisms of control of *APOA1/C3/A4/A5* cluster expression in the intestine may be of utility. The intestine is a very important tissue in the regulation of lipid metabolism, particularly in the postprandial control of lipids of dietary origin. Although the necessary studies are still to be conducted, we work with the hypothesis that there is inter-individual variability in intestinal *APOA1/C3/A4/A5* expression in response to dietary elements and that understanding the mechanisms to enhance intestinal *APOA1/C3/A4/A5* expression may be of clinical importance for the control of hypertriglyceridemia and the metabolic syndrome.

Sources of funding

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (PI12/01766 to M.G.); the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2011-27658 to D.M.); Fundació La Marató de TV3 (101130 to D.M.); and CIBERDEM (CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas), which is an initiative of ISCIII (Instituto de Salud Carlos III).

D.M. is a Ramon y Cajal research fellow and A.G.A. was funded by an FPU studentship.

Disclosures

None.

Acknowledgments

The normal liver and intestine tissues were obtained from the Xarxa tumor tissue bank which is sponsored by the Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.029>.

References

- [1] S.J. Elder, A.H. Lichtenstein, A.G. Pittas, S.B. Roberts, P.J. Fuss, A.S. Greenberg, et al., Genetic and environmental influences on factors associated with cardiovascular disease and the metabolic syndrome, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1917–1926.
- [2] L.A. Pennacchio, M. Olivier, J.A. Hubacek, J.C. Cohen, D.R. Cox, J.C. Fruchart, et al., An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing, *Science* 294 (2001) 169–173.
- [3] C.J. Fielding, V.G. Shore, P.E. Fielding, A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 1493–1498.
- [4] A.K. Soutar, C.W. Garner, H.N. Baker, J.T. Sparrow, R.L. Jackson, A.M. Gotto, et al., Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin:cholesterol acyltransferase, *Biochemistry* 14 (1975) 3057–3064.
- [5] R.A. Norum, J.B. Lakier, S. Goldstein, A. Angel, R.B. Goldberg, W.D. Block, et al., Familial deficiency of apolipoproteins A-I and C-III and precocious coronary-artery disease, *N. Engl. J. Med.* 306 (1982) 1513–1519.
- [6] L. Wang, B.G. Sharifi, T. Pan, L. Song, A. Yukht, P.K. Shah, Bone marrow transplantation shows superior atheroprotective effects of gene therapy with apolipoprotein A-I Milano compared with wild-type apolipoprotein A-I in hyperlipidemic mice, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 1459–1468.
- [7] C.S. Wang, W.J. McConathy, H.U. Kloer, P. Alaupovic, Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III, *J. Clin. Invest.* 75 (1985) 384–390.
- [8] H.N. Ginsberg, N.A. Le, I.J. Goldberg, J.C. Gibson, A. Rubinstein, P. Wang-Iverson, et al., Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo, *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 1287–1295.
- [9] P.K. Kinnunen, C. Ehnholm, Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase, *FEBS Lett.* 65 (1976) 354–357.

- [10] E. Windler, R.J. Havel, Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 556–565.
- [11] E. Sehayek, S. Eisenberg, Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 18259–18267.
- [12] T. Doi, M. Liu, R.J. Seeley, S.C. Woods, P. Tso, Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281 (2001) R753–R759.
- [13] P.H. Green, R.M. Glickman, J.W. Riley, E. Quinet, Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma, *J. Clin. Invest.* 65 (1980) 911–919.
- [14] T.J. Kaloogeris, K. Fukagawa, P. Tso, Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride, *J. Lipid Res.* 35 (1994) 1141–1151.
- [15] T.J. Kaloogeris, T. Tsuchiya, K. Fukagawa, R. Wolf, P. Tso, Apolipoprotein A-IV synthesis in proximal jejunum is stimulated by ileal lipid infusion, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) G277–G286.
- [16] C.H. Chen, J.J. Albers, Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma, *Biochim. Biophys. Acta* 836 (1985) 279–285.
- [17] R.B. Weinberg, Apolipoprotein A-IV polymorphisms and diet-gene interactions, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 125–134.
- [18] F.G. Schaap, P.C.N. Rensen, P.J. Voshol, C. Vriens, H.N. van der Vliet, R.A.F.M. Chamuleau, et al., ApoAIV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27941–27947.
- [19] C. Priore Oliva, P. Tarugi, S. Calandra, L. Pisciotta, A. Bellocchio, S. Bertolini, et al., A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia, *Atherosclerosis* 188 (2006) 215–217.
- [20] C. Marçais, B. Verges, S. Charrière, V. Pruneta, M. Merlin, S. Billon, et al., ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2862–2869.
- [21] T. Mishiroy, K. Ishihara, S. Hino, S. Tsutsumi, H. Aburatani, K. Shirahige, et al., Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster, *EMBO J.* 28 (2009) 1234–1245.
- [22] H.Y. Kan, S. Georgopoulos, V. Zannis, A hormone response element in the human apolipoprotein CIII (ApoCIII) enhancer is essential for intestinal expression of the ApoA-I and ApoCIII genes and contributes to the hepatic expression of the two linked genes in transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30423–30431.
- [23] X. Prieur, F.G. Schaap, H. Coste, J.C. Rodríguez, Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 3107–3125.
- [24] A. Genoux, H. Dehondt, A. Helleboid-Chapman, C. Duhem, D.W. Hum, G. Martin, et al., Transcriptional regulation of apolipoprotein A5 gene expression by the nuclear receptor RORalpha, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1186–1192.
- [25] X. Prieur, H. Coste, J.C. Rodríguez, The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25468–25480.
- [26] H. Jakel, M. Nowak, E. Moitrot, H. Dehondt, D.W. Hum, L.A. Pennacchio, et al., The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 45462–45469.
- [27] N. Vu-Dac, P. Gervois, H. Jakel, M. Nowak, E. Bauge, H. Dehondt, et al., Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17982–17985.
- [28] Y.-J. Li, Y.-S. Wei, X.-H. Fu, D.-L. Hao, Z. Xue, H. Gong, et al., The apolipoprotein CIII enhancer regulates both extensive histone modification and intergenic transcription of human apolipoprotein AI/III/AIV genes but not apolipoprotein AV, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 28436–28444.
- [29] S.P. Barros, S. Offenbacher, Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease, *J. Dent. Res.* 88 (2009) 400–408.
- [30] F. Court, C. Tayama, V. Romanelli, A. Martin-Trujillo, I. Iglesias-Platas, K. Okamura, et al., Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment, *Genome Res.* 24 (2014) 554–569.
- [31] M. Guardiola, A. Alvaro, J.C. Vallve, R. Rosales, R. Sola, J. Girona, et al., APOA5 gene expression in the human intestinal tissue and its response to in vitro exposure to fatty acid and fibrate, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22 (2012) 756–762.
- [32] A.S. Yang, M.R.H. Estéico, K. Doshi, Y. Kondo, E.H. Tajara, J.-P.J. Issa, A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e38.
- [33] R. Shemer, A. Walsh, S. Eisenberg, J.L. Breslow, A. Razin, Tissue-specific methylation patterns and expression of the human apolipoprotein AI gene, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 1010–1015.
- [34] R. Shemer, S. Eisenberg, J.L. Breslow, A. Razin, Methylation patterns of the human apoA-I/C-III/A-IV gene cluster in adult and embryonic tissues suggest dynamic changes in methylation during development, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23676–23681.
- [35] M. Ehrlich, M.A. Gama-Sosa, L.H. Huang, R.M. Midgett, K.C. Kuo, R.A. McCune, et al., Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 2709–2721.
- [36] A.P. Bird, DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 1499–1504.
- [37] A. Bird, M. Taggart, M. Frommer, O.J. Miller, D. Macleod, A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA, *Cell* 40 (1985) 91–99.
- [38] D.N. Cooper, H. Youssoufian, The CpG dinucleotide and human genetic disease, *Hum. Genet.* 78 (1988) 151–155.
- [39] F. Eckhardt, J. Lewin, R. Cortese, V.K. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, et al., DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1378–1385.
- [40] L. Shen, Y. Kondo, Y. Guo, J. Zhang, L. Zhang, S. Ahmed, et al., Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters, *PLoS Genet.* 3 (2007) 2023–2036.
- [41] M. Weber, I. Hellmann, M.B. Stadler, L. Ramos, S. Pääbo, M. Rebhan, et al., Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome, *Nat. Genet.* 39 (2007) 457–466.
- [42] R.S. Illingworth, U. Gruenewald-Schneider, S. Webb, A.R.W. Kerr, K.D. James, D.J. Turner, et al., Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1001134.
- [43] A.K. Maunakea, R.P. Nagarajan, M. Bilenky, T.J. Ballinger, C.D'Souza, S.D. Fouse, et al., Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters, *Nature* 466 (2010) 253–257.
- [44] X. Prieur, P. Lesnik, M. Moreau, J.C. Rodríguez, C. Doucet, M.J. Chapman, et al., Differential regulation of the human versus the mouse apolipoprotein AV gene by PPARalpha. Implications for the study of pharmaceutical modifiers of hypertriglyceridemia in mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 764–771.
- [45] K.H. Song, A.Y. Park, J.E. Kim, J.Y. Ma, Identification and characterization of cyclic AMP response element-binding protein H response element in the human apolipoprotein A5 gene promoter, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 892491.
- [46] K.H. Song, Orphan nuclear receptor Nur77 participates in human apolipoprotein A5 gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (2010) 63–66.
- [47] P. Hahne, F. Krempler, F.G. Schaap, S.M. Soyal, H. Höffinger, K. Müller, et al., Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans, *J. Intern. Med.* 264 (2008) 452–462.
- [48] X. Prieur, T. Huby, H. Coste, F.G. Schaap, M.J. Chapman, J.C. Rodríguez, Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27533–27543.

*APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate
circulating triacylglycerol levels.*

Iris Oliva, Montse Guardiola, Joan-Carles Vallvé, Daiana Ibarretxe, Núria
Plana, Lluís Masana, David Monk *and* Josep Ribalta.

Clinical Science, 130 (2016) 2053-2059

*APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate
circulating triacylglycerol levels.*

Iris Oliva, Montse Guardiola, Joan-Carles Vallvé, Daiana Ibarretxe, Núria
Plana, Lluís Masana, David Monk *and* Josep Ribalta.

Clinical Science, 130 (2016) 2053-2059

APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate circulating triacylglycerol levels

Iris Oliva^{*1}, Montse Guardiola^{*1}, Joan-Carles Vallvé^{*}, Daiana Ibarretxe^{*}, Núria Plana^{*}, Lluís Masana^{*}, David Monk† and Josep Ribalta^{*}

^{*}Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, Institut d'Investigació sanitària Pere Virgili (IISPV), CIBERDEM, 43201 Reus, Spain

†Imprinting and Cancer Group, Epigenetics and Cancer Biology Program (PEBC), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), 08907 Barcelona, Spain

Abstract

Apolipoprotein A5 gene (*APOA5*) variability explains part of the individual's predisposition to hypertriacylglycerolaemia (HTG). Such predisposition has an inherited component (polymorphisms) and an acquired component regulated by the environment (epigenetic modifications). We hypothesize that the integrated analysis of both components will improve our capacity to estimate *APOA5* contribution to HTG. We followed a recruit-by-genotype strategy to study a population composed of 44 individuals with high cardiovascular disease risk selected as being carriers of at least one *APOA5* SNP (-1131T>C and/or, S19W and/or 724C>G) compared against 34 individuals wild-type (WT) for these SNPs. DNA methylation patterns of three *APOA5* regions [promoter, exon 2 and CpG island (CGI) in exon 3] were evaluated using pyrosequencing technology. Carriers of *APOA5* SNPs had an average of 57.5% higher circulating triacylglycerol (TG) levels ($P = 0.039$). *APOA5* promoter and exon 3 were hypermethylated whereas exon 2 was hypomethylated. Exon 3 methylation positively correlated with TG concentration ($r = 0.359$, $P = 0.003$) and with a lipoprotein profile associated with atherogenic dyslipidaemia. The highest TG concentrations were found in carriers of at least one SNP and with a methylation percentage in exon 3 $\geq 82\%$ ($P = 0.009$). In conclusion, CGI methylation in exon 3 of *APOA5* acts, in combination with -1131T>C, S19W and 724C>G polymorphisms, in the individual's predisposition to high circulating TG levels. This serves as an example that combined analysis of SNPs and methylation applied to a larger set of genes would improve our understanding of predisposition to HTG.

Key words: *APOA5*, DNA methylation, missing heritability, polymorphisms, triacylglycerols.

INTRODUCTION

Epigenetics refers to genomic modifications in response to environmental stimuli that regulate gene expression, without changing the DNA sequence. These epigenetic modifications regulate chromatin structure and DNA accessibility [1]. DNA methylation is one of the most-studied epigenetic markers [2] and results from the covalent union of a methyl group at the fifth carbon of cytosines located upstream of guanines (CpG dinucleotides). DNA methylation is generally associated with a compact chromatin state and inhibition of gene transcription. Mammalian genomes are globally poor in CpG, except at short DNA regions called CpG islands (CGI), which are frequently associated with gene promoters [3]. Cytosine methylation patterns are tissue-specific. Nonetheless, considerable effort has been directed towards validating blood DNA methylation patterns as a

reliable disease marker not only in several types of cancer [4] but also in metabolic pathologies such as obesity [5] and diabetes [6].

Hypertriacylglycerolaemia (HTG) is a complex and polygenic pathology highly influenced by environment, and the genetic variability only corresponds to a ~10–20% of the individual's predisposition [7–9]. Within this genetic variability, in the case of HTG, only a 25–30% is explained by known and novel common variations in key genes [10,11]. This is explained, in part by the so-called 'missing' heritability which is thought to correspond to common single nucleotide polymorphisms (SNPs) not yet identified as well as rare variants, structural alterations in genes, epistasis (gene–gene interactions) and epigenetic modifications [12].

Apolipoprotein A5 gene (*APOA5*) has been recognized as one of the main genetic determinants of triacylglycerols (TG) [13,14] and is located in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster on chromosome 11q23. Apolipoprotein AV (APOAV) is

Abbreviations: *APOA5*, apolipoprotein A5 gene; *APOAI*, apolipoprotein A1; *APOAV*, apolipoprotein AV; *APOB100*, apolipoprotein B100; CGI, CpG island; GWAS, genome wide association study; HDLc, HDL cholesterol; HTG, hypertriacylglycerolaemia; LDLc, LDL cholesterol; RLPc, remnant-like particle cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triacylglycerol; WT, wild-type.

Correspondence: Josep Ribalta (email: josep.ribalta@urv.cat)

¹ These authors contributed equally to the study.

I. Oliva and others

synthesized and secreted from the liver and reduces plasma TG but the exact mechanism of action is unclear. Inhibition of very low density lipoprotein (VLDL) hepatic production, stimulation of lipoprotein lipase activity and increase in hepatic receptor-mediated uptake of TG-rich lipoproteins are the most plausible mechanisms [15–17]. Association between *APOA5* SNPs and TG in humans is well documented, and S19W (rs3135506) and -1131T>C (rs662799) define the two main haplotypes that have been associated most closely with TG [18]. In addition, another SNP has been recently identified by genome-wide association studies (GWAS) to be significantly associated with high TG and to be one of the most important signals associated with coronary artery disease, the 724G>C (rs964184) which is located in the *APOA5-ZNF259* region [19–21].

We hypothesize that the integrated analysis of the genetic and the epigenetic modifications will improve our capacity to estimate *APOA5* contribution to HTG.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Participants ($n = 78$) for the current study were selected among those subjects attending the Vascular Medicine and Metabolism Unit of the Hospital Universitari Sant Joan (a population around 1000 patients) de Reus in Spain. Participants are middle-aged individuals with high cardiovascular risk, and those presenting any of the following conditions were excluded: prior coronary heart disease; cerebral or peripheral vascular disease; and cancer, hepatic, renal, lung, endocrine or inflammatory chronic diseases. Patients on lipid lowering drugs had a wash-out period of 6 weeks (8 weeks if they were receiving fibrates). Anamnesis and physical examination data were recorded.

Following the latest published data about *APOA5* methylation levels, we calculated the optimal sample size to detect methylation differences of 10% with an 8% standard deviation, and a statistical power of 80%. A total of 78 individuals were included following a recruit-by-genotype approach.

The Hospital Ethical Committee approved the study and all patients gave their written consent to participate. Data were coded for anonymity in accordance with current Spanish law on biomedical research.

Blood samples collection and storage

An overnight fasting blood sample was obtained from each individual. The cellular buffy coat was obtained and stored at -80°C until DNA analyses were performed. DNA was extracted with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

Biochemical analyses

Plasma was separated from an overnight fasting blood sample and frozen at -80°C . Total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDLc), LDL cholesterol (LDLc), TG, apolipoprotein B100 (APOB100), apolipoprotein AI (APOAI) were measured using standard enzymatic and colorimetric techniques adapted to a Cobas Mira autoanalyser (Roche Diagnostics). Remnant-like

particle cholesterol (RLPc) was measured in plasma using RLP-Cholesterol Assay Kits (Jimro-II, Japan Immunoresearch Laboratories) according to the manufacturer's instructions [22].

NMR lipoprotein profile

Distribution of lipoprotein plasma subclasses were analysed by NMR in a Vantera clinical spectrometer, produced by LipoScience. The NMR LipoProfile test by LipoScience involves measurement of the 400 MHz proton spectrum of samples and uses the characteristic signal amplitude of the lipid methyl group broadcast by every lipoprotein subfraction as the basis for quantification. NMR using the LipoProfile-3 algorithm was performed to quantify the average particle size and concentrations of VLDL, LDL and HDL. Subparticle concentrations were determined for three VLDL subclasses (large or chylomicrons, medium and small), three LDL subclasses (large, medium and small) and three HDL subclasses (large, medium and small). The NMR was carried out on EDTA plasma stored at -80°C and thawed just prior to the analysis.

SNP selection and genotyping

A recruit-by-genotype approach was followed by screening more than 1000 individuals to select 78 individuals; 44 carriers of at least one of these *APOA5* polymorphisms (S19W, -1131T>C and 724C>G) and 34 individuals wild-type (WT) for these polymorphisms. In that way, we were able to increase the three SNPs frequency in our study population (from 0.05 to 0.13, from 0.02 to 0.15 and from 0.12 to 0.29 respectively) and reducing the necessary sample size. S19W and -1131T>C are the most-studied *APOA5* polymorphisms and both have been strongly associated with TG [18]. In contrast, 724C>G has been recently identified by GWAS as an important determinant of TG [19–21]. See supplementary Figure S1 for a schematic view of the SNP location in *APOA5*. The criterion used to select the individuals was to be carrier of at least one rare allele of these polymorphisms for the Carrier group and not to be carrier of any one for the WT group. Genotyping was performed by CEGEN (Spanish National Genotyping Center) using the Sequenom MassARRAY platform.

Methylation patterns

We used the USCS Server (<http://genome.ucsc.edu/>) to select regions-of-interest in *APOA5*; the CGI in exon 3, the region in exon 2 likely to be regulating histone methylation and the gene promoter for its central role in genetic transcription control (Supplementary Figure S1).

Bisulfite PCR and sequencing

Approximately $1\ \mu\text{g}$ DNA was subjected to sodium bisulfite treatment and purified using the EZ GOLD methylation kit (ZYMO). Bisulfite specific primers for each region were used with Hotstar Taq polymerase (Qiagen) for 45 PCR cycles. All PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) with a minimum of 12 clones selected for sequencing. All primers for bisulfite PCR can be found in Supplementary Table S1.

APOA5 (epi)genetic interaction influences triacylglycerol plasma levels

Original Paper

Methylation pyrosequencing

Standard bisulfite PCR was used to amplify regions of interest; the characteristic being that one primer was biotinylated. The entire biotinylated PCR product (diluted to 40 μ l) was mixed with 38 μ l of binding buffer and 2 μ l (10 mg/ml) streptavidin-coated polystyrene beads. Bead-amplicon complexes were captured on a vacuum prep tool (Qiagen) and the PCR products denatured using 0.2 mol/l NaOH. The denatured DNA was re-suspended in 40 pmol of sequencing primer dissolved in 12 μ l water and primer annealing was achieved by heating the sample to 80°C for 2 min before cooling to room temperature. For sequencing, an internal primer was designed to the complementary strand. The pyrosequencing reaction was performed on a PyroMark Q96 instrument. The peak heights at C/T variants of CpG dinucleotides were determined using the pyrosequencing commercial software (Biotage). Primers for methylation pyrosequencing can also be found in Supplementary Table S1.

Statistical analysis

Pyrosequencing analyses are expressed as percentage of methylation ranging from 0% (unmethylated) to 100% (fully methylated) at each CpG position. The average methylation was tested for association with the polymorphisms and lipid-related variables. TG-related variables which did not follow a normal distribution (tested by Kolmogorov-Smirnov) were log-transformed before the statistical analyses. Relationships between lipid-related variables and mean methylation values were determined by partial correlations, adjusted for age, gender and BMI. Associations between lipid variables and genotypes were evaluated using ANOVA. Linear regression models were used to evaluate TG variability. Significant differences between models were assessed by changes in R^2 in an enter block model. All statistical analyses were adjusted for age, gender and BMI. The SPSS package version 19.0 (IBM) was used throughout. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Patients

We studied 78 middle-aged dyslipaemic individuals at high cardiovascular disease risk from metabolic alterations such as diabetes (51%), obesity (40%), hypertension (33%) or metabolic syndrome (60%). There were no significant differences in genotype frequencies among disease types. Baseline data of the study sample are shown in Table 1.

APOA5 polymorphisms and triacylglycerols

Of the 78 individuals, 44 were carriers of *APOA5* SNPs; 21 were carriers of S19W; 21 were carriers of -1131T>C; 42 were carriers of 724C>G. The genotype distributions are presented in Table 2. Almost 80% of carriers were S19W/724C>G heterozygotes or -1131T>C/724C>G heterozygotes. The WT and the Carrier groups were comparable with respect to age, BMI, gender and all lipids except for TG concentrations (Table 1). *APOA5* Carriers had 57.5% higher TG on average ($P = 0.039$) than WT.

Table 1 Baseline data of subjects and comparisons between WT and carriers groups

Values are expressed as mean (S.D.). * P value is adjusted by age, gender and BMI.

	All, n = 78	WT, n = 34	Carriers, n = 44	P *
Age, years	53.7 (10.8)	55.0 (10.9)	52.0 (10.7)	ns
Gender, % women	35.9	38.0	34.0	ns
BMI, kg/m ²	29.8 (5.9)	29.40 (6.9)	30.2 (5.1)	ns
TG, mmol/l	1.8 (1.5)	1.4 (0.9)	2.2 (1.8)	0.039
TC, mmol/l	5.4 (1.1)	5.4 (1.1)	5.4 (1.1)	ns
HDLc, mmol/l	1.1 (0.3)	1.1 (0.4)	1.1 (0.3)	ns
LDLc, mmol/l	3.5 (0.9)	3.6 (1.0)	3.4 (0.9)	ns
APOAI, mg/dl	135.6 (25.4)	136.8 (28.2)	134.7 (23.4)	ns
APOB100, mg/dl	117.5 (32.8)	118.2 (34.5)	116.9 (31.9)	ns
RLPc, mg/dl	10.75 (8.57)	9.40 (5.84)	11.79 (10.1)	ns

Table 2 Genotype distribution by SNP in carriers, and the corresponding TG levels

TG values are expressed as mean (S.D.)

	Individuals, N	Frequency, %	TG, mmol/l
S19W	21	26.9	1.8 (0.4)
-1131T>C	21	26.9	2.7 (1.7)
724C>G	42	46.2	2.2 (1.8)

Although alleles were not evenly distributed among our 44 carriers, circulating TG levels increased in an allele dose-dependent manner ($P = 0.025$) (Supplementary Figure S2). Analysis of the effect of allele distribution on TG levels showed no statistically significant differences among genotypes in the Carrier group (Supplementary Table S2).

APOA5 methylation and triacylglycerols

A total of 17 CpGs located within three *APOA5* regions were analysed: two CpGs in the promoter region, five in exon 2 and ten in the CGI in exon 3. The global methylation patterns of the three regions and the specific individual CpG methylation percentage are shown in Supplementary Table S3.

The promoter region is hypermethylated with a methylation range between 48.9 and 93.2% (median: 87.8%, IQR: 7.4%). Exon 2 is hypomethylated with a range in the five CpGs of between 4.9 and 13.1% (median: 7.9%, IQR: 1.9%). These regions and their individual CpGs showed no statistically significant correlations with circulating TG levels or any other lipid parameter.

CGI in exon 3 is hypermethylated with a methylation range among its ten CpGs of between 58.0 and 91.6% (median: 83.3%, IQR: 11.6%). This region was positively correlated with plasma TG ($r = 0.359$, $P = 0.003$); circulating RLPc levels ($r = 0.279$, $P = 0.023$); total VLDL particles ($r = 0.263$, $P = 0.044$) and

I. Oliva and others

Table 3 Linear regression models to explain TG variability

Adjusted R^2 denotes the adjusted proportion of the variance explained by the model. p denotes the significance of the model; B denotes the variable estimate; P denotes the significance of the variable.

	Variable	R^2	p	B	P
Model 1		0.278	<0.001		
	Age			0.007	0.027
	Gender			0.113	NS
Model 2	BMI			0.020	0.001
		0.319	<0.001		
Model 1 +	WT compared with SNP			0.134	0.039
Model 3		0.347	<0.001		
Model 1 +	Exon 3 methylation			0.016	0.003
Model 4		0.353	<0.001		
Model 2 +	Exon 3 methylation			0.015	0.008

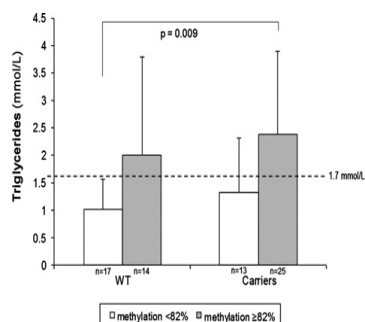


Figure 1 Circulating TG levels in relation to *APOA5* genotype and percentage methylation in exon 3

Dashed line indicates the value at which TG levels are considered of pathological significance. Standard deviation bars are included.

its largest subclasses [large and medium VLDL ($r = 0.312$, $P = 0.016$); and total LDL particles ($r = 0.261$, $P = 0.045$) and its smallest subclasses [medium LDL ($r = 0.628$, $P = 0.04$), small LDL ($r = 0.307$, $P = 0.018$), and with small HDL ($r = 0.272$, $P = 0.037$). This region also shows an inverse correlation with large HDL ($r = -0.315$, $P = 0.015$).

We also checked for correlations between methylation, BMI and waist circumference. A positive correlation was observed between CGI methylation and BMI ($r = 0.416$, $P < 0.001$) and waist circumference ($r = 0.256$, $P = 0.038$).

Combined effect of *APOA5* polymorphisms and methylation patterns

Whether there was an additive effect of *APOA5* methylation and polymorphisms on TG plasma levels was assessed. Methylation at the promoter and exon 2 was comparable between WT and Carrier but, nonetheless, we observed a higher degree of methylation in exon 3 in Carrier group compared with WT (WT mean: 78.8%, IQR: 11.7% compared with Carrier mean: 85.3%, IQR: 10.12%, $P = 0.027$).

The highest TG concentrations were found in Carriers of *APOA5* SNPs with $\geq 82\%$ methylation in exon 3; the TG in such group being 2.35-fold higher than in WT with $< 82\%$ methylation in exon 3 ($P = 0.009$) (Figure 1).

We generated four models to explain TG variability (Table 3). Gender, BMI and age explained 27.8% of TG variability. However, adding *APOA5* polymorphisms to the first model increased the prediction value by 4%. Adding CGI methylation to the first model increased the prediction value by 7%. Adding CGI methylation and *APOA5* polymorphisms together (third model) increased the TG prediction value by 7.5%, relative to the model involving gender, BMI and age alone (Figure 2).

DISCUSSION

Unlike rare familial syndromes associated with severe HTG that are caused by mutations with a large effect of a few specific genes, most cases of HTG are regulated by a complex interaction of multiple known and unknown genes in concert with environmental factors. The known common genetic variants have a limited role in the overall genetic variation in HTG, suggesting that there are other factors that would help reveal the true genetic contributions.

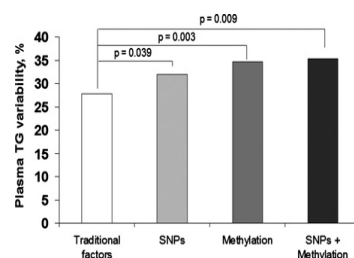


Figure 2 Percentage of plasma TG variability explained in four regression models: using traditional factors (gender, BMI and age) and with the addition of the contributions of SNPs and/or methylation in the CGI

APOA5 (epi)genetic interaction influences triacylglycerol plasma levels

Original Paper

The aim of our study was to demonstrate that, in the genetic control of TG levels, there is an additive effect resulting from the degree of DNA methylation and genetic polymorphisms. Hence, we studied a key gene in the regulation of plasma TG, the *APOA5* gene. We report here that CGI methylation in exon 3 of *APOA5* acts, in combination with -1131T>C, S19W and 724C>G polymorphisms, in contributing to the individual's predisposition to high levels of circulating TG.

We had earlier reported that the effect of *APOA5* depends, largely, on the metabolic background of the subject [23]. Here, we report on a group of patients with altered lipid metabolism, patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. To obtain sufficient statistical power, we also followed a strategy of genotype-driven recruitment. Thus, the patients were selected for their genotype of the most relevant *APOA5* polymorphisms: -1131T>C, S19W or 724C>G. Briefly, -1131T>C gene variant is located in the *APOA5* promoter region and has been shown, repeatedly, to be associated with increased TG levels due to a co-operation with two other polymorphisms in *APOA5* (-3A>G and 1891T>C) [24]. The second genotype chosen was S19W in exon 2 which induces an amino acid change in the N-terminal extreme of APOAV that leads to reduced apolipoprotein activity [25]. Finally, the 724C>G gene variant was chosen which, despite little being known on its functionality, has been strongly linked with HTG levels in a GWAS aimed at analysing genetic variants influencing plasma lipid concentrations in a study involving almost twelve thousand subjects [8,26].

As expected, and in concordance with other studies [18,27,28], our results showed that being a carrier of at least one of the *APOA5* polymorphisms studied, increases 1.57-fold the TG levels; a confirmation that *APOA5* variants influence circulating TG levels even though APOAV presence in plasma is very low compared with other apolipoproteins [29]. We also described that circulating TG levels increased in an allele dose-dependent manner, regardless of the polymorphism. Most of our studied subjects presented more than one *APOA5* polymorphism and, since almost 80% of Carriers presented rare alleles of 724C>G plus -1131T>C or S19W, the uneven distribution of the *APOA5* SNPs could be considered as a potential confounder. However, there were no significant differences in TG with respect to the different combinations of SNPs.

As mentioned earlier, it is well documented that genetic variants are insufficient to clarify the whole variability of observed plasma TG distributions. This led us to consider that DNA methylation could be a major factor worth exploring in our analysis because of its role in regulating gene transcription, and because it is influenced by environmental stimuli. Over the past decade some evidence has demonstrated that epigenetics is a key element in the regulation of lipid metabolism. Guay et al. showed that methylation variability on *CETP* and *LPL* promoter loci are associated with blood lipid concentrations, and that *ABCA1* promoter DNA methylation is associated with HDL particle size and composition profiles [30,31]. Pfeiffer et al. analysed a genome-wide DNA methylation pattern and identified CpG sites located in genes such as *ABCG1*, *MIR33B/SREBBF1* and *TNIP1* which were associated with altered lipid parameters [32]. Our search of the current literature was unable to confirm whether there are

specific methylation sites in *APOA5* that are involved in the regulation of circulating TG levels. Nonetheless, we recently identified methylation profiles in the *APOA1/C3/A4/A5* cluster that may be directly involved in the transcriptional regulation of this cluster [33].

We studied the methylation pattern of three regions in *APOA5* and reported that high methylation at the CGI in exon 3 is positively correlated with high plasma TG levels and high large VLDL, small LDL, small HDL particles and high RLPc levels. This pro-atherogenic lipoprotein profile defines the so-called atherogenic dyslipidaemia. We also observed a positive correlation between CGI methylation in *APOA5*, BMI and waist circumference. All these correlations could be explained by the physiopathology of our patients. Obesity is associated with dysfunctional adipose tissue which, in subjects with type 2 diabetes and metabolic syndrome, induces an increased fatty acid flux from visceral fat to the liver, resulting in an increased synthesis and secretion of TG. Thus, fat accumulation in the liver induces not only insulin resistance but also contributes to the development of atherogenic dyslipidaemia [34].

It is not clear whether the altered metabolism in these patients induces changes in DNA methylation, or whether the genetic and epigenetic predisposition causes the lipid alterations. Nevertheless, there is evidence that associates HTG risk factors with gene methylation variability [35,36], and which suggests that the variability in methylation may be secondary to disease processes and can highlight environmental factors such as diet and smoking which can influence gene expression [37].

Although methylation patterns are tissue-specific, we used DNA from circulating cells which would reflect specific methylation variations from populations of blood cells [38,39]. However we contemplate that methylation variations in blood cells would be somehow representative of the methylation pattern occurring in hard-to-access tissues such as the liver, and this is becoming a topic of study since some studies have already described correlations between methylation patterns in DNA from colorectal adenocarcinoma or adipose tissue and that from blood cells [5,40].

Another example of interaction between genetic variability and epigenetic mechanism in *APOA5* regulation has been described recently. Apart from DNA methylation, there is another epigenetic mechanism that influences *APOA5* regulation. Cui et al. recently demonstrated in Chinese patients that the rare allele in 1259T>C (rs2266788) located in the *APOA5* 3'UTR region (which is in linkage disequilibrium with -1131T>C and 724C>G) destroys the microRNA-3201 binding site; the outcome being an increase in gene translation and, subsequently, in high levels of plasma APOAV and TG [41]. In this sense, it would be of considerable value to analyse all epigenetic factors that involve gene regulation. These would include, for example, histone modifications, miRNAs binding sites and epistasis.

Finally, our novel finding of a relationship between plasma TG, *APOA5* SNPs and methylation is of note since the addition of methylation data could explain, at least in part, the missing heritability in the genetic predisposition to HTG, which remains unexplained to-date. The sum of inherited genetic information (SNPs) and acquired genetic information (DNA methylation, together with other epigenetic markers) from other key genes

I. Oliva and others

involved in the control of TG, could help explain the observed variability of plasma TG.

CLINICAL PERSPECTIVES

- CGI in exon 3 of *APOA5* is hypermethylated in blood and correlates with plasma TG levels and with a pro-atherogenic lipoprotein subclasses profile.
- CGI methylation and polymorphisms of *APOA5* act in combination in the individual's predisposition to high circulating TG levels.
- To sum up, *APOA5* methylation and polymorphisms information increase a 7.5% of the gene predictive capacity to HTG compared with traditional risk factors prediction.

AUTHOR CONTRIBUTION

Josep Ribalta, Montse Guardiola, David Monk and Iris Oliva conceived and designed the study. Daiana Ibarretxe, Núria Plana and Lluís Masana participated in patient recruitment and selection. Montse Guardiola, David Monk and Iris Oliva acquired the data. Josep Ribalta, Montse Guardiola, Joan-Carles Vallvé and Iris Oliva interpreted the data. Montse Guardiola and Iris Oliva drafted the manuscript. Josep Ribalta, Montse Guardiola, David Monk and Joan-Carles Vallvé provided critical review of the manuscript. All authors revised the article and approved the final version to be published. Josep Ribalta is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad [grant number P112/01766 (to M.G.)]; and the CIBERDEM (CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas) [grant number CB07/08/0028], which is an initiative of ISCIII (Instituto de Salud Carlos III).

REFERENCES

- Bernstein, B.E., Meissner, A. and Lander, E.S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669–681 [CrossRef PubMed](#)
- Handy, D.E., Castro, R. and Loscalzo, J. (2011) Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* **123**, 2145–2156 [CrossRef PubMed](#)
- Weber, M. and Schübeler, D. (2007) Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 273–280 [CrossRef PubMed](#)
- Li, L., Choi, J.-Y., Lee, K.-M., Sung, H., Park, S.K., Oze, I., Pan, K.F., You, W.C., Chen, Y.X., Fang, J.Y. et al. (2012) DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J. Epidemiol.* **22**, 384–394 [CrossRef PubMed](#)
- Dick, K.J., Nelson, C.P., Tsaprouni, L., Sandling, J.K., Aissi, D., Wahl, S., Meduri, E., Morange, P.E., Gagnon, F., Grallert, H. et al. (2014) DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet* **383**, 1990–1998 [CrossRef PubMed](#)
- García-Cardona, M.C., Huang, F., María García-Vivas, J., López-Camarillo, C., Del Río Navarro, B.E., Olivos, E.N., Hong-Chong, E., Bolaños-Jiménez, F. and Marchat, L.A. (2014) DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond)* **38**, 1457–1465 [CrossRef PubMed](#)
- Tselovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J. et al. (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 [CrossRef PubMed](#)
- Johansen, C.T., Kathiresan, S. and Hegele, R.A. (2011) Genetic determinants of plasma triglycerides. *J. Lipid Res.* **52**, 189–206 [CrossRef PubMed](#)
- Johansen, C.T. and Hegele, R.A. (2011) Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 247–253 [CrossRef PubMed](#)
- Tselovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J. et al. (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 [CrossRef PubMed](#)
- Willer, C.J., Schmidt, E.M., Sengupta, S., Peloso, G.M., Gustafsson, S., Kanoni, S., Ganna, A., Chen, J., Buchkovich, M.L., Mora, S. et al. (2013) Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat. Genet.* **45**, 1274–1283 [CrossRef PubMed](#)
- Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorf, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.L., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A. et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747–753 [CrossRef PubMed](#)
- Pennacchio, L.A., Olivier, M., Hubacek, J.A., Krauss, R.M., Rubin, E.M. and Cohen, J.C. (2002) Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3031–3038 [CrossRef PubMed](#)
- Sarwar, N., Sandhu, M.S., Ricketts, S.L., Butterworth, A.S., Di Angelantonio, E., Boehkholdt, S.M., Ouwehand, W., Watkins, H., Samani, N.J., Saleheen, D. et al. (2010) Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet* **375**, 1634–1639 [CrossRef PubMed](#)
- Schaap, F.G., Rensen, P.C.N., Voshol, P.J., Vriens, C., van der Vliet, H.N., Chamuleau, R.A.F.M., Havekes, L.M., Groen, A.K. and van Dijk, K.W. (2004) ApoA5 reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 27941–27947 [CrossRef PubMed](#)
- Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L.A., Laatsch, A. and Heeren, J. (2005) Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **280**, 21553–21560 [CrossRef PubMed](#)
- Mendoza-Barberá, E., Julve, J., Nilsson, S.K., Lookene, A., Martín-Campos, J.M., Roig, R., Lechuga-Sancho, A.M., Sloan, J.H., Fuentes-Prior, P. and Blanco-Vaca, F. (2013) Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* **54**, 649–661 [CrossRef PubMed](#)
- Talmud, P.J., Hawe, E., Martin, S., Olivier, M., Miller, G.J., Rubin, E.M., Pennacchio, L.A. and Humphries, S.E. (2002) Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3039–3046 [CrossRef PubMed](#)

APOA5 (epi)genetic interaction influences triacylglycerol plasma levels

Original Paper

- 19 Brautbar, A., Covarrubias, D., Belmont, J., Lara-Garduno, F., Virani, S.S., Jones, P.H., Leal, S.M. and Ballantyne, C.M. (2011) Variants in the APOA5 gene region and the response to combination therapy with statins and fenofibric acid in a randomized clinical trial of individuals with mixed dyslipidemia. *Atherosclerosis* **219**, 737–742 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 20 Kathiresan, S., Willer, C.J., Peloso, G.M., Demissie, S., Musunuru, K., Schadt, E.E., Kaplan, L., Bennett, D., Li, Y. and Tanaka, T. (2009) Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 21 Schunkert, H., König, I.R., Kathiresan, S., Reilly, M.P., Assimes, T.L., Holm, H., Preuss, M., Stewart, A.F., Barbalic, M., Gieger, C. et al. (2011) Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat. Genet.* **43**, 333–338 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 22 Nakajima, K., Saito, T., Tamura, A., Suzuki, M., Nakano, T., Adachi, M., Tanaka, A., Tada, N., Nakamura, H., Campos, E. et al. (1993) Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunofluorescence mixed gels. *Clin. Chim. Acta* **223**, 53–71 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 23 Ribalta, J., Figuera, L., Fernández-Ballart, J., Vilella, E., Castro Cabezas, M., Masana, L. and Joven, J. (2002) Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin. Chem.* **48**, 1597–1600 [PubMed](#)
- 24 Palmen, J., Smith, A.J.P., Dorfmeister, B., Putt, W., Humphries, S.E. and Talmud, P.J. (2014) The functional interaction on *in vitro* gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA52, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoAV levels. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 447–452 [CrossRef](#)
- 25 Talmud, P.J., Palmen, J., Putt, W., Lins, L. and Humphries, S.E. (2005) Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J. Biol. Chem.* **280**, 28215–28220 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 26 Willer, C.J., Sanna, S., Jackson, A.U., Scuteri, A., Bonnycastle, L.L., Clarke, R., Heath, S.C., Timpson, N.J., Najjar, S.S., Stringham, H.M. et al. (2008) Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* **40**, 161–169 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 27 Moreno-Luna, R., Perez-Jimenez, F., Marin, C., Perez-Martinez, P., Gomez, P., Jimenez-Gomez, Y., Delgado-Lista, J., Moreno, J.A., Tanaka, T., Ordoñas, J.M. and Lopez-Miranda, J. (2007) Two independent apolipoprotein A5 haplotypes modulate postprandial lipoprotein metabolism in a healthy caucasian population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2280–2285 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 28 Hallman, D.M., Srinivasan, S.R., Chen, W., Boerwinkle, E. and Berenson, G.S. (2006) Longitudinal analysis of haplotypes and polymorphisms of the APOA5 and APOC3 genes associated with variation in serum triglyceride levels: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism* **55**, 1574–1581 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 29 O'Brien, P.J., Alborn, W.E., Sloan, J.H., Ulmer, M., Boodhoo, A., Knierman, M.D., Schultze, A.E. and Konrad, R.J. (2005) The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin. Chem.* **51**, 351–359 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 30 Guay, S.P., Brisson, D., Lamarche, B., Marceau, P., Vohl, M.C., Gaudet, D. and Bouchard, L. (2013) DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis* **228**, 413–420 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 31 Guay, S.-P., Voisin, G., Brisson, D., Munger, J., Lamarche, B., Gaudet, D. and Bouchard, L. (2012) Epigenome-wide analysis in familial hypercholesterolemia identified new loci associated with high-density lipoprotein cholesterol concentration. *Epigenomics* **4**, 623–639 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 32 Pfeiffer, L., Wahl, S., Pilling, L.C., Reischl, E., Sandling, J.K., Kunze, S., Holdt, L.M., Kretschmer, A., Schramm, K., Adamski, J. et al. (2015) DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **8**, 334–342 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 33 Guardiola, M., Oliva, I., Guillaumet, A., Martín-Trujillo, A., Rosales, R., Vallvé, J.C., Sabench, F., Del Castillo, D., Zaina, S., Monk, D. and Ribalta, J. (2014) Tissue-specific DNA methylation profiles regulate liver-specific expression of the APOA1/C3/A4/A5 cluster and can be manipulated with demethylating agents on intestinal cells. *Atherosclerosis* **237**, 528–535 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 34 Adiels, M., Taskiran, M.-R. and Borén, J. (2008) Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr. Diab. Rep.* **8**, 60–64 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 35 Feinberg, A.P., Irizarry, R.A., Fradin, D., Aryee, M.J., Murakami, P., Aspelund, T., Eiriksdoottir, G., Harris, T.B., Launer, L., Gudnason, V. and Fallin, M.D. (2010) Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index. *Sci. Transl. Med.* **2**, 49ra67 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 36 Wang, X., Zhu, H., Snieder, H., Su, S., Munn, D., Harshfield, G., Maria, B.L., Dong, Y., Treiber, F., Gutin, B. and Shi, H. (2010) Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med.* **8**, 87 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 37 Bjornsson, H.T., Fallin, M.D. and Feinberg, A.P. (2004) An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet.* **20**, 350–358 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 38 Adalsteinsson, B.T., Gudnason, H., Aspelund, T., Harris, T.B., Launer, L.J., Eiriksdoottir, G., Smith, A.V. and Gudnason, V. (2012) Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. *PLoS One* **7**, e46705 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 39 Jacoby, M., Gohrbandt, S., Clausse, V., Brons, N.H. and Muller, C.P. (2012) Interindividual variability and co-regulation of DNA methylation differ among blood cell populations. *Epigenetics* **7**, 1421–1434 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 40 Danese, E., Miniccozzi, A.M., Benati, M., Montagnana, M., Paviati, E., Salvagno, G.L., Gusella, M., Pasini, F., Guidi, G.C. and Lippi, G. (2013) Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma – the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **109**, 807–813 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 41 Cui, G., Li, Z., Li, R., Huang, J., Wang, H., Zhang, L., Ding, H. and Wang, D.W. (2014) A functional variant in APOA5/A4/C3/A1 gene cluster contributes to elevated triglycerides and severity of CAD by interfering with microRNA 3201 binding efficiency. *J. Am. Coll. Cardiol.* **64**, 267–277 [CrossRef](#) [PubMed](#)

Received 9 June 2016/21 July 2016; accepted 9 September 2016

Accepted Manuscript online 9 September 2016, doi: 10.1042/CS20160433

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodriguez

*Two PCSK9 variants associated with lower concentrations of
Tg-rich lipoproteins and methylation in the promoter
modulate atherogenic dyslipidemia in patients with type 2
diabetes and the metabolic syndrome.*

Iris Oliva, Montse Guardiola, Marta Sánchez, Joan-Carles Vallvé, Núria Plana,
Daiana Ibarretxe, Marta Gonzalo, Jesús Castán, Anna Trinidad, Júlia Pàmies,
Lluís Masana, David Monk *and* Josep Ribalta.

Submitted (2017)

No hi ha dubte que PCSK9 és un dels principals moduladors dels nivells de colesterol plasmàtic, ja que variants al seu gen s'han associat tant a malalties com la hipercolesterolèmia familiar com a concentracions molt baixes de cLDL (inferiors a 0.52 mmol/L). A banda, els pacients amb DT2 o síndrome metabòlica presenten un perfil de TG alts, un increment en el nombre de partícules LDL i baix cHDL, però amb més HDL petites (perfil de DA). Paradoxalment, malgrat que els seus nivells de cLDL són normals, el nostre grup va ser el primer a demostrar que PCSK9 circulant s'associa a un perfil lipoproteic de DA en pacients amb alt risc cardiovascular.

Tenint en compte que la DA està influenciada per la genètica i, possiblement, també per factors epigenètics, la nostra hipòtesi va ser que la genètica i l'epigenètica de *PCSK9* podrien modular el desenvolupament de DA. Per provar-ho, vam estudiar la relació entre 9 subclasses de lipoproteïnes, mesurades per ressonància magnètica nuclear, amb la genètica i l'epigenètica de *PCSK9* en 281 pacients amb DT2 o síndrome metabòlica. Vam identificar i piroseqüenciar dues regions de metilació del gen (una ICG al promotor del gen i una regió de regulació d'histones a l'intró 10). Vam seleccionar i genotipar 14 tagSNPs per cobrir tota la variabilitat del gen i, a més, vam afegir la variant R46L.

L'ICG estava hipometilada, i el grau de metilació de la quarta CpG d'aquesta regió (CpG4) estava correlacionada positivament amb la concentració de les partícules LDL, les LDL mitjanes i les LDL petites. La regió de l'intró 10 estava hipermetilada i no es va associar a cap variable lipídica/lipoproteica. Tant el rs540796 com el rs483462 s'associaven a un 30% menys de TG i un 40% menys de VLDL i les seves subfraccions (grans, petites i mitjanes). El R46L es va associar, per primer cop, a nivells un 30% inferiors de partícules LDL totals, mitjanes i petites. A més, els individus portadors del rs540796 i/o rs483462 amb una metilació CpG4<14% estaven més representats al grup amb un perfil lipoproteic normal en comparació del grup amb DA.

CONCLUSIÓ: La baixa metilació de la CpG4 de *PCSK9* s'associa a una disminució de les partícules LDL totals i petites, mentre que les variants rs540796 i rs483462 protegeixen contra TG elevats, que és la principal característica lipídica dels pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.

Two PCSK9 variants associated with lower concentrations of TG-rich lipoproteins and methylation in the promoter modulate atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes and the metabolic syndrome

Iris Oliva¹, Montse Guardiola^{1*}, Marta Sánchez², Joan-Carles Vallvé¹, Núria Plana¹, Daiana Ibarretxe¹, Marta Gonzalo¹, Jesús Castan¹, Anna Trinidad¹, Júlia Pàmies¹, Lluís Masana¹, David Monk², Josep Ribalta¹.

¹ Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, CIBERDEM, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain.

² Imprinting and Cancer Group, Epigenetics and Cancer Biology Program (PEBC), Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), Av. Gran Vía de l'Hospitalet 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

*** CORRESPONDING AUTHOR:**

Montse Guardiola, PhD

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,

Universitat Rovira i Virgili,

Sant Llorenç 21, 43201 Reus

Spain

Tel: (+34) 977 759367

Fax: (+34) 977 759322

E-mail: montse.guardiola@urv.cat

ABSTRACT

BACKGROUND: PCSK9 is among the strongest regulators of LDL concentration. Conversely, diabetic patients tend to have increased TG, low HDL and increased concentration of small LDL and HDL particles (atherogenic dyslipidemia (AD)). Paradoxically, although these patients have normal LDL, we demonstrated that PCSK9 promotes AD.

OBJECTIVE: To test whether the relation between PCSK9 and AD is genetically and/or epigenetically predisposed.

METHODS: We studied in 281 patients the relation between 9 lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance and *PCSK9* genetics and epigenetics. DNA methylation patterns were studied in the promoter and intron 10 and were analyzed by pyrosequencing. Fourteen tag SNPs were genotyped together with the variant R46L. Analyses were adjusted for age, gender and BMI.

RESULTS: The region in the promoter is hypomethylated, and the methylation at the 4th CpG is positively correlated with particle concentration of total LDL, medium LDL and small LDL. The region in intron 10 is hypermethylated; however, the region is not associated with any lipid parameter. Both rs540796 and rs483462 were significantly associated with a decrease of 30% in TG and of 40% in total VLDL and all of its subfractions. As expected, R46L polymorphism is significantly associated with 44% less circulating PCSK9 and 27% lower LDL cholesterol, and we determined that the polymorphism is also associated with 30% lower levels of total, medium and small LDL particles.

CONCLUSIONS: Low PCSK9 promoter methylation is associated with decreased LDL. We identified rs540796 and rs483462 as protecting against elevated TG, which is the primary lipid feature of patients with metabolic disturbances.

KEYWORDS: *PCSK9*, DNA methylation, tag SNPs, lipoprotein profile, atherogenic dyslipidemia

INTRODUCTION

The proprotein convertase subtilisin/Kexin type 9 gene (*PCSK9*) encodes PCSK9, which is mainly produced in liver and intestine and secreted into the circulation where it regulates LDL receptor (LDLR) degradation¹. Gain-of-function variants in *PCSK9* result in a decrease of LDLR on the cell surface and are associated with higher cholesterol levels, while loss-of-function variants increase the number of LDLR on the cell surface leading to low cholesterol levels². In this sense, PCSK9 has been identified as one of the main regulators of cholesterol homeostasis. We and others have also reported that circulating PCSK9 positively correlates with atherogenic dyslipidemia (AD) in patients with high cardiovascular risk presenting with diabetes, obesity and metabolic syndrome^{3,4}.

AD is characterized by atherogenic quantitative, qualitative and kinetic changes of plasma lipids (namely, large VLDL particles, remnant lipoproteins, and small and dense LDL particles) together with a diminution of LDL turnover and a decrease in HDL particle functionality⁵. This type of dyslipidemia is characteristic of patients with type 2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome, who present high cardiovascular risk due to AD's proatherogenic lipoprotein profile while commonly showing normal cholesterol levels^{6,7}. Lipid parameters are influenced by genetic and environmental factors that explain 25-30% of genetic plasma heritability^{8,9}. Genome-wide association studies have identified variants that explain ~12% of such variability. The remaining corresponds to variants not identified to date, epistasis (gene-gene interactions) or epigenetic modifications¹⁰.

Recently, we and others have provided evidence regarding the role of DNA methylation in dyslipidemia¹¹⁻¹³.

We aim to characterize the genetic and epigenetic contribution of the *PCSK9* gene in the atherogenic dyslipidemia of the diabetic patient.

METHODS

Study population

We included 281 high cardiovascular risk patients among those subjects attending the Vascular Medicine and Metabolism Unit of the Sant Joan University Hospital in Reus. The ATPIII criteria were used to define the presence of metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Patients were middle-aged, and those presenting any of the following conditions were excluded: prior coronary heart disease; cerebral or peripheral vascular disease; and cancer, hepatic, renal, lung, endocrine or inflammatory chronic diseases.

Patients on lipid-lowering drugs had a washout period of 6 weeks (8 weeks if they were receiving fibrates). Anamnesis and physical examination were recorded.

The Hospital Ethical Committee approved the study, and all patients gave their written consent to participate. Data were coded for anonymity in accordance with current Spanish law on biomedical research.

Blood samples collection and storage

A blood sample of each individual was obtained after overnight fasting. The cellular buffy coat was obtained and stored at -80°C until DNA analyses were performed. DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Madrid, Spain).

Biochemical analyses

Total cholesterol (TC), HDL cholesterol (HDLc), LDL cholesterol (LDLc), triglycerides (TG), apolipoprotein B100 (apoB100) and apolipoprotein A-I (apoA-I) were measured using standard enzymatic and colorimetric techniques adapted to a Cobas Mira autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). Remnant-like particle cholesterol (RLPc) was measured in plasma using RLP-Cholesterol Assay Kits (Jimro-II, Japan Immunoresearch Laboratories, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions ¹⁴.

Lipoprotein profile characterization

All samples were subjected to the Liposcale test. This advanced lipoprotein test is based on 2D diffusion-ordered 1-H^+ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. This method adds diffusion coefficients to classical NMR determinations to provide a direct measure of mean particle size and number for each lipoprotein fraction. This technique also provides mean particle size and concentration of three subfractions (large, medium and small) of each lipoprotein class ¹⁵.

Methylation patterns

We used the USCS Server (<http://genome.ucsc.edu/>) to select regions of interest within the *PCSK9* gene. We identified a CpG Island (CGI) in the gene promoter, a key region of genetic transcription control, and a region in intron 10 likely to be regulating histone methylation (supplemental figure 1).

Bisulfite PCR and sequencing

Approximately $1\ \mu\text{g}$ of DNA was subjected to sodium bisulfite treatment and purified using the EZ GOLD methylation kit (Zymo Research, Orange, CA). Bisulfite-specific primers for the promoter were used with Hotstar Taq polymerase (Qiagen, West Sussex,

UK) for 40 nested-PCR cycles. PCR products were purified with ExoSAP-IT (Affymetrix, High Wycombe, UK) and using the BigDye Terminator v3.1 mastermix (Life Technologies, Madrid, Spain) were amplified for 30 sequencing PCR cycles. The sequencing PCR product was purified with CleanSeq and sequenced in a 3500 Series Genetic Analyzer (Life Technologies, Madrid, Spain) following the Sanger method. All primers for bisulfite PCR can be observed in supplementary table 1.

Methylation pyrosequencing

Standard bisulfite PCR was used to amplify regions of interest; the characteristic was that one primer was biotinylated. The entire biotinylated PCR product (diluted to 40 μ L) was mixed with 38 μ L of binding buffer and 2 μ L (10 mg/mL) streptavidin-coated polystyrene beads. Bead-amplicon complexes were captured on a vacuum prep tool (Qiagen, West Sussex, UK), and the PCR products were denatured using 0.2 mol/L NaOH. The denatured DNA was re-suspended in 40 μ L of sequencing primer dissolved in 12 μ L water, and primer annealing was achieved by heating the sample to 80°C for 2 minutes before cooling to room temperature. For sequencing, an internal primer was designed to the complementary strand. The pyrosequencing reaction was performed on a PyroMark Q96 instrument. The peak heights at C/T variants of CpG dinucleotides were determined using pyrosequencing commercial software (Biotage). Primers for methylation pyrosequencing can also be observed in supplemental table 1.

Tag SNP selection and genotyping

Fourteen tag SNPs were selected to encompass the full genetic variability of *PCSK9* gene efficiently using Haploview 4.2 (supplemental figure 1). The R46L variant (rs11591147) was also included in our study.

Thirteen of the 14 tag SNPs were genotyped with predesigned TaqMan SNP Genotyping assays (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and TaqMan Genotyping Master Mix following manufacturer's instructions. The TaqMan SNP genotyping assay was performed in AbiPrism 7900HT Sequence Detection System. Data acquisition and analysis were performed using the allelic discrimination analysis module in SDS v2.4 software (Applied Biosystem, Madrid, Spain).

The restriction fragment length polymorphism technique was used to genotype the rs572512. Briefly, the forward primer 3'-CCT CTC TCC CTT CTC CAT CC-5' and reverse primer 3'-TTC TGC CTC ACA CGA GTC AC-5' were used to amplify a 238 bp fragment using the AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain). PCR conditions were as follows: 5 min at 95°C; 35 cycles at 95°C for 30 s, 59°C for 30 s and 72°C for 30 s; and, finally, 72°C for 7 min. *Hin*PI restriction enzyme (New England Biolabs,

Ipswich, UK) digested the amplification product, and it was subsequently analyzed by gel electrophoresis.

R46L genotyping was performed by CEGEN (Spanish National Genotyping Center) using the Sequenom MassARRAY platform.

Statistical analysis

Following the latest published data about methylation levels in lipid-related genes, we calculated the optimal minimum sample size of 110 subjects to detect methylation differences of 10% and 8% of the standard deviation with a statistical power of 80%.

Pyrosequencing results are expressed as a percentage of methylation ranging from 0% (unmethylated) to 100% (fully methylated) at each CpG position. TG-related and other variables such as PCSK9 plasma levels, which did not follow a normal distribution (tested by Kolmogorov-Smirnov), were log transformed. Relationships between lipid-related variables and methylation values were determined by partial correlations that considered a p-value of <0.05 to be significant. Allele frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium of SNPs distributions were estimated by the Chi-square analyses. Associations between lipid variables and methylation values with genotypes were evaluated using ANOVA and a Bonferroni-corrected p-value adjusted by the number of SNPs tested, where alpha was set to $0.05/15=0.003$. We created the categorical variable risk of AD, which denotes the number of proatherogenic risk factors (top tertile of large VLDL and/or top tertile of small LDL and/or top tertile of small HDL) from 0 to 3 that each individual presents with. Linear regression models were used to evaluate lipoprotein profile variability. Significant differences between models were assessed by changes in R^2 in a stepwise block model. All statistical analyses were adjusted for age, gender and BMI. The SPSS package version 23.0 (IBM, Madrid, Spain) was used throughout.

RESULTS

Patients

Our study included 281 middle-aged dyslipidemic patients at high cardiovascular risk with metabolic alterations, such as diabetes (67%), obesity (52%) or metabolic syndrome (75%). The patients' baseline characteristics are presented in Table 1. As expected, our study population of metabolic patients presented a higher percentage of men, they were older, and were overweight/obese.

PCSK9 methylation

We analyzed a total of 6 CpGs located in two *PCSK9* regions: four CpGs in the CGI of the promoter region and 2 CpGs in intron 10. The global methylation of the regions and methylation levels of individual CpGs are depicted in supplemental table 2. The CpGs of each region showed a good correlation among them but not between regions (supplemental figure 1). Methylation at the two regions did not correlate with circulating PCSK9 levels.

CGI in the promoter region was hypomethylated with a methylation variability ranging from 6% to 53% (median: 16.0%, IQR: 6.8%). Global methylation at the full CGI did not correlate with any lipid parameter. We then tested each CpG individually. The 4th CpG (CpG4, ch1:55,277,817-55,277,818) within this region was significantly correlated with lipid parameters, being positively correlated with the particle concentration of total LDL ($r=0.139$, $p=0.03$), medium LDL ($r=0.139$, $p=0.03$) and small LDL ($r=0.128$, $p=0.04$). Individuals above the threshold of 14% methylation (median of total distribution) had a higher atherogenic profile than those below the threshold. Those subjects with lower methylation levels at the 4th CpG presented with 10% significantly less plasma total cholesterol ($p=0.04$), 14% less total LDL particles ($p=0.02$), and a 19% decrease in medium and small LDL particles ($p=0.03$ and $p=0.02$, respectively) compared to individuals with higher methylation levels (Table 2).

The region in the intron 10 region was hypermethylated with levels ranging from 44 to 92% (median: 72.9%, IQR: 5.8%). This region and its two CpGs showed no significant correlation with any circulating lipid or lipoprotein parameter.

PCSK9 polymorphisms

We analyzed 14 tag SNPs of *PCSK9* in order to encompass the full genetic variability of the gene, together with the R46L genetic variant because of its large effect on cholesterol, cardiovascular risk and PCSK9 plasma levels. Our results showed that *PCSK9* genetic variability is associated with changes in the lipoprotein profile beyond LDL in DM2/MS subjects, as we have identified two new SNPs associated with lower TG (Figure 1).

Carriers of rs540796 located in exon 9 of *PCSK9* had 31% less plasma TG levels ($p=0.002$) compared to WT. This finding is also accompanied by a 26% diminution in RLPc levels ($p=0.016$), although this significance was lost after Bonferroni adjustment for multiple tests. SNP carriers also presented a 41% lower total VLDL particle concentration ($p=0.002$) and a decrease in all of its subfractions (35% of large VLDL, $p=0.002$; 40% of medium VLDL, $p=0.001$; 41% of small VLDL, $p=0.002$) compared to WT (Figure 1). This effect on TG is supported by the observation that carriers of rs540796

are significantly more represented in the lowest tertiles of TG and large VLDL ($p=0.012$ and $p=0.005$, respectively) than the highest (Figure 2). Associations between rs540796 and the complete lipid and lipoprotein profile are depicted in supplemental table 3.

Rs483462 in intron 10 was also significantly associated with a decrease in TG-related parameters. Carriers had 35% less circulating TG ($p=0.002$) and a decrease in all VLDL-related parameters determined by NMR (-42% total VLDL particles, $p=0.002$; -36% large VLDL, $p=0.002$; -40% medium VLDL, $p=0.001$; -42% small VLDL, $p=0.002$) compared to WT (Figure 1). Carriers of rs483462 are also significantly more represented in the lowest tertiles of TG and large VLDL ($p=0.030$ and $p=0.009$, respectively) than the highest (Figure 2). Associations between rs483462 and the complete lipid and lipoprotein profile are depicted in supplemental table 3.

Carriers of the rare allele of the R46L presented a 27% decrease in LDLc levels ($p=0.001$), 24% less of apoB100 ($p=0.001$), a diminution of 44% in circulating PCSK9 ($p<0.001$) and 11% lower TC plasma levels ($p=0.006$, though this significance was lost after Bonferroni adjustment for multiple tests) compared to WT. Being a carrier of the L allele is associated with 34% less total LDL particles ($p=0.002$) and diminutions in its smallest subfractions (33% medium LDL, $p=0.003$; 36% small LDL, $p=0.002$) compared to WT (Figure 1). Associations between R46L and the complete lipid and lipoprotein profile are depicted in supplemental table 3.

The other studied SNPs did not show significant associations with circulating PCSK9, traditional lipid parameters or lipoprotein profile in our DM2/MS population.

Influence of PCSK9 genetic and epigenetic variability on atherogenic dyslipidemia

As we identified two SNPs affecting VLDL and methylation levels affecting small LDL, we aimed to explore whether genetic and epigenetic variability at *PCSK9* had an influence developing atherogenic dyslipidemia (AD).

We defined subjects with AD as those simultaneously being at the top tertile for large VLDL, small LDL and small HDL particle concentrations. The rest were considered "no AD" for this analysis.

As depicted in figure 3, the two new SNPs and methylation in the promoter region contribute significant to the development of AD.

DISCUSSION

PCSK9 was discovered in 2003 and reported that it has a crucial role as a regulator of LDL receptor turnover¹. The LDLR binds LDL lipoproteins and removes them from the circulation by endocytosis through a clathrin-dependent mechanism. In the endosomes, their acidic pH causes LDLR to dissociate from LDL. LDLR recycles to the cell surface, while the LDL particle is degraded in lysosomes and the recovered cholesterol is now able to be used by the cell. The LDLR bound to PCSK9 is also endocytosed by a clathrin-dependent mechanism, but the strength of the binding is increased at acidic pH in the endosomes, and instead of recycling, the entire complex reaches the lysosome, where it is degraded. Consequently, PCSK9 avoids recycling of the LDLR to the cell surface, thereby lowering LDL clearance and finally leading to hypercholesterolemia. Shortly after its discovery in 2003, it was reported that gain-of-function PCSK9 mutations are associated with hypercholesterolemia and increased cardiovascular risk. Conversely, loss-of-function mutations are linked to low LDLc levels and reduced cardiovascular risk, and for example, the rare allele in the R46L variant lowers LDLc levels and is associated with a 50% reduction in CHD; therefore, this genetic variant confers protection against CHD. For that reason, PCSK9 has been proposed to be one of the main regulators of circulating LDLc.

PCSK9, apart from LDLR, can target other LDLR family members, such as APOER2, VLDLR or the LRP, which are receptors involved in the uptake and clearance of TG-rich lipoproteins. Following this result, we described that circulating PCSK9 levels significantly and positively correlate with plasma lipid and lipoproteins associated with atherogenic dyslipidemia (TG, large VLDL, small LDL and small HDL particles)³, which are results confirmed by others⁴. In this scenario, since the effect of *PCSK9* on cholesterol levels is highly regulated by genetics, our aim now was to determine whether this relation between PCSK9 and AD was genetically or epigenetically predisposed. For that purpose, we analyzed the methylation level in two regions of *PCSK9* and we genotyped 14 tag SNPs together with R46L to fully encompass the genetic variability in patients with DM2 and metabolic syndrome who present with DA. Our results clearly show that both genetics and epigenetics of *PCSK9* influence not only plasma LDLc but also TG levels in these type of patients, as we have identified two SNPs specifically affecting TG metabolism, while methylation at the promoter specifically regulates LDL metabolism.

DNA methylation levels in key genes of lipid metabolism have been related to plasma lipid levels in both candidate-gene and epigenome-wide association studies (EWAS). For example, hypermethylation of the CGI in exon 3 of *APOA5* is positively related to

increased plasma TG levels, BMI and high VLDL particles concentration in patients with hypertriglyceridemia ¹¹. EWAS on lipids have also identified new CpG sites within *CPT1A*, *ABCG1* and *SREBF1* genes to be highly associated with TG ¹⁶. These studies clearly show the importance of DNA methylation as a plasma lipid modulator, although the causal relationship between methylation and lipid levels remains unexplained.

To the best of our knowledge, this report describes the first time that *PCSK9* methylation patterns are analyzed. In our case, we studied two methylable regions possibly implicated in *PCSK9* expression regulation; a CGI in the promoter and a histone modification regulation region in the intron 10. We reported that high methylation levels at CpG4 within the CGI-analyzed region is positively correlated with higher total LDL, medium LDL and small LDL particle concentrations. We also identified the 14% of methylation in CpG4 as a threshold in which patients with fewer methylation levels present an antiatherogenic LDL lipoprotein profile, characterized by less total, medium and small LDL particle levels. This CpG4-14% methylation threshold could be a result of intraindividual differences in lifestyle, which can alter DNA methylation levels ¹⁷. CpG4 is located in the active transcription factor binding flanking region of *SREBP1*, a master regulator of *PCSK9* transcription ¹⁸.

The lack of association between *PCSK9* methylation patterns and the protein circulating levels could be explained by tissue differences; *PCSK9* is expressed primarily in the liver, but in our study, we used blood cells although it has been well-established that methylation patterns are tissue-specific. However, EWAS on lipids showed that CpG methylation changes in adipose tissue and skin biopsies are also observed in whole blood ¹⁹, which suggests that blood cells would be representative of methylation modifications in hard-to-access tissues, such as the liver.

To study the full genetic variability of *PCSK9*, we followed a tag SNP-genotyping approach and investigated associations with lipid and lipoprotein profiles. In our case, we have described for the first time the relation between two *PCSK9* tag SNPs, the rs540796 and rs483462, with TG-related lipoprotein profile variables. Both rs540796 and rs483462 are associated with lower TG levels and concentration of total VLDL particles and all of its subfractions, which promotes an antiatherogenic lipoprotein profile, and carriers are more represented in the lower tertiles of TG levels and large VLDL than in the highest. Rs540796 is a synonymous variant, which as a tag SNP could reflect the effect of rs562556 (I474V). I474V is a missense variant that induces an amino acid substitution predicted to affect protein function. It has been associated with 10% plasma LDLc level reduction ^{20,21}. Rs483462 is an intronic variant located in a region of histone regulation, but its mechanism of action has not been described yet.

Several of the SNPs selected in our study have been previously associated with LDL in the general population, which is a phenomenon that we do not observe in our DM2/SM population; rs2479409 has been associated with total and LDLc by GWAS ^{8,9}, rs4927193 tags the effect of A53V, which is a loss-of-function variant related to LDLc levels of <25th percentile ²⁰ and rs505151 (E670G) has been associated with higher levels of TC, LDLc and atherosclerosis progression ²². Although an effect due to sample size cannot be ruled out, our understanding is that a major factor in this study is the nature of the population studied with a background of altered TG metabolism.

In this respect, although PCSK9 is mainly related to plasma LDLc, in the last several years, data about how PCSK9 influence TG-related variables have been raised. For example, studies have suggested that intracellular PCSK9 could promote hepatic storage of TG or prevent apolipoprotein B100 from its degradation, promoting the synthesis of VLDL which results in raising TG plasma levels ^{23,24}. Nevertheless, it is thought that the association between PCSK9 and TG is principally due to its capacity to bind and regulate not only LDLR but other members of its family such as VLDL receptor or APOE receptor 2 ²⁵.

We also added R46L to the study. As expected, R46L is associated with diminutions in LDLc, apoB100 and circulating PCSK9 levels. In addition, we observed an antiatherogenic effect on LDL profile due to a diminution of small LDL particle concentration. These results are in accordance with a recently published study in which R46L was associated with an antiatherogenic lipoprotein profile ²⁶.

CONCLUSIONS

In patients with diabetes, obesity and metabolic syndrome, we identified two variants (rs540796 and rs483462) associated with low TG and VLDL particle concentration. However, methylation at the *PCSK9* promoter is associated with the concentration of small LDL particles. Both genetic characteristics modulate atherogenic dyslipidemia in these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (PI12/01766), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and CIBERDEM (CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas), which are initiatives of ISCIII (Instituto de Salud Carlos III). IO is a recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya and the Social European Fund (grant number 2016 FI_B1 00139).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

TABLES

Table 1. Baseline characteristics

	All, n=281
Age, years	56.08 (11.26)
Female sex, %	134 (47.3)
Body mass index, kg/m ²	31.45 (6.66)
HbA1c, %	6.50 ±2.00
Glucose, mmol/L	7.50 ±3.00
PCSK9, ng/ml	325.63 ±165.19
RLP cholesterol, mg/dL	10.27 ±10.81
Total cholesterol, mmol/L	5.64 (1.39)
LDL cholesterol, mmol/L	3.47 (1.20)
HDL cholesterol, mmol/L	1.45 (0.33)
Triglycerides, mmol/L	1.64 ±2.06
ApoB100, mg/dL	107.75 (27.49)
ApoAI, mg/dL	135.64 (12.96)

Data are presented as the mean (SD) for continuous variables with a normal distribution, or median± interquartile range for continuous variables with a non-normal distribution, or number (percentage) for categorical variables. HbA1c, glycosylated haemoglobin; RLP, remnant-like particles; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; ApoB100, apolipoprotein B100; ApoAI, apolipoprotein AI.

Table 2. 14% threshold of promoter CpG4 methylation, plasma lipids and NMR lipoprotein profile

	Methylation <14% (n=144)	Methylation ≥14%, (n=111)	Δ, %	p
<i>Plasma lipid</i>				
Triglycerides, mmol/L	1.48 ±2.20	1.75 ±2.22	-15.4	0.39
RLP cholesterol, mg/dL	16.42 ±16.71	16.07 ±17.84	2.2	0.60
Cholesterol, mmol/L	5.56 (1.34)	6.17 (1.32)	-9.9	0.04
LDL cholesterol, mmol/L	3.44 (1.21)	3.77 (1.20)	-8.7	0.19
HDL cholesterol, mmol/L	1.44 (0.36)	1.50(0.32)	-4	0.08
ApoB100, mg/dL	117.90 (35.72)	132.73 (39.31)	-11.2	0.24
ApoAI, mg/dL	138.19 (29.05)	146.79 (25.23)	-5.9	0.56
<i>Lipoprotein subclass</i>				
VLDL-P, mmol/L	52.14 ±103.25	58.75 ±81.36	-11.3	0.12
Large VLDL, mmol/L	1.69 ±2.73	2.07 ±2.16	-18.3	0.08
Medium VLDL, mmol/L	7.93 ±13.11	8.59 ±10.57	-7.7	0.14
Small VLDL, mmol/L	42.60 ±86.68	49.60 ±68.71	-14.1	0.12
LDL-P, mmol/L	914.23 (384.68)	1062.46 (475.83)	-13.9	0.02
Large LDL, mmol/L	117.85 (52.35)	132.73 (63.88)	-11.2	0.07
Medium LDL, mmol/L	297.26 ±179.34	367.7 ±197.17	-19.2	0.03
Small LDL, mmol/L	430.04 ±262.16	533.51 ±277.64	-19.4	0.02
HDL-P, μmol/L	24.86 ±8.97	25.33 ±8.88	-1.9	0.08
Large HDL, μmol/L	0.15 ±0.08	0.15 ±0.08	0	0.34
Medium HDL, μmol/L	6.73 ±3.91	6.60 ±4.74	1.9	0.95
Small HDL, μmol/L	17.77 ±6.11	18.23 ±5.03	-2.5	0.03
<i>Lipoprotein size</i>				
VLDL size, nm	42.42 ±0.83	42.51 ±0.85	-0.2	0.96
LDL size, nm	21.07 ±0.26	21.03 ±0.20	0.2	0.58
HDL size, nm	8.18 ±0.13	8.17 ±0.13	0.1	0.91

Data are presented as the mean (SD) for continuous variables with a normal distribution, or median± interquartile range for continuous variables with a non-normal distribution.

RLP, remnant-like particles; ApoB100, apolipoprotein B100; ApoAI, apolipoprotein AI; -P, total particles; VLDL, very low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein. Δ denotes the percentage of the difference between methylation

FIGURES

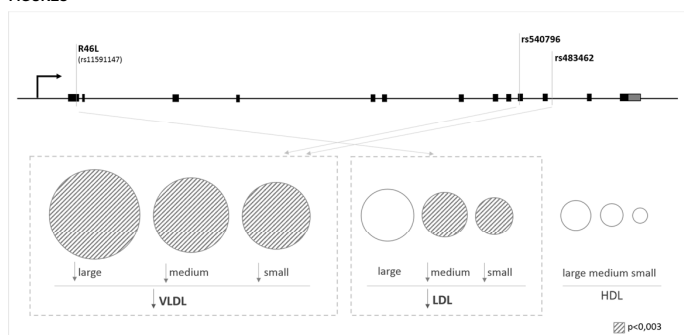


Figure 1. R46L is significantly associated with LDL particle decreases (total LDL, medium and small particles), while rs540796 and rs483462 are significantly associated with VLDL particle diminution.

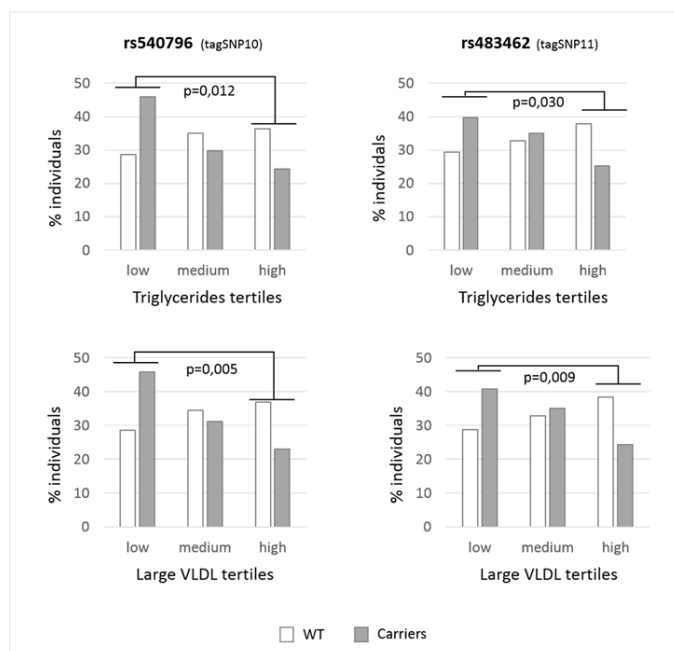


Figure 2. Carriers of rs540796 and rs483462, respectively, are overrepresented in the lowest tertile of TG and large VLDL levels compared to WT. White bars represent the percentage of WT in each group. Gray bars represent the percentage of carriers in each group. P-values denote the significant difference between low and high tertiles.

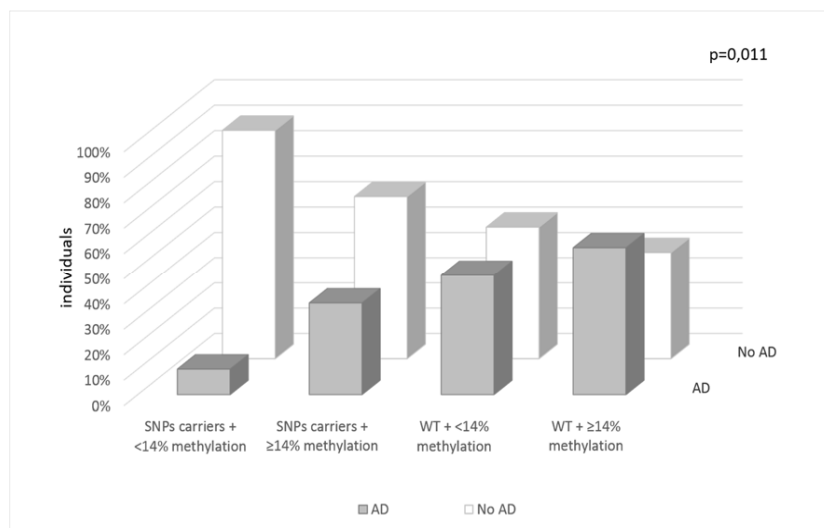
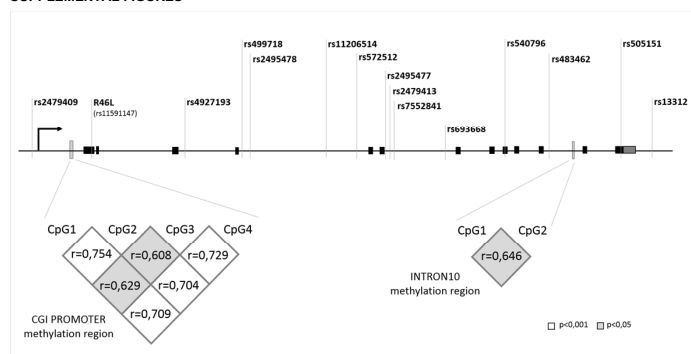


Figure 3. Carriers of rs540796 and/or rs483462 with CpG4 methylation <14% are overrepresented in the no AD lipoprotein profile, while WT from both SNPs with CpG methylation $\geq 14\%$ are more present in the AD group. White bars represent the no AD lipoprotein profile group. Gray bars represent the AD group. P-value denotes the statistical significance of the model.

SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental figure 1. Studied DNA methylation regions and polymorphism gene locations. Correlation among CpGs of each methylable region are also depicted.

REFERENCES

1. Abifadel M, Varret M, Rabès J-P, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34(2):154-156. doi:10.1038/ng1161.
2. Benjannet S, Hamelin J, Chr??tien M, Seidah NG. Loss- and gain-of-function PCSK9 variants: Cleavage specificity, dominant negative effects, and low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation. *J Biol Chem.* 2012;287(40):33745-33755. doi:10.1074/jbc.M112.399725.
3. Guardiola M, Plana N, Ibarretxe D, et al. Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidaemia in patients with high cardiovascular risk. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(12):877-882. doi:10.1042/CS20140832.
4. Ibarretxe D, Girona J, Plana N, et al. Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes and related metabolic disorders. *Clin Investig Arterioscler.* 28(2):71-78. doi:10.1016/j.arteri.2015.11.001.
5. Vergés B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia.* 2015;58(5):886-899. doi:10.1007/s00125-015-3525-8.
6. Valensi P, Avignon A, Sultan A, Chanu B, Nguyen MT, Cosson E. Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15(1):104. doi:10.1186/s12933-016-0415-4.
7. Bosomworth NJ. Approach to identifying and managing atherogenic dyslipidemia: A metabolic consequence of obesity and diabetes. *Can Fam Physician.* 2013;59(11). doi:59/11/1169 [pii].
8. Global Lipids Genetics Consortium, Willer CJ, Schmidt EM, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* 2013;45(11):1274-1283. doi:10.1038/ng.2797.
9. Teslovich TM, Musunuru K, Smith A V, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):707-713. doi:10.1038/nature09270.
10. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-753. doi:10.1038/nature08494.
11. Oliva I, Guardiola M, Vallvé J-C, et al. APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate circulating triacylglycerol levels. *Clin Sci (Lond).* 2016;130(22):2053-2059. doi:10.1042/CS20160433.
12. Guay SP, Brisson D, Lamarche B, et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: New molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis.* 2013;228(2):413-420. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.033.

13. S.-P. G, G. V, D. B, J. M, B. L, D. G. Epigenome-wide analysis in familial hypercholesterolemia identified new loci associated with high-density lipoprotein cholesterol concentration. *Epigenomics*. 2012;4(6):623-639. doi:10.2217/epi.12.62; 10.2217/epi.12.62.
14. Nakajima K, Saito T, Tamura A, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta*. 1993;223(1-2):53-71.
15. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1 H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56(3):737-746. doi:10.1194/jlr.D050120.
16. Braun KVE, Dhana K, de Vries PS, et al. Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):15. doi:10.1186/s13148-016-0304-4.
17. Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol*. 2012;863:359-376. doi:10.1007/978-1-61779-612-8_23.
18. Jeong HJ, Lee H-S, Kim K-S, Kim Y-K, Yoon D, Park SW. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res*. 2007;49(2):399-409. doi:10.1194/jlr.M700443-JLR200.
19. Pfeiffer L, Wahl S, Pilling LC, et al. DNA Methylation of Lipid-Related Genes Affects Blood Lipid Levels. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(2):334-342. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000804.
20. Mayne J, Ooi TC, Raymond A, et al. Differential effects of PCSK9 loss of function variants on serum lipid and PCSK9 levels in Caucasian and African Canadian populations. *Lipids Health Dis*. 2013;12(1):70. doi:10.1186/1476-511X-12-70.
21. Ng PC, Levy S, Huang J, et al. Genetic variation in an individual human exome. *PLoS Genet*. 2008;4(8). doi:10.1371/journal.pgen.1000160.
22. Chen SN, Ballantyne CM, Gotto AM, Tan Y, Willerson JT, Marian AJ. A common PCSK9 haplotype, encompassing the E670G coding single nucleotide polymorphism, is a novel genetic marker for plasma low-density lipoprotein cholesterol levels and severity of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1611-1619. doi:10.1016/j.jacc.2005.01.051.
23. Sun H, Samarghandi A, Zhang N, Yao Z, Xiong M, Teng BB. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(7):1585-1595. doi:10.1161/ATVBAHA.112.250043.
24. Ruscica M, Ferri N, Macchi C, et al. Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9. *Ann Med*. 2016;48(5):384-391. doi:10.1080/07853890.2016.1188328.

25. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem*. 2008;283(4):2363-2372. doi:10.1074/jbc.M708098200.
26. Verbeek R, Boyer M, Boekholdt SM, et al. Carriers of the PCSK9 R46L variant are characterized by an antiatherogenic lipoprotein profile assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy - Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(1):43-48. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307995.

*Polymorphisms predisposing Alzheimer's disease also
influence lipoprotein profile in patients with metabolic
disturbances.*

Iris Oliva, Montse Guardiola, Annabel Pellicer, Iris Alemany, Núria Plana,
Marcel Rosich, Maria Jesús Bullido, Lluís Masana, Elisabet Vilella *and* Josep
Ribalta.

Submitted (2017)

Actualment, les evidències del fet que les alteracions en el metabolisme de la insulina contribueixen al desenvolupament de l'Alzheimer (malaltia neurodegenerativa basada en el deteriorament cognitiu) han incrementat ràpidament. Ja s'ha demostrat que la DT2 és un factor de risc per a l'Alzheimer i, malgrat que els mecanismes subjacents romanen desconeguts, es creu que la DT3 podria ser el nexa en comú entre ambdues patologies. Per altra banda, l'Alzheimer i la DT2 comparteixen un perfil lipídic alterat, el qual està fortament influenciat pels mateixos gens: per exemple, variants en el gen *APOE* o *PLA2G3*.

Davant aquest fet, la nostra hipòtesi es va basar en el fet que els gens que predisposen a l'Alzheimer també podien regular el perfil lipídic en pacients amb alt risc cardiovascular. Per provar-ho, vam iniciar l'estudi amb una població de descoberta formada per 330 pacients amb deteriorament cognitiu i 168 controls. Vam genotipar en la població 48 variants que predisposen a l'Alzheimer i vam buscar associacions amb els nivells plasmàtics de colesterol RLP (cRLP). Vam seleccionar les 5 variants associades a cRLP i vam comprovar aquests resultats en una població de replicació composta per 281 pacients amb DT2 o síndrome metabòlica. En aquesta segona població, vam estudiar l'efecte de les 5 variants sobre el perfil lipídic/lipoproteic i la mesura del gruix íntima-media carotídi com a mesura de desenvolupament arterioscleròtic subclínic.

Les 5 variants associades a cRLP en la població de deteriorament cognitiu eren el rs3025786 (gen *PSEN1*), el rs27023435 (gen *PVRL2*), el rs1789072 (gen *DSC1*), el rs3788428 (gen *PLA2G3*) i el rs1049296 (gen *TF*). En la població amb alt risc cardiovascular, el rs3025786 i rs27023435 s'associaven a una disminució dels TG, amb un 30% menys de partícules VLDL totals i totes les seves subfraccions. El rs1789072 s'associava a un increment del 27% de colesterol, 38% de cLDL i amb un 30% més de partícules LDL i les seves subfraccions més petites (mitjanes i petites). El rs3788428 s'associava a nivells un 7% més baixos del gruix íntima-media carotídi. El rs1049296 s'associava a cap variable lipídica o d'arteriosclerosi.

CONCLUSIÓ: 3 variants que predisposen a l'Alzheimer podrien modular també característiques del perfil lipoproteic de DA, típic en pacients amb alt risc cardiovascular. Aquests resultats contribueixen a identificar noves variants associades a un perfil lipoproteic aterogen.

Polymorphisms predisposing to Alzheimer's disease also influence lipoprotein profile in patients with metabolic disturbances

Iris Oliva¹, Montse Guardiola^{1*}, Annabel Pellicer¹, Iris Martínez¹, Núria Plana¹, Marcel Rosich², Maria Jesús Bullido³, Lluís Masana¹, Elisabet Vilella^{2,4}, Josep Ribalta¹

1 Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, CIBERDEM, Reus, Spain

2 Hospital Universitaria Institut Pere Mata, IISPV, URV. Reus, Spain

3 Centro Severo Ochoa, Universidad Auòdnoma de Madrid.

4 CIBERSAM, Reus, Spain.

CORRESPONDING AUTHOR:

Montse Guardiola, PhD

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili,

Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

Tel.: (+34) 977 759367

Fax: (+34) 977 759322

E-mail: montse.guardiola@urv.cat

ABSTRACT

BACKGROUND: Alzheimer's disease (AD) and Type 2 diabetes mellitus (T2DM) share an abnormal lipid profile, glucose impairment, and a common genetic background. Our aim was to test whether genes predisposing to AD could also influence lipid metabolism in patients with metabolic syndrome.

METHODS: We assessed the association of 48 SNPs predisposing to AD with remnant-like particle cholesterol (RLPc) levels in a discovery population composed of controls and patients with cognitive impairment (n=498), and we confirmed the effect on lipid and lipoprotein profile assessed by nuclear magnetic resonance (NMR) in a replication population composed of T2DM, obesity and/or metabolic syndrome patients (n=281).

RESULTS: Rs305786 (in *PSEN1*), rs73572039 (in *PVRL2*), rs1789072 (in *DSC1*), rs3788428 (in *PLA2G3*) and rs1049296 (in *TF*) are associated with diminutions in RLPc levels ranging from 11 to 46% in the discovery population. In the replication population, carriers of the rare allele of rs305786 have 25% lower circulating TG levels, 42% less total VLDL particles and lower levels of all of their subfractions compared to wild type individuals. Carriers of rs27023435 showed a decrease of 25% in the concentration of total VLDL particles and their subfractions compared to WT individuals. Carriers of both rare alleles of rs1789072 presented an increment of total cholesterol of 27%, LDLc of 38%, ApoB100 of 25%, LDL particles of 30% and its smallest subfraction (47% of small LDL) compared to WT or heterozygous individuals. Rs3788428 carriers have 7% lower intima-media thickness and are 10% more represented among individuals with absence of plaque than those without. Rs1049296 was not associated with any of the studied variables.

CONCLUSION: We have identified five polymorphisms predisposing to AD that in turn modulate lipoprotein profile in subjects with obesity, metabolic syndrome or T2DM.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, polymorphism, lipoprotein profile, atherogenic dyslipidemia.

INTRODUCTION

Currently, there is rapid growth in the literature pointing toward insulin resistance as a mediator of Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration, supporting the hypothesis that AD is a metabolic disease [1]. Insulin resistance is associated with impairments in glucose metabolism, disrupted brain energy balance, increasing oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) production, DNA damage and mitochondrial dysfunction driving pro-apoptosis, pro-inflammatory, and pro-A β PP-A β cascades (reviewed in [2]). AD could thus be regarded as type 3 diabetes (T3DM), a brain disorder that has composite features of type 2 diabetes mellitus (T2DM) [3].

It is known that the prevalence of developing mild cognitive impairment (MCI) or AD is higher in individuals with T2DM than in nondiabetics [4], but the mechanisms that underlie T2DM and cognitive impairment remain unclear. AD and T2DM share an abnormal lipid profile based on increased plasma triglycerides (TG) and lower high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels [5,6]. Regarding LDL levels, AD presents with elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels while T2DM usually presents normal levels but with a predominance, in both diseases, of small dense LDL particles (sdLDL) [6–8]. This shared feature highlights the importance of analyzing the lipoprotein profile beyond traditional plasma lipid determinations. Elevated circulating remnant lipoproteins (RLP) are also present in T2DM [9], although this feature has not been studied in AD yet.

Studies have identified a number of genes that play a crucial role in both AD and T2DM development. For example, the $\epsilon 4$ isoform of the *APOE* gene is the most established genetic risk factor for AD [10] and apolipoprotein E (apoE) plays a central role in lipid metabolism since it is recognized by the hepatic receptors and heparin sulfate proteoglycan involved in the clearance of very-low-density lipoproteins (VLDL), chylomicrons (CM) and their remnants [11]. Another example is found in the gene *PLA2G3*; on the one hand, it is involved in neuron damage induced by free radicals and susceptibility to AD [12]. On the other, *PLA2G3* belongs to the human secreted phospholipase A2 family, enzymes that mediate the modification of postprandial lipoproteins such as chylomicrons and their remnants, suggesting a potential functional link with proatherosclerotic processes, and it has also been related to insulin resistance in diabetic patients [13–15].

Since AD and T2DM are both metabolic diseases that share insulin alterations, an abnormal lipid metabolism and have some genetic background, our hypothesis is that genes involved in the pathogenesis of AD could interfere with and modulate plasma lipid and lipoprotein profiles in patients with metabolic disturbances such as T2DM, obesity and/or metabolic syndrome. For that, in a cohort composed of 330 patients with cognitive impairment (AD and MCI patients) and 168 controls (discovery population), we genotyped 48 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) predisposing to AD and looked for associations with RLP cholesterol (RLPc) plasma levels. Then, we selected 5 associated SNPs to confirm these associations in a replication population

composed of 281 patients with metabolic disturbances. In this second population we studied the effects of these 5 SNPs in relation to lipid and RLPc plasma levels, lipoprotein profile and intima-media thickness (IMT) as a subclinical measurement of atherosclerosis development.

METHODS

Discovery population

We studied a sample of 498 subjects; 330 cases and 168 controls. The cases were adults from 55 to 95 years who were diagnosed with mild cognitive impairment (MCI, n=146) or Alzheimer-type dementia (ATD, n=184) according to MMSE results. All patients were recruited in Reus and presented a sporadic form of the disease. The diagnosis has been performed following the NINCDS-ADRA or DSM-IV criteria. Their partners were used as matched-controls and they did not present any sign of dementia according to the Mini-Mental, MEC and WAISCubes tests conducted by the same Neurology and Geriatrics department in which patients were recruited.

Replication population

We included 281 high cardiovascular risk patients among those subjects attending the Vascular Medicine and Metabolism Unit of the Sant Joan University Hospital in Reus. The ATPIII criteria were used to define the presence of metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Patients presenting any of the following conditions were excluded: prior coronary heart disease; cerebral or peripheral vascular disease; and cancer, hepatic, renal, lung, endocrine or chronic inflammatory diseases. Patients on lipid lowering drugs had a wash-out period of 6 weeks (8 weeks if they were receiving fibrates). Anamnesis and physical examination data were recorded.

The Hospital Ethical Committee approved the study and all patients gave their written consent to participate. Data were coded for anonymity in accordance with current Spanish law on biomedical research (RD1716/2011).

Blood sample collection and storage

A blood sample was obtained from each individual after overnight fasting. The cellular buffy coat was obtained and stored at -80°C until DNA analyses were performed. DNA extraction was done with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Madrid, Spain).

Biochemical analyses

In the discovery population, total cholesterol (TC) was measured following standard enzymatic biochemical technique. Total cholesterol, HDL cholesterol (HDLc), LDL

cholesterol (LDLc), TG, Apolipoprotein B100 (APOB100) and Apolipoprotein AI (APOAI) were measured in the replication population using standard enzymatic and colorimetric techniques adapted to a Cobas Mira autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). Remnant-like particle cholesterol (RLPc) was measured in both, discovery and replication populations from plasma samples using RLP cholesterol Assay Kits (Jimro-II, Japan Immunoresearch Laboratories, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions [16].

Lipoprotein profile characterization

Samples from the replication population were subjected to the Liposcale test. This advanced lipoprotein test is based on 2D diffusion-ordered $^1\text{H}^+$ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. This method adds diffusion coefficients to classical NMR determinations to provide a direct measure of mean particle size and number for each lipoprotein fraction. This technique also provides the mean particle size and concentration of three sub-fractions of each lipoprotein class (large, medium and small) [17].

Carotid intima-media thickness determination

We used a My Lab 50 X-Vision sonograph (Esaote SpA, Indianapolis, IN, USA) with a linear array 8–12 MHz transducer ultrasound probe to identify the intima-media complex of the left and right carotid arteries in the replication population. Assessment of carotid intima-media thickness (IMT) was performed by radiofrequency in *in vivo* images. We averaged the measurements of three images each of the left and right carotid arteries to obtain the mean IMT. A plaque was defined as a focal structure that either encroached into the arterial lumen by at least 0.5 mm or 50% of the surrounding IMT value, according to the Mannheim carotid intima-media thickness consensus [18].

Gene selection and genotyping

Based on bibliography, we identified a total of 33 genes predisposing to AD and 48 SNPs were selected to genotype the discovery population (Supplemental Table 1). TaqMan genotyping was done in an AbiPrism 7900HT Sequence Detection System using TaqMan SNP Genotyping assays (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Data acquisition and allelic discrimination analysis were performed using SDS v2.4 software (Applied Biosystem, Madrid, Spain).

In the replication population, we genotyped those SNPs significantly associated with RLPc plasma levels in the discovery population. Rs73572039 (*PVRL2*) and rs1049296 (*TF*) were genotyped using TaqMan methods, and rs1789072 (*DSC1*), rs3788428 (*PLA2G3*) and rs3025786 (*PSEN1*) were genotyped by restriction fragment length

polymorphism (RFLP) technique. Briefly, for the RFLP forward and reverse primers for each region were used to amplify 191 bp, 200 bp and 164 bp fragments, respectively. Amplifications were performed using AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain). A Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems, Madrid, Spain) was used for the PCR. MluCI, BclI and BcoDI restriction enzymes (New England Biolabs, Ipswich, UK) were used to digest the respective amplification product. Primer sequences and identification of genotypes by RFLP product are depicted in Supplemental Table 2.

Statistical analysis

Allele frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium of SNPs distributions were estimated by Chi-squared analyses. Significant distributions between genotypes of genes predisposing to AD and RLPC levels were tested in the discovery sample with the Mann-Whitney U test. TG-related and other variables such as IMT that did not follow a normal distribution (tested by Kolmogorov-Smirnov) were log-transformed before the statistical analyses. Associations between lipid variables and genotypes were evaluated using ANOVA, and the p-value was adjusted for age, gender and BMI by univariate linear regression. Association between the presence of carotid plaque and SNPs was assessed by Chi-squared analyses. Linear regression models were used to evaluate intima-media thickness and lipoprotein profile variability. The SPSS package version 23.0 (IBM, Madrid, Spain) was used throughout. A value of $p < 0.01$ was considered significant (corrected by Bonferroni).

RESULTS

Discovery population

The sample consisted of 146 individuals diagnosed with MCI, 184 with ATD and 168 controls. As expected, the MCI and ATD groups presented a significantly higher percentage of women ($p < 0.001$), they were older ($p < 0.001$), and had lower MMSE scores ($p < 0.001$) compared to control subjects.

We did not find differences among groups in total cholesterol, RLPC or glucose levels, but T2D was 7% more prevalent in cases (MCI and ATD) than in controls ($p = 0.017$). Baseline data of the cases and controls are shown in supplemental Table 3.

We identified in the bibliography genes predisposing to cognitive impairment and we genotyped a total of 48 SNPs (Supplemental Table 1); all of them followed Hardy-Weinberg equilibrium. Carriers of the rare allele in the rs2227272 polymorphism (*DNAJB9* gene) were 14% more represented in MCI than in controls ($p = 0.03$), while carriers of rs1019731 (*IGF1* gene) and rs2074739 (*PLA2G3* gene) were 9% ($p = 0.049$) and 15% ($p = 0.013$) less represented, respectively, compared to controls.

SNP genotyping showed 18% ($p=0.001$) underrepresentation of rs73572039 carriers (*PVRL2* gene) and 13% ($p=0.038$) underrepresentation of rs1864325 carriers (*MAPT* gene) in the ATD group compared to controls.

Our objective was to identify whether those SNPs were significantly associated with plasma concentrations of RLPc, a lipoprotein type characteristic of diabetic patients. Five SNPs were significantly associated with lower levels of RLPc (Supplemental Table 4). Carriers of rs1789072 (*DSC1* gene) had 11% ($p=0.047$) lower RLPc levels while carriers of rs3025786 (*PSEN1* gene) or rs73572039 (*PVRL2* gene) presented diminutions of 16% ($p=0.012$) and 14% ($p=0.031$), respectively, compared to WT. Carriers of both rare alleles of rs3788428 (*PLA2G3* gene) presented 46% ($p=0.018$) lower RLPc levels and those of rs1049296 (*TF* gene) had a reduction of 16.5% ($p=0.05$) compared to WT or heterozygotes.

Replication population

We studied 281 individuals with high cardiovascular risk as a replication population. The patients were middle-aged and 67% presented type 2 diabetes, 52% obesity, 75% metabolic syndrome; they also presented dyslipidemia. The baseline data of the study sample are shown in Table 1.

The five SNPs associated with RLPc in the discovery population were genotyped in the replication population. The genotype distributions of the five SNPs are depicted in Supplemental Table 5, and all of them follow Hardy-Weinberg equilibrium.

Among the 5 SNPs, carriers of the rare allele of rs3025786 (in *PSEN1* gene) showed a significant association with circulating RLPc levels, meaning that they presented 27% lower RLPc levels compared to WT in this population ($p=0.028$), and carriers of the rare allele of rs73572039 also presented 10% lower RLPc levels compared to WT ($p=0.049$), although the significance of these differences was lost after Bonferroni adjustment for multiple tests (Table 2).

Moreover, to be a carrier of rs3025786 was associated with 25% lower circulating TG levels ($p=0.007$), 42% less total VLDL particles ($p=0.002$) and lower levels in all of its subfractions (-40% large VLDL $p=0.001$, -33% medium VLDL $p=0.002$, -45% small VLDL $p=0.002$) compared to WT. HDL particles in those subjects carrying the rare allele of rs3025786 were 1% smaller than those in WT subjects ($p=0.006$). We did not observe rs3025786 associations with LDL lipoproteins or other lipid-related variables. The association values of rs3025786 are shown in Table 2.

Carriers of rs73572039 (in *PVRL2* gene) showed a decrease of 25% in the concentration of total VLDL particles ($p=0.007$) and in its subfractions (-27% large VLDL $p=0.009$, -22% medium VLDL $p=0.007$, -28% small VLDL $p=0.007$) compared to WT individuals. The association values of rs27023435 are shown in Table 2.

Since rs3025786 and rs73572039 were both associated with VLDL-related variables, we sought a combined allele-dose effect between them on total VLDL particles and VLDL subfraction levels. Our results showed that if the more rare alleles were carried by one individual, lower VLDL-related variable plasma levels presented compared to WT individuals (Figure 1). Analysis of the effect of allele distribution showed no statistically significant differences in VLDL-related variables among genotypes within allele-dose groups (data not shown).

Carriers of both rare alleles of rs1789072 located in the *DSC1* gene presented an increment of 27% in TC ($p=0.004$), 38% in LDLc ($p=0.003$) and 25% in ApoB100 ($p=0.006$) levels compared to WT or heterozygous individuals. In reference to lipoprotein profile we also identified an increment of 31% in total LDL particles ($p=0.009$), and its smallest subfractions [32% medium LDL ($p=0.019$, although the significance is lost after adjustment by Bonferroni); 47% small LDL ($p=0.006$)] in the double mutated group compared to WT and heterozygotes. Rs1789072 did not show associations with VLDL, HDL lipoproteins or other lipid-related variables. The association values are shown in Table 3.

Although rs3788428 (in *PLA2G3* gene) was not associated with lipids, carriers of the rare allele presented a 7% lower IMT [mean in WT: 0.69 mm and IQR: 0.17; mean in carriers: 0.64 mm and IQR: 0.19, $p=0.004$]. In line with this, carriers were more represented among individuals without atherosclerotic plaque than among those with plaque (10% difference; $p=0.028$, this significance was lost after Bonferroni adjustment for multiple tests) compared to WT.

Rs1049296 in *TF* was associated with neither lipids, lipoprotein profile nor IMT-related variables in this population.

DISCUSSION

Recent studies support the idea that AD could be considered a brain-specific form of diabetes mellitus named type-3 diabetes mellitus (T3DM) due to its impaired insulin signalling and chronic insulin resistance [1]. Knowing that AD and T2DM share common genetic and metabolic backgrounds, we hypothesized that candidate genes for AD could also modulate lipid profile characteristics of T2DM such as small LDL, large VLDL and remnant lipoprotein cholesterol (RLPc). Remnant lipoproteins are derived from the lipolysis of TG-rich lipoproteins originated either in the intestine or in the liver. These remnant particles are normally cleared from circulation by hepatic receptors that recognize APOE; however they accumulate in circulation under metabolic disturbances such as T2DM. Increased levels of remnant lipoproteins have been associated with high cardiovascular risk [19–21].

Therefore, since AD is strongly modulated by APOE genotype, we hypothesized that genes involved in the pathogenesis of AD could also modulate RLPc levels. Thus, we first studied the association between SNPs predisposing to AD and RLPc plasma concentrations in a population of AD patients. We found 5 SNPs significantly influencing RLPc levels in AD and took this as a sign they could have a more global effect on the lipid and lipoprotein metabolism of individuals with metabolic disturbances such as obesity, metabolic syndrome and T2DM with a complete lipoprotein profile.

The informative polymorphisms were rs3025786 (PSEN1), rs73572039 (PVRL2), rs1789072 (DSC1), rs3788428 (PLA2G3) and rs1049296 (TF); therefore, they not only predispose to AD [22] but are also associated with significant differences in RLPc levels ranging from 11 to 46% compared to WT. Based on this initial observation, we have been able to identify other significant associations with lipid parameters determined by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The use of NMR allows a detailed lipid profile to be obtained, which provides additional information compared to standard lipid measurements, and this might have helped to find new effects of the variants on plasma lipids.

In T2DM subjects, carriers of rs3025786 (PSEN1) and of rs73572039 (PVRL2) present a decrease of 40% and 25%, respectively, in total VLDL particles and its subfractions. Moreover, when combining both variants, we observed a dose-allele effect in which the more rare alleles were carried, the lower were the VLDL-related variables presented compared to WT individuals. VLDL particles are the principal vehicle for the transportation of endogenous TG, which are the main altered feature in the dyslipidemia associated with obesity, metabolic syndrome and diabetes.

PSEN1 encodes a probable catalytic subunit of the gamma-secretase complex. This complex catalyzes the intramembrane cleavage of integral membrane proteins such as Notch receptors and APP (A β precursor protein) [23], and it has been demonstrated that presenilin-related genes are involved in AD pathology [24]. Lately, some researchers have also described that A β induces hepatic insulin resistance via the JAK2 signaling pathway in transgenic mice carrying a PSEN1 mutation, reinforcing the relation between AD and T2DM [25,26]. Another study proved that obesity and hepatic steatosis are associated with elevated serum A β in metabolically stressed transgenic mice, which also have increased serum levels of TG [27]. This is important as elevated plasma TG levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease [28]. Rs3025786 has been associated with lower risk of AD development. This is in line with our results as we have demonstrated that this variant protects from high plasma levels of TG-related variables (AD and altered metabolic patients usually present high TG and VLDL particle levels).

On the other hand, the PVRL2 gene encodes a single-pass type I membrane glycoprotein that is one of the plasma membrane components of adherent junctions [29], which play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis by regulating the trans-endothelial migration of leukocytes (TEML) [30,31]. In this sense, it has been reported that PVRL2 is a plasma cholesterol responsive gene acting at endothelial sites of vascular inflammation due to its TEML modulating activity [32]. Some studies have also associated PVRL2 variants with AD, and it is thought that their mechanism of action is related to Herpes simplex type I virus infection, which in turn is a risk factor for developing AD [33,34]. In our case, we have described for the first time an association of rs73572039 with lower VLDL particle concentration in patients with metabolic syndrome or T2DM. Although there is not an obvious mechanistic link between PVRL2 and lipid-related parameters, PVRL2 is located in a risk locus for coronary artery disease (close to the APOE gene on chromosome 19) [35].

While the previous variants seem to modulate TG metabolism, we also demonstrated that carriers of either rare allele of rs1798072 (DSC1) have higher levels of total cholesterol, LDLc, total LDL particles and especially its smallest subfraction compared to WT individuals, which promotes an atherogenic lipoprotein profile. DSC1 encodes a calcium-dependent glycoprotein. It belongs to the cadherin superfamily and it is found in epithelial cells where it is required for cell adhesion and desmosome formation [36]. DSC1 has been related to autoimmune skin diseases and to AD [37,38]. The role of DSC1 in dyslipidemia is discussed; currently, there is no evidence that directly relates DSC1 to human dyslipidemia but other cadherins, such as CDH13 or VE-cad, are associated with endothelium dysfunction and with lipoprotein clearance [39–42], which is consistent with increases in total and small LDL particles associated with rs1798072 and characteristic of metabolic alterations such as T2DM [5,6,8].

The PLA2G3 gene is an exemplification of the common genetic background between T2DM and AD; its coded protein plays a key role in apoptotic neuronal death through oxidative stress pathways [12] and in postprandial lipoprotein metabolism [13]. Although we did not find associations between rs3788428 and the lipid profile in the replication cohort, we identified a protective effect of the variant in relation to atherosclerosis development. In line with our results, other studies support the link between phospholipase A2 and an increased risk of early atherosclerosis in patients with metabolic syndrome [43].

Finally, TF is a protein-coding gene that encodes a glycoprotein whose function is to transport iron to cells for its absorption [44]. It is also known that its variant rs1049296 is a genetic determinant of AD [45]. How iron metabolism affects lipoprotein metabolism is debated; elevated serum transferrin levels could be associated with hypertriglyceridemia in metabolic syndrome patients [46], and lower transferrin

saturation is associated with impaired fasting glucose and T2DM [47,48]. We did not find associations between rs1049296 and lipid-related or atherosclerosis-related variables. Therefore, further research in this field is needed.

Therefore, in conclusion, we have identified 3 variants (rs3025786 in PSEN1 gene, rs73572039 in PVRL2 gene and rs1798072 DSC1) predisposing to AD that also influence the lipid profile and another one (rs3788428 in PLA2G3 gene) that is associated with atherosclerosis development. Most of these genes have not been previously studied in relation to lipid metabolism, but since metabolic diseases are complex and result from the interplay between multiple environmental factors and multiple genetic variants, the identification of potential new participants is of great interest.

TABLES**Table 1.** Baseline characteristics

	All, n=281
Age, years	56.08 (11.26)
Female sex, %	134 (47.3)
Body mass index, kg/m ²	31.45 (6.66)
Type 2 diabetes, %	189 (66.8)
Glucose, mmol/L	7.38 (2.84)
RLP cholesterol, mg/dL	10.27 ±10.81
Total cholesterol, mmol/L	5.64 (1.39)
LDL cholesterol, mmol/L	3.47 (1.20)
HDL cholesterol, mmol/L	1.45 (0.33)
Triglycerides, mmol/L	1.64 ±2.06
Apolipoprotein B100, mg/dL	107.75 (27.49)
Apolipoprotein AI, mg/dL	135.64 (12.96)

Data are presented as the mean (SD) for continuous variables with a normal distribution, median± interquartile range for continuous variables with a non-normal distribution, and number (percentage) for categorical variables. RLP, remnant-like lipoproteins; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

Table 2. Rs3025786 and rs27023435 associations with lipids and lipoprotein profile

	rs3025786 (PSENI2)		rs73572039 (PVR12)		p-value
	Wild type (n=233)	Carriers (n=45)	Wild type (n=201)	Carriers (n=78)	
<i>Plasma lipid</i>					
Triglycerides, mmol/L	1.76 ±1.41	1.31 ±1.41	1.74 ±2.42	1.44 ±1.48	0.032
Cholesterol, mmol/L	5.66 (1.39)	5.53 (1.50)	5.66 (1.97)	5.54 (1.41)	0.365
LDL cholesterol, mmol/L	3.45 (1.19)	3.51 (1.30)	3.40 (1.19)	3.58 (1.22)	0.351
HDL cholesterol, mmol/L	1.44 (0.34)	1.47 (0.27)	1.44 (0.30)	1.46 (0.38)	0.836
RLP cholesterol, mg/dL	10.86 ±12.09	7.90 ±7.72	10.73 ±12.45	9.63 ±8.75	0.049
ApoB100, mg/dL	108.23 (27.02)	105.57 (30.99)	106.91 (27.58)	109.05 (27.37)	0.629
ApoA1, mg/dL	135.46 (13.51)	137.11 (10.10)	135.48 (13.02)	136.56 (12.94)	0.716
<i>Lipoprotein subclass</i>					
VLDL-P, mmol/L	63.20 ±104.13	36.40 ±58.38	61.43 ±113.98	46.33 ±62.38	0.007
Large VLDL, mmol/L	2.18 ±2.58	1.31 ±1.71	2.13 ±2.73	1.55 ±1.84	0.009
Medium VLDL, mmol/L	9.23 ±13.78	6.16 ±8.70	8.95 ±14.57	6.99 ±9.59	0.007
Small VLDL, mmol/L	52.41 ±86.39	28.48 ±47.63	51.22 ±96.99	36.73 ±51.40	0.007
LDL-P, mmol/L	982.67 (413.31)	1021.57 (404.99)	987.17 (426.99)	982.93 (363.43)	0.709
Large LDL, mmol/L	123.56 (51.70)	130.43 (53.28)	123.52 (52.82)	126.81 (48.87)	0.884
Medium LDL, mmol/L	341.77 ±200.01	337.78 ±183.61	341.74 ±198.70	338.14 ±186.78	0.491
Small LDL, mmol/L	494.56 ±305.98	474.24 ±258.16	492.57 ±325.25	478.12 ±227.09	0.985
HDL-P, µmol/L	24.69 ±8.52	25.62 ±7.93	25.41 ±8.33	24.68 ±6.57	0.085
Large HDL, µmol/L	0.15 ±0.08	0.15 ±0.08	0.15 ±0.08	0.14 ±0.07	0.161
Medium HDL, µmol/L	6.49 ±3.87	7.83 ±4.26	6.70 ±4.62	6.59 ±3.58	0.372
Small HDL, µmol/L	17.99 ±5.80	17.76 ±4.70	18.24 ±5.81	17.16 ±5.89	0.016
<i>Lipoprotein size</i>					
VLDL size, nm	42.46 ±0.83	42.58 ±0.90	42.50 ±0.90	42.52 ±0.67	0.248
LDL size, nm	21.03 ±0.24	21.08 ±0.25	21.03 ±0.26	21.10 ±0.22	0.141
HDL size, nm	8.17 ±0.13	8.22 ±0.12	8.17 ±0.13	8.21 ±0.11	0.027

Data are presented as the mean (SD) for continuous variables with a normal distribution, median± interquartile range for continuous variables with a non-normal distribution. -P, total particles; RLP, remnant like lipoproteins; VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

Table 3. Rs1789072 associations with lipids and lipoprotein profile

	rs1789072 (<i>DSC1</i>)			p-value
	Wild type (n=189)	Heterozygote (n=80)	Double mutated (n=10)	
<i>Plasma lipid</i>				
Triglycerides, mmol/L	1.61 ±2.00	1.69 ±1.60	2.98 ±3.61	0.156
Cholesterol, mmol/L	5.65 (1.35)	5.43 (1.41)	6.97 (1.65)	0.004
LDL cholesterol, mmol/L	3.41 (1.13)	3.42 (1.69)	4.70 (1.13)	0.003
HDL cholesterol, mmol/L	1.47 (0.33)	1.39 (0.30)	1.51(0.42)	0.131
RLP cholesterol, mg/dL	10.60 ±10.91	10.27 ±10.10	9.95 ±27.83	0.740
ApoB100, mg/dL	106.22 (26.77)	108.10 (28.28)	134.40 (26.84)	0.006
ApoAI, mg/dL	136.53 (13.42)	134.67 (11.38)	130.40 (16.65)	0.745
<i>Lipoprotein subclass</i>				
VLDL-P, mmol/L	56.79 ±100.84	53.83 ±67.65	118.89 ±245.93	0.208
Large VLDL, mmol/L	2.01 ±2.61	1.94 ±7.90	2.95 ±4.98	0.238
Medium VLDL, mmol/L	8.68 ±12.11	8.08 ±7.90	16.52 ±27.21	0.291
Small VLDL, mmol/L	46.80 ±86.13	44.68 ±58.45	98.56 ±212.81	0.199
LDL-P, mmol/L	960.17 (384.53)	1016.80 (464.16)	1300.91 (312.07)	0.009
Large LDL, mmol/L	121.73 (47.68)	129.12 (61.20)	147.43 (41.69)	0.069
Medium LDL, mmol/L	333.56 ±189.81	344.74 ±244.08	441.59 ±204.99	0.019
Small LDL, mmol/L	477.88 ±286.62	503.33 ±348.10	719.42 ±384.09	0.006
HDL-P, µmol/L	25.77 ±8.57	23.95 ±6.63	26.62 ±15.95	0.411
Large HDL, µmol/L	0.15 ±0.08	0.15 ±0.06	0.12 ±0.09	0.255
Medium HDL, µmol/L	6.69 ±4.87	6.56 ±2.86	5.59 ±3.40	0.896
Small HDL, µmol/L	18.24 ±4.95	16.92 ±5.39	20.15 ±10.04	0.174
<i>Lipoprotein size</i>				
VLDL size, nm	42.47 ±0.88	42.48 ±0.77	42.33 ±0.91	0.244
LDL size, nm	21.05 ±0.25	21.03 ±0.26	20.89 ±0.48	0.245
HDL size, nm	8.18 ±0.14	8.19 ±0.09	8.12 ±0.20	0.119

Data are presented as the mean (SD) for continuous variables with a normal distribution, median ±interquartile range for continuous variables with a non-normal distribution. -P, total particles; RLPc, remnant like lipoproteins; VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

FIGURES

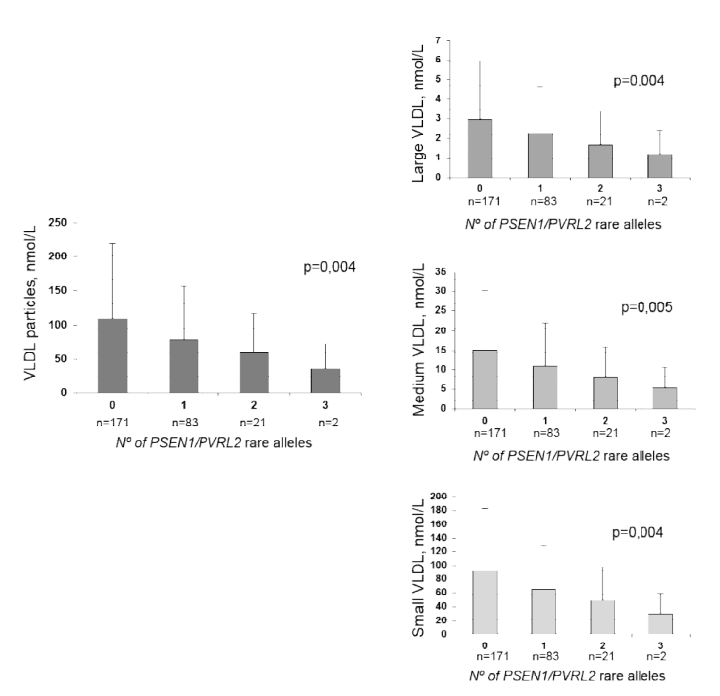


Figure 1. Combined allele-dose effect of rs3025786 and rs73572039 on VLDL particle levels. Sample size per group and standard deviation bars are included.

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1. Described genes in relation to cognitive impairment disease predisposition.

Chr	Symbol	Gene Name	SNP Id	MAF _{CEU}
1	<i>CHRN2</i>	Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2	rs4845378	0.10
1	<i>DHCR24</i>	24-dehydrocholesterol reductase	rs2274941	0.43
1	<i>MTHFR</i>	Methylenetetrahydrofolate Reductase	rs1801131	0.31
1	<i>NCSTN</i>	Nicastrin	rs12239747	0.05
2	<i>EIF2AK2</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A	rs2254958	0.43
			rs4648174	0.41
			rs3770768	0.13
			rs1805164	0.31
3	<i>TF</i>	Transferrin	rs1049296	0.14
4	<i>IGFBP7</i>	Insulin Like Growth Factor Binding Protein	rs4075349	0.42
5	<i>HMGCR</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase	rs5909	0.10
			rs3761740	0.10
5	<i>HMGCS1</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 1	rs12514393	0.47
6	<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	rs3844508	0.13
6	<i>TAP2</i>	Transporter 2, ATP Binding Cassette Subfamily B Member	rs241448	0.28
6	<i>TTBK1</i>	Tau Tubulin Kinase 1	rs1995300	0.32
			rs2651206	0.33
7	<i>DNAJB9</i>	DNAJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9	rs2227272	0.20
8	<i>YWHAZ</i>	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta	rs983583	0.41
9	<i>GOLM1</i>	Golgi Membrane Protein 1	rs10868366	0.09
9	<i>HSPA5</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	rs17840761	0.46
10	<i>CALHM1</i>	Calcium homeostasis modulator 1	rs41287502	0.02
10	<i>SORCS1</i>	Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 1	rs601883	0.11
10	<i>TFAM</i>	Transcription Factor A, Mitochondrial	rs2306604	0.44
			rs11006130	0.17
			rs2279340	0.23
			rs10826177	0.22
11	<i>HYOU1</i>	Hypoxia Up-Regulated 1	rs13929	0.40
12	<i>DDIT3</i>	DNA damage inducible transcript 3	rs3847699	0.18
12	<i>IGF1</i>	Insulin Like Growth Factor 1	rs17727841	0.17
			rs1019731	0.13
			rs4764697	0.27
			rs2195240	0.23
14	<i>PSEN1</i>	Presenilin 1	rs3025786	0.06

14	<i>SEL1L</i>	SEL1L ERAD E3 Ligase Adaptor Subunit	rs12436488	0.21
16	<i>MAP1LC3B</i>	Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta	rs11117269	0.48
16	<i>TMC5</i>	Transmembrane Channel Like 5	rs2245086	0.16
17	<i>MAPT</i>	Microtubule Associated Protein Tau	rs1864325	0.24
18	<i>DSC1</i>	Desmocollin 1	rs1789072	0.19
19	<i>GAPDH5</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Spermatogenic	rs4806173	0.39
19	<i>PVRL2</i>	Poliovirus related receptor 2	rs73572039	0.13
			rs3745150	0.44
20	<i>PRNP</i>	Prion Protein	rs1799990	0.33
22	<i>HMOX1</i>	Heme Oxygenase 1	rs2071746	0.44
22	<i>PLA2G3</i>	Phospholipase A2 group 3	rs2232170	0.21
			rs9619169	0.48
			rs3788428	0.09
			rs2074739	0.43

MAF_{CEU}: minor allele frequency in populations of European ancestry.

Supplemental Table 2. RFLP genotyping primers and genotype band identification

SNP	Primers (3'→5')	Genotype identification by RFLP product
rs1789072	F- TGAGGAGTAAACTTTTGGGAAA R- AGGTGGACATCAGACCTGG	0: 146bp +24bp +21bp 1: 170bp +146bp +24bp +21bp 2: 170bp +21bp
rs3788428	F- CTGTCTCCATCTGCCATT R- CCAGGCTGGTTCTGAAGCTA	0: 114bp +50bp +20bp +6bp 1: 164bp +114bp +50bp +20bp +6bp 2: 164bp +20bp +6bp
rs3025786	F- ATTCCTCCTACCACCCATT R- GAGCTGGAAAAAGCGTTTCA	0: 164bp 1: 164bp +108bp +56bp 2: 108bp +56bp

F-: forward primer

R-: reverse primer

0: wild type alleles

1: heterozygote

2: double mutated alleles

Supplemental Table 3. Baseline characteristics of discovery population.

	Controls, n=168	MCI, n=146	ATD, n=184	p-value
Age, years	72.00 ±10	75.00 ±8	78.00 ±7	<0.001
Female sex, %	99 (50.5)	114 (65.5)	143 (69.8)	<0.001
ApoE4 carriers, %	36 (16.6)	78 (35.9)	103 (47.5)	<0.001
MMSE test score, a.u.	28.11 (1.77)	23.53 (4.41)	17.19 (5.62)	<0.001
Type 2 diabetes, %	6 (3.2)	17 (7.9)	14 (5.9)	ns
Glucose, mmol/L	---	5.85 (1.688)	12.57 (2.82)	ns
RLPc, mg/dL	11.71 ±8.41	12.07 ±9.50	11.82 ±8.86	ns
Cholesterol, mmol/L	---	5.57 (1.02)	6.19 (5.23)	ns

Data are presented as the mean (SD) for continuous variables with a normal distribution, median± interquartile range for continuous variables with a non-normal distribution, and number (percentage) for categorical variables. RLPc; cholesterol remnant-like particles. P-value among controls, MCI and ATD groups.

Supplemental Table 4. Five SNPs associated with RLP cholesterol levels.

SNP (Gene)		n	Median \pm IQR	p-value
rs1789072 (<i>DSC1</i>)	Wild type	315	9.44 \pm 6.56	0.047
	Carriers	164	8.41 \pm 5.85	
rs3025786 (<i>PSEN1</i>)	Wild type	402	9.44 \pm 6.59	0.012
	Carriers	77	7.90 \pm 5.34	
rs73572039 (<i>PVRL2</i>)	Wild type	369	9.57 \pm 6.75	0.031
	Carriers	101	8.28 \pm 4.56	
rs3788428 (<i>PLA2G3</i>)	Wild type + heterozygote	471	9.18 \pm 6.18	0.018
	Double mutated	3	4.94 \pm 2.57	
rs1049296 (<i>TF</i>)	Wild type + heterozygote	451	9.31 \pm 6.57	0.050
	Double mutated	26	7.77 \pm 3.06	

Carriers: Heterozygote + double mutated group

IQR: Inter-quartile range

Supplemental Table 5. SNP distribution, minor allele frequency and Hardy-Weinberg equilibrium

		rs1789072	rs3025786	rs73572039	rs3788428	rs1049296
Genotype	Wild type	189	249	233	201	204
	Heterozygote	80	29	43	71	67
	Double	10	1	2	7	9
	mutated					
MAF		0.18	0.06	0.08	0.15	0.15
MAF _{CEU}		0.17	0.06	0.05	0.14	0.14
HWE	χ^2	0.1789	0.0251	0.0001	0.0594	1.4000
	p-value	0.672	0.874	0.991	0.807	0.236

MAF: minor allele frequency in the study

MAF_{CEU}: minor allele frequency in populations of European ancestry.

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium

REFERENCES

- [1] E. Steen, B.M. Terry, E. J. Rivera, J.L. Cannon, T.R. Neely, R. Tavares, et al., Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes?, *J. Alzheimer's Dis.* 7 (2005) 63–80. doi:10.3233/JAD-2005-7107.
- [2] S.M. de la Monte, L. Longato, M. Tong, J.R. Wands, Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis., *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 10 (2009) 1049–60. doi:10.1016/j.ygyno.2014.12.035.Pharmacologic.
- [3] J. Leszek, E. Trypka, V. V Tarasov, G. Md Ashraf, G. Aliev, Type 3 Diabetes Mellitus: A Novel Implication of Alzheimer Disease., *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 1331–1335. doi:10.2174/1568026617666170103163403.
- [4] D.A. Butterfield, F. Di Domenico, E. Barone, Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842 (2014) 1693–1706. doi:10.1016/j.bbdis.2014.06.010.
- [5] T. Matsuzaki, K. Sasaki, J. Hata, Y. Hirakawa, K. Fujimi, T. Ninomiya, et al., Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: The hisayama study, *Neurology.* 77 (2011) 1068–1075. doi:10.1212/WNL.0b013e31822e145d.
- [6] M. Arca, G. Pigna, C. Favocchia, Mechanisms of Diabetic Dyslipidemia: Relevance for Atherogenesis, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10 (2012) 684–686. doi:10.2174/157016112803520864.
- [7] Y.-M. Kuo, M.R. Emmerling, C.L. Bisgaier, A.D. Essenburg, H.C. Lampert, D. Drumm, et al., Elevated Low-Density Lipoprotein in Alzheimer's Disease Correlates with Brain A β 1–42 Levels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 711–715. doi:10.1006/bbrc.1998.9652.
- [8] T. Watanabe, S. Koba, M. Kawamura, M. Itokawa, T. Idei, Y. Nakagawa, et al., Small Dense Low-Density Lipoprotein and Carotid Atherosclerosis in Relation to Vascular Dementia, *Metabolism.* 53 (2004) 476–482. doi:10.1016/j.metabol.2003.11.020.
- [9] N. Watanabe, T. Taniguchi, H. Taketoh, Y. Kitagawa, H. Namura, N. Yoneda, et al., Elevated remnant-like lipoprotein particles in impaired glucose tolerance and type 2 diabetic patients, *Diabetes Care.* 22 (1999) 152–156. doi:10.2337/diacare.22.1.152.
- [10] D.M. Lyall, J. Ward, S.J. Ritchie, G. Davies, B. Cullen, C. Celis, et al., Alzheimer disease genetic risk factor APOE e4 and cognitive abilities in 111,739 UK Biobank participants, *Age Ageing.* 45 (2016) 511–517. doi:10.1093/ageing/afw068.
- [11] R.W. Mahley, Z.S. Ji, Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E., *J. Lipid Res.* 40 (1999) 1–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869645>.
- [12] A. Martínez-García, I. Sastre, M. Recuero, J. Aldudo, E. Vilella, I. Mateo, et al., PLA2G3, a gene involved in oxidative stress induced death, is associated with Alzheimer's disease., *J. Alzheimers. Dis.* 22 (2010) 1181–7. doi:10.3233/JAD-2010-101348.
- [13] H. Sato, R. Kato, Y. Isogai, G.I. Saka, M. Ohtsuki, Y. Taketomi, et al., Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33483–33497. doi:10.1074/jbc.M804628200.

- [14] M. Napolitano, H.S. Kruth, E. Bravo, Phospholipase A2 mediates apolipoprotein-independent uptake of chylomicron remnant-like particles by human macrophages, *Int. J. Vasc. Med.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/501954.
- [15] X. Lin, M. Xu, J. Tang, L. Mai, X. Wang, M. Ren, et al., Effect of intensive insulin treatment on plasma levels of lipoprotein-associated phospholipase A2 and secretory phospholipase A2 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes, *Lipids Health Dis.* 15 (2016) 203. doi:10.1186/s12944-016-0368-3.
- [16] K. Nakajima, T. Saito, A. Tamura, M. Suzuki, T. Nakano, M. Adachi, et al., Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels., *Clin. Chim. Acta.* 223 (1993) 53–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8143370> (accessed March 12, 2015).
- [17] R. Mallol, N. Amigó, M.A. Rodríguez, M. Heras, M. Vinaixa, N. Plana, et al., Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1 H NMR spectroscopy, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 737–746. doi:10.1194/jlr.D050120.
- [18] P.J. Touboul, M.G. Hennerici, S. Meairs, H. Adams, P. Amarenco, N. Bornstein, et al., Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006): An update on behalf of the advisory board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006, *Cerebrovasc. Dis.* 23 (2007) 75–80. doi:10.1159/000097034.
- [19] A. Varbo, B.G. Nordestgaard, Remnant lipoproteins., *Curr. Opin. Lipidol.* (2017). doi:10.1097/MOL.0000000000000429.
- [20] A. Varbo, M. Benn, G.D. Smith, N.J. Timpson, A. Tybjaerg-Hansen, B.G. Nordestgaard, Remnant cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and blood pressure as mediators from obesity to ischemic heart disease, *Circ. Res.* 116 (2015) 665–673. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304846.
- [21] R.S. Rosenson, M.H. Davidson, B.J. Hirsh, S. Kathiresan, D. Gaudet, Genetics and causality of triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerotic cardiovascular disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 64 (2014) 2525–2540. doi:10.1016/j.jacc.2014.09.042.
- [22] L. Bertram, M.B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, R.E. Tanzi, Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database, *Nat. Genet.* 39 (2007) 17–23. doi:10.1038/ng1934.
- [23] S.P. Duggan, J. V. McCarthy, Beyond ??-secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways, *Cell. Signal.* 28 (2016) 1–11. doi:10.1016/j.cellsig.2015.10.006.
- [24] M. Cruts, L. Hendriks, C. Van Broeckhoven, The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology., *Hum. Mol. Genet.* 5 Spec No (1996) 1449–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875251>.
- [25] M. Hiltunen, V.K.M. Khandelwal, N. Yaluri, T. Tiilikainen, M. Tusa, H. Koivisto, et al., Contribution of genetic and dietary insulin resistance to Alzheimer phenotype in APP/PS1 transgenic mice, *J. Cell. Mol. Med.* 16 (2012) 1206–1222. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01384.x.
- [26] Y. Zhang, B. Zhou, B. Deng, F. Zhang, J. Wu, Y. Wang, et al., Amyloid- β induces hepatic insulin resistance in vivo via JAK2, *Diabetes.* 62 (2013) 1159–1166. doi:10.2337/db12-0670.

- [27] F.S. Shie, Y.J. Shiao, C.W. Yeh, C.H. Lin, T.T. Tzeng, H.C. Hsu, et al., Obesity and hepatic steatosis are associated with elevated serum amyloid beta in metabolically stressed APPswe/PS1dE9 mice, *PLoS One*. 10 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0134531.
- [28] B.L. Burgess, S.A. Mclsaac, K.E. Naus, J.Y. Chan, G.H.K. Tansley, J. Yang, et al., Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant A β in plasma, *Neurobiol. Dis.* 24 (2006) 114–127. doi:10.1016/j.nbd.2006.06.007.
- [29] K. Shimizu, Y. Takai, Roles of the Intercellular Adhesion Molecule Nectin in Intracellular Signaling, *J. Biochem.* 134 (2003) 631–636. doi:10.1093/jb/mvg198.
- [30] A.N. Orekhov, E.R. Andreeva, Y. V. Bobryshev, Cellular mechanisms of human atherosclerosis: Role of cell-to-cell communications in subendothelial cell functions, *Tissue Cell.* 48 (2015) 25–34. doi:10.1016/j.tice.2015.11.002.
- [31] W.A. Muller, Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response, *Trends Immunol.* 24 (2003) 326–333. doi:10.1016/S1471-4906(03)00117-0.
- [32] A. Rossignoli, M.M. Shang, H. Gladh, C. Moessinger, H. Foroughi Asl, H.A. Talukdar, et al., Poliovirus Receptor-Related 2: A Cholesterol-Responsive Gene Affecting Atherosclerosis Development by Modulating Leukocyte Migration, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 534–542. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308715.
- [33] S. Schmidt, M.A. Pericak-Vance, S. Sawcer, L.F. Barcellos, J. Hart, J. Sims, et al., Allelic association of sequence variants in the herpes virus entry mediator-B gene (PVRL2) with the severity of multiple sclerosis, *Genes Immun.* 7 (2006) 384–392. doi:10.1038/sj.gene.6364311.
- [34] C. Martin, L. Solís, M.I. Concha, C. Otth, [Herpes simplex virus type 1 as risk factor associated to Alzheimer disease], *Rev. Med. Chil.* 139 (2011) 779–86. doi:/S0034-98872011000600013.
- [35] P.J. Talmud, F. Drenos, S. Shah, T. Shah, J. Palmen, C. Verzilli, et al., Gene-centric Association Signals for Lipids and Apolipoproteins Identified via the HumanCVD BeadChip, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2009) 628–642. doi:10.1016/j.ajhg.2009.10.014.
- [36] M. Amagai, Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus., *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995) 146–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7798634>.
- [37] T. Hashimoto, C. Kiyokawa, O. Mori, M. Miyasato, M. a Chidgey, D.R. Garrod, et al., Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus., *J. Invest. Dermatol.* 109 (1997) 127–31. doi:10.1111/1523-1747.ep12319025.
- [38] M.C. Ramos, R. Tenorio, A. Martínez-García, I. Sastre, E. Vilella-Cuadrada, A. Frank, et al., Association of DSC1, a gene modulated by adrenergic stimulation, with Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 408 (2006) 203–208. doi:10.1016/j.neulet.2006.09.005.
- [39] T. Takeuchi, Y. Adachi, Y. Ohtsuki, M. Furihata, Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease, *Med. Mol. Morphol.* 40 (2007) 115–120. doi:10.1007/s00795-007-0364-9.
- [40] C. Hug, J. Wang, N.S. Ahmad, J.S. Bogan, T.-S. Tsao, H.F. Lodish, T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10308–13. doi:10.1073/pnas.0403382101.

- [41] D. V. Stambolsky, Y.S. Kuzmenko, M.P. Philippova, V.N. Bochkov, Z.D. Bespalova, A.A. Azmuko, et al., Identification of 130 kDa cell surface LDL-binding protein from smooth muscle cells as a partially processed T-cadherin precursor, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1416 (1999) 155–160. doi:10.1016/S0005-2736(98)00218-1.
- [42] Y. Wei, G.L. Liu, J.Y. Yang, R.X. Zheng, L.H. Jiang, Y.P. Li, et al., Association between metabolic syndrome and vascular endothelium dysfunction in children and adolescents., *Genet. Mol. Res.* 13 (2014) 8671–8678. doi:10.4238/2014.October.27.7.
- [43] C.-Q. Sun, C.-Y. Zhong, W.-W. Sun, H. Xiao, P. Zhu, Y.-Z. Lin, et al., Elevated Type II Secretory Phospholipase A2 Increases the Risk of Early Atherosclerosis in Patients with Newly Diagnosed Metabolic Syndrome, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34929. doi:10.1038/srep34929.
- [44] T.B. Bartnikas, Known and potential roles of transferrin in iron biology, *BioMetals.* 25 (2012) 677–686. doi:10.1007/s10534-012-9520-3.
- [45] Y. Wang, S. Xu, Z. Liu, C. Lai, Z. Xie, C. Zhao, et al., Meta-analysis on the association between the TF gene rs1049296 and AD., *Can. J. Neurol. Sci.* 40 (2013) 691–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968943>.
- [46] I.S. Vari, B. Balkau, A. Kettaneh, P. André, J. Tichet, F. Fumeron, et al., Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome (DESIR), *Diabetes Care.* 30 (2007) 1795–1801. doi:10.2337/dc06-2312.
- [47] R.J. Park, J.D. Moon, Low transferrin saturation is associated with impaired fasting glucose and insulin resistance in the South Korean adults: The 2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey, *Diabet. Med.* 32 (2015) 673–678. doi:10.1111/dme.12643.
- [48] C.L. Cheung, T.T. Cheung, K.S.L. Lam, B.M.Y. Cheung, High ferritin and low transferrin saturation are associated with pre-diabetes among a national representative sample of U.S. adults, *Clin. Nutr.* 32 (2013) 1055–1060. doi:10.1016/j.clnu.2012.11.024.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Discussió

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Les dislipèmies són un dels principals factors de risc per al desenvolupament de malalties cardiovasculars i, tradicionalment, el seu component més estudiat ha sigut el cLDL, ja que és la principal diana terapèutica [4,5]. Aquesta tesi parteix de l'observació que hi ha pacients amb alt risc cardiovascular, però amb concentracions normals de cLDL, com és el cas dels pacients amb diabetis o síndrome metabòlica, la qual cosa ens ha dut a hipotetitzar que hi ha característiques dels lípids i les lipoproteïnes, a més de la seva concentració, que influeixen sobre el risc cardiovascular. La DA del pacient diabètic és el paradigma d'aquesta situació: pacients amb molt alt risc cardiovascular, que presenten concentracions normals o lleugerament altes de cLDL i alteracions qualitatives del perfil lipídic, com partícules LDL més petites.

La DA té una alta heretabilitat [243,244]; això no obstant, les variants genètiques identificades fins ara només expliquen entre el 25-30% d'aquesta predisposició genètica. Partint de la base que les MCV estan influenciades per factors ambientals i que aquests factors poden modular l'expressió genètica a través de les modificacions epigenètiques, la hipòtesi d'aquesta tesi és que els factors genètics i epigenètics, sols o combinats, ens poden ajudar a entendre els mecanismes que regulen la predisposició genètica a la dislipèmia relacionada amb malalties complexes com la DT2, la síndrome metabòlica, o inclús, la DT3, característica de l'Alzheimer. Per confirmar o refusar aquesta hipòtesi, els objectius van ser determinar si la metilació del DNA (com a modificació epigenètica) està implicada en la regulació de l'expressió de gens relacionats amb els lípids, si l'efecte de la metilació del DNA i de les variants dels gens actuen de manera conjunta o separada en relació amb els nivells lipídics i el perfil lipoproteic i, finalment, si existeix relació entre la predisposició genètica a la DA i diferents formes de diabetis.

Donat que l'augment en els TG és el desencadenant de la DA, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser estudiar com la metilació del DNA regulava gens clau dels TG en teixits clau [30,232]. Vam ser els primers a determinar que la metilació del DNA influeix l'expressió del clúster de l'*APOA1/C3/A4/A5* i que la modificació d'aquesta alterava l'expressió del clúster en teixits on habitualment, l'expressió era baixa o no s'expressava [245].

Vam descriure que, en condicions fisiològiques, els promotors dels gens del clúster estan hipometilats en el fetge (el principal lloc d'acció d'aquest

agregat genètic), mentre que presenten una metilació més alta en teixits com l'intestí, els leucòcits, el cervell, el ronyó, etc., (excepte el gen *APOA4*, que presenta una metilació mitjana-alta en tots els teixits). Vam comprovar que la metilació jugava un paper clau en l'expressió d'aquest clúster, ja que una desmetilació farmacològica en cèl·lules intestinals, aproximadament, entre el 24-37%, incrementa l'expressió de l'*APOA1* en un 200%, de l'*APOA4* en un 400% i de l'*APOA5* en un 600%.

Sabent que el principal teixit on s'expressen els gens del clúster és el fetge, excepte en el cas de l'*APOA4*, aquest primer estudi ens ha permès demostrar que els gens clau en la regulació del metabolisme dels TG estan regulats epigenèticament i que aquesta regulació és específica del teixit, tal com han demostrat altres estudis [32,246]. Per tant, es posa de manifest la importància d'identificar quins són els teixits clau que participen en els processos metabòlics que es volen estudiar.

Dit això, resulta paradoxal que molts dels estudis publicats fins a la data sobre l'efecte de la metilació del DNA i tres dels articles que formen aquesta tesi basen els seus experiments en DNA de leucòcits i no del teixit principal d'expressió del gen. El motiu que això sigui així rau en la dificultat o impossibilitat d'estudiar teixits com el fetge o l'intestí en persones sanes per motius ètics obvis. Els investigadors podem tenir accés a aquests teixits en pacients en els quals s'ha practicat una biòpsia. Aquests pacients, però, solen patir patologies que fan que el teixit estudiat es trobi notablement alterat, la qual cosa tampoc no suposa una situació òptima per a l'estudi de la regulació dels gens. Tot això fa que sovint ens veiem obligats a realitzar els estudis epigenètics en cèl·lules sanguínies. Malgrat que aquest fet pot semblar contradictori, ja que els patrons de metilació són específics de teixit, diversos estudis han demostrat que existeix una correlació positiva entre el grau de metilació de diversos teixits (adipós i adenocarcinomes, entre d'altres) i la metilació en cèl·lules circulants [247,248]. D'aquesta manera, s'ha establert que l'estudi dels patrons de metilació provinents de cèl·lules sanguínies ens pot oferir un reflex de l'efecte de la metilació sobre l'expressió de gens en teixits de difícil accés. Els resultats obtinguts, per tant, han de ser interpretats amb cura, però s'admet que ens poden ajudar a entendre quan la regulació epigenètica juga, o no, un paper en el control de determinats gens.

Tradicionalment, la predisposició genètica a desenvolupar una malaltia s'ha explorat mitjançant l'anàlisi de les variants genètiques (mitjançant estudis de gens candidats o estudis GWAS), sense tenir en compte altres factors genètics que també hi podrien tenir un paper clau. Per això, el segon objectiu d'aquesta tesi es va basar en l'estudi integrat de factors genètics heretats (variants genètiques) i factors genètics modulats per l'ambient (metilació del DNA), per tal de comprovar si actuen conjuntament o separatament sobre els trets lipídics i si l'addició de la nova informació incrementava la capacitat predictiva sobre la variabilitat intraindividual lipídica.

Com s'ha comentat anteriorment, ens ha interessat estudiar els mecanismes de regulació de la dislipèmia en aquells pacients d'alt risc, però de perfil lipídic relativament normal. Per tant, la principal població d'estudi en aquesta tesi ha estat una població caracteritzada per presentar alteracions metabòliques com la DT2, l'obesitat o la síndrome metabòlica. L'ur principal factor de risc cardiovascular és un perfil lipídic alterat caracteritzat per un perfil lipoproteic de DA. Tenint en compte aquest tipus de població, vàrem dissenyar l'estudi genètic i epigenètic del gen *APOA5* [249], ja que, com s'ha demostrat àmpliament, algunes de les seves variants són els principals determinants genètics dels nivells de TG i, a més, com hem demostrat en el primer article, la seva expressió està regulada epigenèticament.

Les variants del gen *APOA5* estudiades van ser les més associades a alts nivells de TG: el S19W (rs31135506) i el -1131T>C (rs662977), les quals, a més, representen els dos principals haplotips del gen, juntament amb la variant 724C>G (rs964184), la qual està situada a la regió intergènica *APOA5-ZNF259*. Degut a la freqüència de l'al·lel minoritari d'aquestes variants i per tal d'obtenir suficient poder estadístic, en aquest estudi vam seguir un reclutament segons el genotip i es van incloure 78 pacients: 44 portadors d'una o més variants descrites anteriorment i 34 WT per aquestes. Epigenèticament, vam analitzar els patrons de metilació en tres regions clau en l'expressió del gen: el promotor (ja que és una regió bàsica en l'inici de la transcripció), l'exó 2 (pel fet que és una zona predita *in silico* de modificacions a les cues de les histones, cosa que podria comportar canvis estructurals a la cromatina i influenciar així l'expressió) i la ICG (possible regió de regulació de promotors alternatius) a l'exó 3 del gen.

Tal com s'esperava i en concordança amb altres estudis, els nostres resultats van determinar que els portadors d'una o més variants estudiades presentaven de mitjana nivells de TG 1.57 cops més alts que els WT.

Per altra banda, vam establir per primer cop que, de les regions de metilació estudiades, la ICG de l'exó 3 estava hipermetilada en leucòcits i es correlacionava positivament amb els nivells de TG plasmàtics, cRPL i amb un perfil lipoproteic de DA (VLDL grans, LDL petites i HDL petites). Tot i que encara no es coneix ben bé la funcionalitat de les ICG, es creu que les ICG localitzades al cos del gen actuen com a promotors alternatius i, en funció del seu contingut en CG, poden propiciar canvis posicionals del DNA al nucleosoma i influenciar-ne així l'expressió [250–252]. Com a conseqüència del disseny experimental, no va ser possible determinar si els canvis en els nivells lipídics indueixen a canvis en els patrons de metilació, o si són els canvis en els patrons de metilació els que alteren els nivells lipídics. No obstant això, diversos estudis han demostrat que els nivells lipídics circulants poden variar el grau de metilació en leucòcits i altres tipus cel·lulars [253].

Per tant, és possible que l'increment d'AG, derivat de les alteracions dels pacients amb DT2, obesitat o síndrome metabòlica, indueixi, d'alguna manera, a un augment en la metilació de la ICG de l'exó 3 d'*APOA5* i promogui canvis estructurals de la cromatina, que, alhora, disminuirien l'expressió d'*APOA5* i contribuirien, així, a l'increment de TG plasmàtics i el desenvolupament de la DA.

Altres estudis també han associat factors de risc per a l'augment de TG, com l'obesitat o la IR, amb variacions en els patrons de metilació en teixits i cèl·lules circulants [254,255], la qual cosa suggereix que la variabilitat intraindividual en el grau de metilació identificada en el nostre estudi també podria ser secundària a processos patogènics i/o podria remarcar factors ambientals (com la dieta o l'hàbit tabàquic) que podrien influenciar l'expressió del gen.

El principal objectiu d'aquest estudi era veure si les variants genètiques i epigenètiques actuaven conjuntament. Vam poder confirmar que les variants genètiques i la metilació d'*APOA5* actuen conjuntament sobre els lípids, ja que els individus portadors d'alguna de les variants amb una

metilació $\geq 82\%$ a la ICG de l'exó 3 presentaven nivells de TG 2.35 cops més alts que els WT amb una metilació inferior. A més, l'addició de la informació de les variants genètiques i de la metilació va incrementar un 7.5% l'explicació de la variabilitat intraindividual dels TG en comparació dels models basats en els factors de risc tradicionals.

Aquestes dades, doncs, confirmen que la genètica i l'epigenètica de l'*APOA5* influencien de manera conjunta els nivells lipídics i corroboren la hipòtesi de l'estudi, és a dir, no tan sols els factors genètics, sinó també els epigenètics, de gens implicats en metabolisme lipídic poden augmentar la capacitat predictiva sobre els nivells de TG. Tot i que l'efecte sobre el gen *APOA5* és modest, creiem que la importància d'aquest resultat és que demostra que existeix aquest efecte additiu i que, si s'aplica a un conjunt de gens que participen en un determinat procés metabòlic, la millora en la predictibilitat pot ser significativa.

Després d'haver demostrat la importància d'un enfocament "epi/genètic" sobre la variabilitat lipídica, vam realitzar un tercer estudi, aquest cop, sobre el gen *PCSK9*.

PCSK9 és el principal regulador del cLDL en humans i algunes de les variants genètiques del seu gen codificant s'han associat a nivells extrems (tant alts com baixos) de cLDL. A més, s'ha evidenciat una forta correlació positiva entre els nivells circulants de *PCSK9* i cLDL en diversos grups poblacionals. Pot sorprendre que decidíssim estudiar el gen *PCSK9* en relació amb les dislipèmies que cursen amb nivells habitualment normals de colesterol. Hi ha un pas previ que ens va fer prendre aquesta direcció. El nostre grup va ser el primer a demostrar la correlació positiva entre *PCSK9* i un perfil lipoproteic alterat característic de DA en una població amb alt risc cardiovascular, però amb nivells normals de cLDL [135]. Concretament, vam descriure que, en pacients diabètics, una major concentració de *PCSK9* circulant no s'associava a més colesterol, però sí, a unes VLDL més grans, unes LDL més petites i unes HDL més petites. Això pot explicar-se pel fet que *PCSK9* pot unir-se no només als LDLR, sinó a altres membres de la seva família, com els VLDLR, i regular, així, també els nivells de TG [197,198].

Per aquest motiu, i seguint el segon objectiu d'aquesta tesi, vam voler determinar tant el paper de les variants com dels patrons de metilació de

PCSK9 sobre el perfil lipoproteic i ho vam estudiar en la mateixa població en la qual havíem analitzat *APOA5*.

Amb relació a la regulació genètica a través de la metilació del DNA, es van analitzar els patrons de metilació en dues regions de *PCSK9*: la ICG al promotor (pel seu paper regulador en una zona important en l'inici de la transcripció) i l'intró 10 (zona predita *in silico* de modificacions a les cues de les histones). En relació amb la part genètica, en aquest cas, vam optar per genotipar els 14 tagSNPs de *PCSK9*, fet que ens va permetre cobrir tota la variabilitat genètica del gen. Cada una d'aquestes variants representa la majoria de les variants d'una regió genòmica que es troba en fort desequilibri d'unió. Així, doncs, genotipant només una variant es poden identificar les possibles associacions entre la regió genòmica estudiada i característiques fenotípiques concretes. A més a més, vam decidir incloure a l'estudi la variant *LOF* R46L, ja que el nostre grup l'havia estudiada prèviament en pacients amb malalties metabòliques [256] i, a banda, les evidències suggerien també una relació entre nivells baixos de cLDL, variants *LOF* de *PCSK9* i el risc de DT2 [257].

Per primer cop, vam determinar que la regió de la ICG al promotor de *PCSK9* en leucòcits estava hipometilada i, en concret, la quarta CpG (CpG4) d'aquesta regió estudiada presentava una correlació positiva amb els nivells de cLDL, les partícules LDL totals i les seves subfraccions mitjanes i petites, però no amb els nivells de *PCSK9* circulant. A més, prenent com a referència la mediana de metilació de la CpG4 en la nostra població, vam determinar el 14% de metilació com a llindar en el qual els pacients amb una metilació inferior presentaven un perfil lipídic antiaterogen, caracteritzat per un 10% menys de colesterol total, un 14% menys de partícules LDL totals i un 19% menys LDL petites i mitjanes. Aquest llindar en el 14% de metilació podria ser el resultat de diferències intraindividuals en l'estil de vida que podrien alterar els nivells de metilació. La regió de l'intró 10 del gen estava hipermetilada i no s'associava a cap paràmetre lipídic, lipoproteic o proteic.

Aquesta relació entre el grau de metilació de la CpG4 en leucòcits amb els nivells de colesterol i les lipoproteïnes LDL, però no amb els nivells de *PCSK9*, podria reflectir un mecanisme epigenètic regulador al fetge. En aquest sentit, la CpG4 està localitzada en la regió activa d'unió del factor de transcripció SREBP1 (un dels principals reguladors de la transcripció de

PCSK9). Per tant, canvis en els nivells lipídics plasmàtics podrien promoure d'alguna forma canvis en el grau de metilació de *PCSK9* al fetge, la qual cosa, alhora, podria interferir en el lloc d'unió dels seus factors de transcripció i, per tant, alterar la transcripció gènica.

Genèticament, hem sigut els primers a determinar l'associació entre dues variants de *PCSK9*, el rs540796 i el rs483462, amb una disminució del 30% i el 35%, respectivament, sobre els nivells de TG i una disminució mitjana del 40% en el nombre de partícules VLDL totals i totes les seves subfraccions. A més a més, també hem pogut determinar que els portadors del rs540796 o del rs483462 estan un 20% i 15% més representats, respectivament, en els tercils amb els nivells més baixos de TG i VLDL grans, en comparació dels tercils més alts, fet que reforça la relació d'ambdues variants amb el metabolisme dels TG en aquest tipus de pacients.

Per altra banda, tal com era d'esperar, els nostres resultats van determinar que el R46L s'associa a disminucions de cLDL, apoB100 i PCSK9 circulant. Nosaltres, a més, vam determinar per primer cop que els portadors de la variant també presentaven una disminució mitjana del 30% en els nivells totals LDL i de les seves fraccions més petites (mitjanes i petites), cosa que reforça el paper protector de la variant envers la MCV. Aquests resultats van en concordança amb un article publicat recentment, en el qual s'associa R46L a un perfil lipoproteic antiaterogen [258].

Davant aquests resultats, vam fer una anàlisi integrada de factors epigenètics i genètics de *PCSK9* sobre la DA, que demostrava que els portadors de la variant rs540796 i/o rs483462 amb nivells de metilació a la CpG4 <14% estan un 80% més representats en pacients amb perfil lipoproteic normal, mentre que els WT d'ambdues variants amb metilació alta estan un 16% més representats entre els pacients que presenten DA. Aquestes dades demostren que els factors genètics de *PCSK9* (baixa metilació al promotor i les variants rs540796 i rs483462) actuen conjuntament protegint el desenvolupament de DA en pacients amb alteracions metabòliques.

Doncs, tal com hem demostrat al llarg d'aquesta tesi, ambdós factors, variants genètiques i metilació del DNA, contribueixen a l'explicació de la variabilitat intraindividual dels lípids i, en concret, del perfil lipoproteic. Per tant, la suma d'aquesta informació sobre els gens relacionats en el metabolisme lipídic podrien augmentar l'explicació de la predisposició

genètica a les dislipèmies. Tot i això, molts dels gens que influeixen en els nivells lipídics no estan directament relacionats amb aquests i, per tant, és important cercar altres gens per tal de poder explicar al 100% la variabilitat genètica intraindividual dels lípids.

Els resultats que hem obtingut en l'anàlisi genètica i epigenètica d'*APOA5* i *PCSK9* ens permeten identificar dos models. Mentre que, a l'*APOA5*, les variants genètiques i epigenètiques actuen conjuntament en una mateixa direcció (augmentant els TG), el cas de *PCSK9* ens mostra com les variants genètiques actuen sobre canvis qualitius del perfil lipídic derivats d'un augment de TG, mentre que la metilació del gen té un clar efecte sobre la concentració de colesterol LDL.

Com ja hem dit a l'inici d'aquesta discussió, el nostre objectiu era demostrar que l'estudi dels factors genètics i epigenètics, sols o combinats, ens poden ajudar a entendre els mecanismes que regulen la predisposició genètica a la dislipèmia relacionada amb la diabetis. En aquest sentit, ens va semblar interessant explorar l'anomenada diabetis tipus 3 (DT3), característica de la malaltia d'Alzheimer. La IR, com un dels factors clau per al desenvolupament de la DA, s'ha associat també a alteracions del metabolisme de la glucosa, canvis en el balanç energètic cerebral, augment de les espècies oxidatives i de l'estrès oxidatiu, disfunció mitocondrial, apoptosi i acumulació cerebral del polipèptid A β (revisat a [259]). A més a més, s'ha determinat que la prevalença del desenvolupament de malalties de deteriorament cognitiu (MDC) és major en pacients amb DT2 que en els no-diabètics [260]. En aquest sentit, en els últims anys, s'ha començat a desenvolupar la teoria de la DT3 com a associació fenotípica i metabòlica entre MDC (com l'Alzheimer) i la DT2 o l'obesitat [261].

Tant els DT2 com els pacients amb MDC comparteixen un perfil lipídic alterat caracteritzat per un increment de TG, uns nivells baixos de cHDL i, en referència al cLDL, els pacients amb MDC presenten nivells alts deguts a l'increment de LDL petites i denses [262], mentre que, com hem explicat anteriorment, en el cas dels DT2, aquests presenten nivells normals, però també amb un augment en proporció de les LDL més petites.

A més a més, els estudis han demostrat que ambdues malalties presenten una predisposició genètica comuna, per exemple el gen *APOE*, ja que l'*APOE* és clau en l'eliminació de les VLDL i RLP plasmàtics, i el seu genotip

s'ha associat a les dues malalties; l'al·lel $\epsilon 4$ és el principal factor de risc per desenvolupar MDC [263] i s'ha associat al desenvolupament de DT2 [264]. Un altre exemple el trobem en el gen *PLA2G3*, ja que ha sigut associat al dany neuronal induït per extrems oxidatiu en pacients amb MDC [265], i la seva proteïna codificant, PLA2G3, s'ha associat al desenvolupament d'arteriosclerosi i a la IR en pacients amb DT2 [266,267].

Per tant i pel fet que tant les MDC com les malalties amb alteracions metabòliques (DT2 o síndrome metabòlica) comparteixen alteracions en els nivells d'insulina, un perfil lipídic anormal i factors genètics, el nostre últim objectiu en la tesi va ser demostrar si gens implicats en el desenvolupament i patogènesi de MDC, i aparentment no vinculats amb la DT2, podrien regular el perfil lipídic en la nostra població amb alt risc cardiovascular.

Per això, vam determinar quines variants que predisposaven a MDC s'associaven també als nivells plasmàtics de cRLP (com a característica lipídica del perfil lipoproteic proaterogen i de la DT2) en una població de descoberta formada per 330 pacients amb MDC i 168 controls. Vam analitzar 48 variants en gens associats a l'Alzheimer, seleccionats a través d'estudis d'associació. Arran d'aquesta anàlisi, vam determinar les 5 variants associades a la concentració de cRLP en la població amb MDC i les vam genotipar a la nostra població de diabètics i síndrome metabòlica, buscant associacions entre aquestes variants i un perfil lipídic/lipoproteic alterat.

El rs3025786 (gen *PSEN1*), el rs73572039 (gen *PVRL2*), el rs1789072 (gen *DSC1*), el rs3788428 (gen *PLA2G3*) i el rs1049296 (gen *TF*) no només s'han associat prèviament a la predisposició a l'Alzheimer [268], sinó que, en la població amb MDC, els portadors presentaven també una disminució entre el 14-46% dels nivells de cRLP en comparació dels WT. En canvi, en la població d'alt risc cardiovascular, només els portadors del rs3025786 (*PSEN1*) presentaven un 27% menys en els nivells de cRLP en comparació dels WT.

En referència al perfil lipoproteic de la població de pacients amb DT2 i síndrome metabòlica, els portadors tant de l'al·lel rar del rs3025786 (*PSEN1*) com el del rs73572039 (*PVRL2*) presentaven disminucions en les VLDL totals i les seves subfraccions d'un 40% i 25% respectivament, en comparació dels WT. El rs3025786 s'ha associat a una disminució del risc

de desenvolupar Alzheimer, fet que va en línia amb els nostres resultats, ja que els pacients amb MDC o alteracions metabòliques acostumen a presentar nivells elevats de TG i VLDL, i la variant promou un perfil lipídic antiaterogen. En referència al rs73572039, es creu que el seu mecanisme d'acció està relacionat amb la infecció pel virus *Herpes simplex* tipus 1 [269], tot i que fins a la data, no hi ha dades del seu paper sobre el perfil lipídic en pacients amb MDC. El fet, però, que s'associï a nivells inferiors de TG i VLDL, també confereix un possible rol protector a aquesta variant.

Els portadors d'ambdós al·lels rars del rs1789072 (*DSC1*) presentaven un increment del colesterol total, cLDL i del nombre de partícules LDL totals i les seves subfraccions més petites (mitjanes i petites) en comparació dels WT. Aquesta variant s'ha associat a l'increment del risc de desenvolupar Alzheimer; per tant, els nostres resultats concorden amb els estudis que demostren un augment de les LDL petites i denses, tant en pacients amb MDC com en pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.

Davant les evidències obtingudes en aquest últim estudi corresponent al tercer objectiu de la tesi, podem dir que l'estudi de variants en gens que, fins ara, no s'havien relacionat amb el metabolisme lipídic podria ajudar a esclarir la variabilitat intraindividual del perfil lipídic/lipoproteic alterat, típic de malalties amb una alta complexitat etimològica, resultants d'interaccions entre factors ambientals i genètics, com la DT2 o la síndrome metabòlica.

En resum, l'estudi tant de variants genètiques com de canvis en el patró de metilació en gens ja relacionats amb el metabolisme lipídic com en gens encara no relacionats és necessari per explicar els mecanismes genètics implicats en alteracions del perfil lipídic i lipoproteic, típiques del pacient amb un alt risc cardiovascular com el diabètic o amb síndrome metabòlica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

- La metilació del DNA en el clúster *APOA1/C3/A4/A5* regula de forma específica en cada teixit la transcripció dels gens.
- La desmetilació del DNA en cèl·lules intestinals incrementa fortament l'expressió d'*APOA1*, *APOA4* i *APOA5*.
- La metilació de la ICG de l'exó 3 de l'*APOA5* correlaciona positivament amb la concentració plasmàtica de TG i un perfil lipoproteic de DA.
- La metilació de la ICG i les variants -1131T>C, S19W i 724G>C d'*APOA5* actuen en combinació sobre la predisposició individual a alts nivells de TG.
- L'addició de la informació dels patrons de metilació a la de les variants d'*APOA5* incrementa significativament la capacitat predictiva del gen sobre els nivells de TG.
- La metilació de la CpG4 de la ICG del promotor de *PCSK9* correlaciona positivament amb els nivells de colesterol total, partícules LDL totals i les seves subfraccions més petites.
- Les variants rs540796 i rs483462 de *PCSK9* s'associen a una disminució tant de TG com de totes les fraccions de VLDL, paràmetres que representen la principal característica lipídica dels pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.
- La hipometilació de la CpG4 de la ICG i les variants rs540796 i rs483462 podrien actuar conjuntament promovent un perfil lipoproteic antiaterogen.
- La variant R46L no només s'associa a nivells de cLDL i PCSK9 circulants més baixos, sinó també a una disminució en la concentració de partícules LDL totals, mitjanes i petites.
- Les variants rs305786 (gen *PSEN1*), rs73572039 (gen *PVRL2*), rs1789072 (gen *DSC1*), rs3788428 (gen *PLA2G3*) i rs1049296 (gen *TF*) que predisposen a MDC també s'associen a disminucions de la concentració del cRLP.
- Les variants rs305786 (gen *PSEN1*), rs73572039 (gen *PVRL2*) i rs1789072 (gen *DSC1*) predisposen a un perfil lipoproteic alterat en pacients amb DT2 o síndrome metabòlica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Referències

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

- [1] WHO, Global status report on noncommunicable diseases 2014, 2014. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>.
- [2] A. a Gehani, A.T. Al-Hinai, M. Zubaid, W. Almahmeed, M.M. Hasani, A.H. Yusufali, et al., Association of risk factors with acute myocardial infarction in Middle Eastern countries: the INTERHEART Middle East study., *Eur. J. Prev. Cardiol.* (2012) 23125402. doi:10.1177/2047487312465525.
- [3] R.C. Turner, H. Millns, H. a Neil, I.M. Stratton, S.E. Manley, D.R. Matthews, et al., Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23), *BMJ.* 316 (1998) 823–828. doi:10.1136/bmj.316.7134.823.
- [4] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), *Lancet.* 344 (1994) 1383–1389. doi:10.1016/S0140-6736(94)90566-5.
- [5] C.P. Cannon, M. a Blazing, R.P. Giugliano, A. McCagg, J.A. White, P. Theroux, et al., Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes, *N.Engl.J.Med.* 372 (2015) 150603140057001. doi:10.1056/NEJMoa1410489.
- [6] The Emerging Risk Factors Collaboration*, E. Di Angelantonio, N. Sarwar, P. Perry, S. Kaptoge, K.K. Ray, et al., Major Lipids, Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease, *JAMA.* 302 (2009) 1993. doi:10.1001/jama.2009.1619.
- [7] C.L. Haase, A. Tybjaerg-Hansen, A. Ali Qayyum, J. Schou, B.G. Nordestgaard, R. Frikke-Schmidt, LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: A mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012). doi:10.1210/jc.2011-1846.
- [8] B.F. Voight, G.M. Peloso, M. Orho-Melander, R. Frikke-Schmidt, M. Barbalic, M.K. Jensen, et al., Plasma HDL cholesterol and risk of

- myocardial infarction: A mendelian randomisation study, *Lancet*. 380 (2012) 572–580. doi:10.1016/S0140-6736(12)60312-2.
- [9] J.J. Freiberg, A. Tybjaerg-Hansen, J.S. Jensen, B.G. Nordestgaard, Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population., *Jama*. 300 (2008) 2142–52. doi:10.1001/jama.2008.621.
- [10] B.M. Ambegaonkar, L.D. Bash, D.R. Chirovsky, K. Jameson, S. Grant, G. Nocea, et al., Attainment of normal lipid levels among high cardiovascular risk patients: Pooled analysis of observational studies from the United Kingdom, Sweden, Spain and Canada, *Eur. J. Intern. Med.* 24 (2013) 656–663. doi:10.1016/j.ejim.2013.07.005.
- [11] A.D. Sniderman, K. Williams, J.H. Contois, H.M. Monroe, M.J. McQueen, J. De Graaf, et al., A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein b as markers of cardiovascular risk, *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*. 4 (2011) 337–345. doi:10.1161/CIRCOUTCOMES.110.959247.
- [12] S. Mora, J.D. Otvos, N. Rifai, R.S. Rosenson, J.E. Buring, P.M. Ridker, Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women, *Circulation*. 119 (2009) 931–939. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816181.
- [13] S. Mora, J.D. Otvos, R.S. Rosenson, A. Pradhan, J.E. Buring, P.M. Ridker, Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women, *Diabetes*. 59 (2010) 1153–1160. doi:10.2337/db09-1114.
- [14] B.A. Griffin, M.J. Caslake, B. Yip, G.W. Tait, C.J. Packard, J. Shepherd, Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation, *Atherosclerosis*. 83 (1990) 59–67. doi:10.1016/0021-9150(90)90131-2.
- [15] D.A. Heller, U. de Faire, N.L. Pedersen, G. Dahlen, G.E. McClearn, Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 1150–1156. doi:10.1056/NEJM199304223281603.

- [16] T.M. Teslovich, K. Musunuru, A. V Smith, A.C. Edmondson, I.M. Stylianou, M. Koseki, et al., Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids., *Nature*. 466 (2010) 707–13. doi:10.1038/nature09270.
- [17] C.J. Willer, E.M. Schmidt, S. Sengupta, G.M. Peloso, S. Gustafsson, S. Kanoni, et al., Discovery and refinement of loci associated with lipid levels., *Nat. Genet.* 45 (2013) 1274–83. doi:10.1038/ng.2797.
- [18] L.A. Lange, Y. Hu, H. Zhang, C. Xue, E.M. Schmidt, Z.Z. Tang, et al., Whole-exome sequencing identifies rare and low-frequency coding variants associated with LDL cholesterol, *Am. J. Hum. Genet.* 94 (2014) 233–245. doi:10.1016/j.ajhg.2014.01.010.
- [19] M. V. Holmes, F.W. Asselbergs, T.M. Palmer, F. Drenos, M.B. Lanktree, C.P. Nelson, et al., Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease, *Eur. Heart J.* 36 (2015) 539–550. doi:10.1093/eurheartj/eh571.
- [20] K. Musunuru, S. Kathiresan, Surprises from Genetic Analyses of Lipid Risk Factors for Atherosclerosis, *Circ. Res.* 118 (2016) 579–585. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306398.
- [21] T.A. Manolio, F.S. Collins, N.J. Cox, D.B. Goldstein, L.A. Hindorff, D.J. Hunter, et al., Finding the missing heritability of complex diseases., *Nature*. 461 (2009) 747–53. doi:10.1038/nature08494.
- [22] J.M. Ordovás, R. Robertson, E.N. Cléirigh, Gene-gene and gene-environment interactions defining lipid-related traits., *Curr. Opin. Lipidol.* 22 (2011) 129–36. doi:10.1097/MOL.0b013e32834477a9.
- [23] T.F. Whayne, Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease, *Mol. Biol. Rep.* 42 (2015) 765–776. doi:10.1007/s11033-014-3727-z.
- [24] J.A. Alegría-Torres, A. Baccarelli, V. Bollati, Epigenetics and lifestyle., *Epigenomics.* 3 (2011) 267–77. doi:10.2217/epi.11.22.
- [25] N. Hattori, T. Ushijima, Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455 (2014) 3–9. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.140.

- [26] K. Ogoshi, S. Hashimoto, Y. Nakatani, W. Qu, K. Oshima, K. Tokunaga, et al., Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells, *Genomics*. 98 (2011) 280–287. doi:10.1016/j.ygeno.2011.07.003.
- [27] M.S. Almén, E.K. Nilsson, J.A. Jacobsson, I. Kalnina, J. Klovins, R. Fredriksson, et al., Genome-wide analysis reveals DNA methylation markers that vary with both age and obesity, *Gene*. 548 (2014) 61–67. doi:10.1016/j.gene.2014.07.009.
- [28] J.C. Chambers, M. Loh, B. Lehne, A. Drong, J. Kriebel, V. Motta, et al., Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes: A nested case-control study, *Lancet Diabetes Endocrinol*. 3 (2015) 526–534. doi:10.1016/S2213-8587(15)00127-8.
- [29] S. Zaina, H. Heyn, F.J. Carmona, N. Varol, S. Sayols, E. Condom, et al., DNA methylation map of human atherosclerosis, *Circ. Cardiovasc. Genet*. 7 (2014) 692–700. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000441.
- [30] S.P. Guay, D. Brisson, B. Lamarche, P. Marceau, M.C. Vohl, D. Gaudet, et al., DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: New molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability, *Atherosclerosis*. 228 (2013) 413–420. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.033.
- [31] S.P. Guay, D. Brisson, B. Lamarche, D. Gaudet, L. Bouchar, Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid levels in familial hypercholesterolemia, *Epigenetics*. 9 (2014) 718–729. doi:10.4161/epi.27981.
- [32] L. Pfeiffer, S. Wahl, L.C. Pilling, E. Reischl, J.K. Sandling, S. Kunze, et al., DNA Methylation of Lipid-Related Genes Affects Blood Lipid Levels, *Circ. Cardiovasc. Genet*. 8 (2015) 334–342. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000804.
- [33] A.K. Petersen, S. Zeilinger, G. Kastenmüller, R.M. Werner, M. Brügger, A. Peters, et al., Epigenetics meets metabolomics: An epigenome-wide association study with blood serum metabolic

- traits, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 534–545.
doi:10.1093/hmg/ddt430.
- [34] S. Bekkering, J. Quintin, L.A.B. Joosten, J.W.M. Van Der Meer, M.G. Netea, N.P. Riksen, Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (2014) 1731–1738.
doi:10.1161/ATVBAHA.114.303887.
- [35] S.O. Olofsson, J. Boren, Apolipoprotein B: A clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis, *J. Intern. Med.* 258 (2005) 395–410. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01556.x.
- [36] M.M. Hussain, J. Shi, P. Dreizen, Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly., *J. Lipid Res.* 44 (2003) 22–32. doi:10.1194/jlr.R200014-JLR200.
- [37] I.T. da Silva, B. de Almeida-Pititto, S.R.G. Ferreira, Reassessing lipid metabolism and its potentialities in the prediction of cardiovascular risk., *Arch. Endocrinol. Metab.* 59 (2015) 171–80. doi:10.1590/2359-3997000000031.
- [38] J. Hulthe, B. Fagerberg, Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1162–1167. doi:10.1161/01.ATV.0000021150.63480.CD.
- [39] S.M. Boekholdt, B.J. Arsenault, S. Mora, T.R. Pedersen, J.C. LaRosa, P.J. Nestel, et al., Association of LDL Cholesterol, Non-HDL Cholesterol, and Apolipoprotein B Levels With Risk of Cardiovascular Events Among Patients Treated With Statins, *JAMA.* 307 (2012) 1302. doi:10.1001/jama.2012.366.
- [40] R.S. Rosenson, M.H. Davidson, B.J. Hirsh, S. Kathiresan, D. Gaudet, Genetics and causality of triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerotic cardiovascular disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 64 (2014) 2525–2540. doi:10.1016/j.jacc.2014.09.042.

- [41] V. Bamba, D.J. Rader, Obesity and Atherogenic Dyslipidemia, *Gastroenterology*. 132 (2007) 2181–2190. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.056.
- [42] L.A. Leiter, P. Lundman, P.M. da Silva, H. Drexel, C. Jünger, A.K. Gitt, Persistent lipid abnormalities in statin-treated patients with diabetes mellitus in Europe and Canada: Results of the Dyslipidaemia International Study, *Diabet. Med.* 28 (2011) 1343–1351. doi:10.1111/j.1464-5491.2011.03360.x.
- [43] N. Plana, D. Ibarretxe, A. Cabré, E. Ruiz, L. Masana, Prevalence of atherogenic dyslipidemia in primary care patients at moderate-very high risk of cardiovascular disease. *Cardiovascular risk perception.*, *Clin. Investig. Arterioscler.* 26 (2014) 274–284. doi:10.1016/j.arteri.2014.04.002.
- [44] K. Mittal, R.J. Mani, D.P. Katare, Type 3 Diabetes: Cross Talk between Differentially Regulated Proteins of Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25589. doi:10.1038/srep25589.
- [45] Y.-M. Kuo, M.R. Emmerling, C.L. Bisgaier, A.D. Essenburg, H.C. Lampert, D. Drumm, et al., Elevated Low-Density Lipoprotein in Alzheimer's Disease Correlates with Brain A β 1–42 Levels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 711–715. doi:10.1006/bbrc.1998.9652.
- [46] T. Matsuzaki, K. Sasaki, J. Hata, Y. Hirakawa, K. Fujimi, T. Ninomiya, et al., Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: The hisayama study, *Neurology*. 77 (2011) 1068–1075. doi:10.1212/WNL.0b013e31822e145d.
- [47] T. Watanabe, S. Koba, M. Kawamura, M. Itokawa, T. Idei, Y. Nakagawa, et al., Small Dense Low-Density Lipoprotein and Carotid Atherosclerosis in Relation to Vascular Dementia, *Metabolism*. 53 (2004) 476–482. doi:10.1016/j.metabol.2003.11.020.
- [48] F. Pont, L. Duvillard, E. Florentin, P. Gambert, B. Vergès, Early kinetic abnormalities of ApoB-containing lipoproteins in insulin-resistant women with abdominal obesity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1726–1732. doi:10.1161/01.ATV.0000032134.92180.41.

- [49] D.C. Chan, G.F. Watts, T.G. Redgrave, T.A. Mori, P.H.R. Barrett, Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: Associations with plasma apolipoprotein C-III concentration, *Metabolism*. 51 (2002) 1041–1046. doi:10.1053/meta.2002.33339.
- [50] M. Adiels, J. Westerbacka, A. Soro-Paavonen, A.M. Häkkinen, S. Vehkavaara, M.J. Caslake, et al., Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance, *Diabetologia*. 50 (2007) 2356–2365. doi:10.1007/s00125-007-0790-1.
- [51] M. Adiels, J. Borén, M.J. Caslake, P. Stewart, A. Soro, J. Westerbacka, et al., Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1697–1703. doi:10.1161/01.ATV.0000172689.53992.25.
- [52] L. Hodson, A.S.T. Bickerton, S.E. McQuaid, R. Roberts, F. Karpe, K.N. Frayn, et al., The contribution of splanchnic fat to VLDL triglyceride is greater in insulin-resistant than insulin-sensitive men and women: Studies in the postprandial state, *Diabetes*. 56 (2007) 2433–2441. doi:10.2337/db07-0654.
- [53] C. Taghibiglou, F. Rashid-Kolvear, S.C. Van Iderstine, H. Le-Tien, I. George Fantus, G.F. Lewis, et al., Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 793–803. doi:10.1074/jbc.M106737200.
- [54] W. Qiu, R. Kohen-Avramoglu, F. Rashid-Kolvear, C.S. Au, T.M. Chong, G.F. Lewis, et al., Overexpression of the Endoplasmic Reticulum 60 Protein ER-60 Downregulates ApoB100 Secretion by Inducing Its Intracellular Degradation via a Nonproteasomal Pathway: Evidence for an ER-60-Mediated and pCMB-Sensitive Intracellular Degradative Pathway, *Biochemistry*. 43 (2004) 4819–4831. doi:10.1021/bi034862z.
- [55] A. Kamagate, S. Qu, G. Perdomo, D. Su, H.K. Dae, S. Slusher, et al., FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL

- production in mice, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 2347–2364. doi:10.1172/JCI32914.
- [56] A. Kamagate, H.H. Dong, FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production, *Cell Cycle*. 7 (2008) 3162–3170. doi:10.1586/14789450.5.6.827.Adipose.
- [57] Y. Ohsaki, J. Cheng, K. Yamairi, X. Pan, M.M. Hussain, T. Fujimoto, Inhibition of ADP-ribosylation suppresses aberrant accumulation of lipidated apolipoprotein B in the endoplasmic reticulum, *FEBS Lett.* 587 (2013) 3696–3702. doi:10.1016/j.febslet.2013.09.036.
- [58] L. Asp, B. Magnusson, M. Rutberg, L. Li, J. Borén, S.O. Olofsson, Role of ADP ribosylation factor 1 in the assembly and secretion of apoB-100-containing lipoproteins, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 566–570. doi:10.1161/01.ATV.0000154135.21689.47.
- [59] J.D. Sparks, A.L. Magra, J.M. Chamberlain, C. O'Dell, C.E. Sparks, Insulin dependent apolipoprotein B degradation and phosphatidylinositide 3-kinase activation with microsomal translocation are restored in McArdle RH7777 cells following serum deprivation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469 (2016) 326–331. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.068.
- [60] J.D. Sparks, C. O'Dell, J.M. Chamberlain, C.E. Sparks, Insulin-dependent apolipoprotein B degradation is mediated by autophagy and involves class I and class III phosphatidylinositide 3-kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435 (2013) 616–620. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.029.
- [61] F. Diraison, P. Moulin, M. Beylot, Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease., *Diabetes Metab.* 29 (2003) 478–85. doi:10.1016/S1262-3636(07)70061-7.
- [62] J.M. Schwarz, P. Linfoot, D. Dare, K. Aghajanian, Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 43–50.

- [63] S. Ishii, K. Iizuka, B.C. Miller, K. Uyeda, Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15597–602. doi:10.1073/pnas.0405238101.
- [64] M. Fukasawa, Q. Ge, R.M. Wynn, S. Ishii, K. Uyeda, Coordinate regulation/localization of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) by two nuclear export signal sites: Discovery of a new leucine-rich nuclear export signal site, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1166–1169. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.115.
- [65] C. Sewter, D. Berger, R. V Considine, G. Medina, J. Rochford, T. Ciaraldi, et al., Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha., *Diabetes.* 51 (2002) 1035–1041. doi:10.2337/diabetes.51.4.1035.
- [66] B. Vergès, Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes, *Atherosclerosis.* 211 (2010) 353–360. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.028.
- [67] M.R. Taskinen, E.A. Nikkilä, T. Kuusi, K. Harmo, Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity., *Diabetologia.* 22 (1982) 46–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7037508>.
- [68] M. Terazawa-Watanabe, A. Tsuboi, K. Fukuo, T. Kazumi, Association of adiponectin with serum preheparin lipoprotein lipase mass in women independent of fat mass and distribution, insulin resistance, and inflammation., *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 12 (2014) 416–421. doi:10.1089/met.2014.0023.
- [69] M.R. Taskinen, M. Adiels, J. Westerbacka, S. Söderlund, J. Kahri, N. Lundbom, et al., Dual metabolic defects are required to produce hypertriglyceridemia in obese subjects, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 2144–2150. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224808.
- [70] J. Wang, A. Stančáková, P. Soininen, A.J. Kangas, J. Paananen, J. Kuusisto, et al., Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of glucose tolerance: A population-based study of

- 9399 Finnish men, *J. Intern. Med.* 272 (2012) 562–572.
doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02562.x.
- [71] W.T. Garvey, S. Kwon, D. Zheng, S. Shaughnessy, P. Wallace, A. Hutto, et al., Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance, *Diabetes*. 52 (2003) 453–462.
doi:10.2337/diabetes.52.2.453.
- [72] G.D. Norata, A. Pirillo, E. Callegari, A. Hamsten, A.L. Catapano, P. Eriksson, Gene expression and intracellular pathways involved in endothelial dysfunction induced by VLDL and oxidised VLDL, *Cardiovasc. Res.* 59 (2003) 169–180. doi:10.1016/S0008-6363(03)00335-3.
- [73] D. Milosavljevic, A. Kontush, S. Griglio, G. Le Naour, J. Thillet, M.J. Chapman, VLDL-induced triglyceride accumulation in human macrophages is mediated by modulation of LPL lipolytic activity in the absence of change in LPL mass, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1631 (2003) 51–60. doi:10.1016/S1388-1981(02)00355-4.
- [74] M. Ståhlman, H.T. Pham, M. Adiels, T.W. Mitchell, S.J. Blanksby, B. Fagerberg, et al., Clinical dyslipidaemia is associated with changes in the lipid composition and inflammatory properties of apolipoprotein-B-containing lipoproteins from women with type 2 diabetes, *Diabetologia*. 55 (2012) 1156–1166. doi:10.1007/s00125-011-2444-6.
- [75] J.C. Mamo, L. Szeto, G. Steiner, Glycation of very low density lipoprotein from rat plasma impairs its catabolism., *Diabetologia*. 33 (1990) 339–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2379765>.
- [76] S. Saheki, K. Shishino, Y. Hitsumoto, M. Murase, N. Takeuchi, K. Uchida, Decreased susceptibility of glycated very low density lipoproteins to lipoprotein lipase in vitro and prevention by glutathione., *J. Atheroscler. Thromb.* 1 (1994) 8–14.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9222863>.
- [77] L. Duvillard, F. Pont, E. Florentin, C. Galland-Jos, P. Gambert, B. Vergès, Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing

- lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: A stable isotope kinetic study, *Eur. J. Clin. Invest.* 30 (2000) 685–694. doi:10.1046/j.1365-2362.2000.00702.x.
- [78] G. Ramakrishnan, A. Arjuman, S. Suneja, C. Das, N.C. Chandra, The association between insulin and low-density lipoprotein receptors, *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 9 (2012) 196–204. doi:10.1177/1479164111430243.
- [79] V. Lankin, G. Konovalova, A. Tikhaze, K. Shumaev, E. Kumskova, M. Viigimaa, The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: A common molecular mechanism of vascular wall injure in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.* 395 (2014) 241–252. doi:10.1007/s11010-014-2131-2.
- [80] M. Nakhjavani, O. Khalilzadeh, L. Khajeali, A. Esteghamati, A. Morteza, A. Jamali, et al., Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol, *Lipids.* 45 (2010) 321–327. doi:10.1007/s11745-010-3401-8.
- [81] R.C. Hoogeveen, C.M. Ballantyne, H. Bang, G. Heiss, B.B. Duncan, A.R. Folsom, et al., Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: The Atherosclerosis Risk in Communities Study, *Diabetologia.* 50 (2007) 36–42. doi:10.1007/s00125-006-0533-8.
- [82] A.S. Kelly, D.R. Jacobs, A.R. Sinaiko, A. Moran, L.M. Steffen, J. Steinberger, Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children, *Pediatr. Diabetes.* 11 (2010) 552–555. doi:10.1111/j.1399-5448.2009.00640.x.
- [83] K.C.B. Tan, S.W.M. Shiu, Y. Wong, Plasma phospholipid transfer protein activity and small, dense LDL in type 2 diabetes mellitus, *Eur. J. Clin. Invest.* 33 (2003) 301–306. doi:10.1046/j.1365-2362.2003.01132.x.
- [84] M. Tani, A. Kawakami, Y. Mizuno, R. Imase, Y. Ito, K. Kondo, et al., Small Dense LDL Enhances THP-1 Macrophage Foam Cell

- Formation., *J. Atheroscler. Thromb.* 18 (2011) 698–704. doi:10.5551/jat.7161.
- [85] P.A. Gerber, C. Thalhammer, C. Schmied, S. Spring, B. Amann-Vesti, G.A. Spinas, et al., Small, Dense LDL Particles Predict Changes in Intima Media Thickness and Insulin Resistance in Men with Type 2 Diabetes and Prediabetes - A Prospective Cohort Study, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0072763.
- [86] R.J. Woodman, G.F. Watts, D.A. Playford, J.D. Best, D.C. Chan, Oxidized LDL and small LDL particle size are independently predictive of a selective defect in microcirculatory endothelial function in type 2 diabetes, *Diabetes, Obes. Metab.* 7 (2005) 612–617. doi:10.1111/j.1463-1326.2005.00478.x.
- [87] R.A. Kreisberg, Diabetic dyslipidemia., *Am. J. Cardiol.* 82 (1998) 67U–73U; discussion 85U–86U. doi:10.1016/j.metabol.2014.08.010.
- [88] V. Miksztowicz, D. Lucero, V. Zago, L. Cacciagiú, G. Lopez, E. Gonzalez Ballerga, et al., Hepatic lipase activity is increased in non-alcoholic fatty liver disease beyond insulin resistance, *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 28 (2012) 535–541. doi:10.1002/dmrr.2312.
- [89] B. Vergès, M. Adiels, J. Boren, P.H. Barrett, G.F. Watts, D. Chan, et al., Interrelationships between the kinetics of VLDL subspecies and hdl catabolism in abdominal obesity: A multicenter tracer kinetic study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 4281–4290. doi:10.1210/jc.2014-2365.
- [90] M. Ståhlman, B. Fagerberg, M. Adiels, K. Ekroos, J.M. Chapman, A. Kontush, et al., Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: Impact on small HDL particles, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1831 (2013) 1609–1617. doi:10.1016/j.bbalip.2013.07.009.
- [91] A. Zerrad-Saadi, P. Therond, S. Chantepie, M. Couturier, K.A. Rye, M.J. Chapman, et al., HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: Relevance

- to inflammation and atherogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 2169–2175. doi:10.1161/ATVBAHA.109.194555.
- [92] R.T. Iborra, A. Machado-Lima, G. Castilho, V.S. Nunes, D.S. Abdalla, E.R. Nakandakare, et al., Advanced Glycation in macrophages induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol and total sterols by decreasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1, *Lipids Health Dis.* 10 (2011) 172. doi:10.1186/1476-511X-10-172.
- [93] D.C. Patel, C. Albrecht, D. Pavitt, V. Paul, C. Pourreyron, S.P. Newman, et al., Type 2 diabetes is associated with reduced ATP-binding cassette transporter A1 gene expression, protein and function, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0022142.
- [94] J.P. Mauldin, M.H. Nagelin, A.J. Wojcik, S. Srinivasan, M.D. Skafien, C.R. Ayers, et al., Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus, *Circulation.* 117 (2008) 2785–2792. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741314.
- [95] L. Perségol, B. Vergès, M. Foissac, P. Gambert, L. Duveillard, Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation, *Diabetologia.* 49 (2006) 1380–1386. doi:10.1007/s00125-006-0244-1.
- [96] S.A. Sorrentino, C. Besler, L. Rohrer, M. Meyer, K. Heinrich, F.H. Bahlmann, et al., Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy, *Circulation.* 121 (2010) 110–122. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.836346.
- [97] P.N. Hopkins, M.N. Nanjee, L.L. Wu, M.G. McGinty, E.A. Brinton, S.C. Hunt, et al., Altered composition of triglyceride-rich lipoproteins and coronary artery disease in a large case-control study, *Atherosclerosis.* 207 (2009) 559–566. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.016.
- [98] S.D. Proctor, D.F. Vine, J.C.L. Mamo, Arterial retention of apolipoprotein B(48)- and B(100)-containing lipoproteins in

- atherogenesis., *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 461–470.
doi:10.1097/00041433-200210000-00001.
- [99] J.R. McNamara, P.K. Shah, K. Nakajima, L.A. Cupples, P.W.F. Wilson, J.M. Ordovas, et al., Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: Results from the Framingham Heart Study, *Atherosclerosis*. 154 (2001) 229–236. doi:10.1016/S0021-9150(00)00484-6.
- [100] A. Varbo, M. Benn, G.D. Smith, N.J. Timpson, A. Tybjaerg-Hansen, B.G. Nordestgaard, Remnant cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and blood pressure as mediators from obesity to ischemic heart disease, *Circ. Res.* 116 (2015) 665–673.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304846.
- [101] H. Yoshida, Y. Hirowatari, H. Kurosawa, D. Manita, H. Yanai, K. Ito, et al., Estimation of lipoprotein profile in patients with type II diabetes and its relevance to remnant lipoprotein cholesterol levels, *Atherosclerosis*. 222 (2012) 541–544.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.028.
- [102] M. Ai, A. Tanaka, K. Ogita, M. Sekinc, F. Numano, F. Numano, et al., Relationship between plasma insulin concentration and plasma remnant lipoprotein response to an oral fat load in patients with type 2 diabetes, *J. Am. Coll. Cardiol.* 38 (2001) 1628–1632.
doi:10.1016/S0735-1097(01)01611-4.
- [103] S. Kersten, Physiological regulation of lipoprotein lipase, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 1841 (2014) 919–933.
doi:10.1016/j.bbalip.2014.03.013.
- [104] S. Pastromas, A.-B. Terzi, D. Tousoulis, S. Koulouris, Postprandial lipemia: an under-recognized atherogenic factor in patients with diabetes mellitus., *Int. J. Cardiol.* 126 (2008) 3–12.
doi:10.1016/j.ijcard.2007.04.172.
- [105] G.-R.A. a, D.-L.J. J, P.-M.P. P, Del, Relevance of postprandial lipemia in metabolic syndrome., *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11 (2014) 920–7.
doi:10.2174/15701611113116660172.

- [106] J.P.H. Van Wijk, C.J.M. Halkes, D.W. Erkelens, M. Castro Cabezas, Fasting and daylong triglycerides in obesity with and without type 2 diabetes, *Metabolism*. 52 (2003) 1043–1049. doi:10.1016/S0026-0495(03)00106-9.
- [107] A. Ceriello, C. Taboga, L. Tonutti, L. Quagliaro, L. Piconi, B. Bais, et al., Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: Effects of short- and long-term simvastatin treatment, *Circulation*. 106 (2002) 1211–1218. doi:10.1161/01.CIR.0000027569.76671.A8.
- [108] A. Ceriello, R. Assaloni, R. Da Ros, A. Maier, L. Piconi, L. Quagliaro, et al., Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients, *Circulation*. 111 (2005) 2518–2524. doi:10.1161/01.CIR.0000165070.46111.9F.
- [109] A. Tetik Vardarli, E. Harman, V. Bozok Çetintaş, M. Kayıkçioğlu, E. Vardarli, A. Zengi, et al., Polymorphisms of lipid metabolism enzyme-coding genes in patients with diabetic dyslipidemia., *Anatol. J. Cardiol.* (2017). doi:10.14744/AnatolJCardiol.2016.7142.
- [110] R. Mar, P. Pajukanta, H. Allayee, M. Groenendijk, G. Dallinga-Thie, R.M. Krauss, et al., Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 Gene Cluster with Triglyceride Levels and LDL Particle Size in Familial Combined Hyperlipidemia, *Circ. Res.* 94 (2004) 993–999. doi:10.1161/01.RES.0000124922.61830.F0.
- [111] V.K. Ota, E.S. Chen, T.F. Ejchel, T.K. Furuya, D.R. Mazzotti, M.S. Cendoroglo, et al., APOA4 Polymorphism as a Risk Factor for Unfavorable Lipid Serum Profile and Depression, *J. Investig. Med.* 59 (2011) 966–970. doi:10.2310/JIM.0b013e31822467cd.
- [112] M. Guardiola, M. Cofán, I. de Castro-Oros, A. Cénarro, N. Plana, P.J. Talmud, et al., APOA5 variants predispose hyperlipidemic patients to atherogenic dyslipidemia and subclinical atherosclerosis, *Atherosclerosis*. 240 (2015) 98–104. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.008.

- [113] Y. Jang, Y.K. Ji, Y.K. Oh, E.L. Jong, H. Cho, J.M. Ordovas, et al., The -1131T??C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriacylglycerolemia; elevated small, dense LDL concentrations; and oxidative stress in nonobese Korean men, *Am. J. Clin. Nutr.* 80 (2004) 832–840. doi:80/4/832 [pii].
- [114] C.-Q. Lai, S. Demissie, L.A. Cupples, Y. Zhu, X. Adiconis, L.D. Parnell, et al., Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 2096–105. doi:10.1194/jlr.M400192-JLR200.
- [115] J. Ribalta, L. Figuera, J. Fernández-Ballart, E. Vilella, M. Castro Cabezas, L. Masana, et al., Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1597–1600. doi:10.1016/S1567-5688(02)80586-4.
- [116] C.Q. Lai, D. Corella, S. Demissie, L.A. Cupples, X. Adiconis, Y. Zhu, et al., Dietary intake of n-6 fatty acids modulates effect of apolipoprotein A5 gene on plasma fasting triglycerides, remnant lipoprotein concentrations, and lipoprotein particle size: The framingham heart study, *Circulation.* 113 (2006) 2062–2070. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.577296.
- [117] P.J. Talmud, S. Martin, M.-R. Taskinen, M.H. Frick, M.S. Nieminen, Y.A. Kesäniemi, et al., APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study., *J. Lipid Res.* 45 (2004) 750–6. doi:10.1194/jlr.M300458-JLR200.
- [118] G.M. van der Vleuten, A. Isaacs, W.-W. Zeng, E. ter Avest, P.J. Talmud, G.M. Dallinga-Thie, et al., Haplotype analyses of the APOA5 gene in patients with familial combined hyperlipidemia., *Biochim. Biophys. Acta.* 1772 (2007) 81–8. doi:10.1016/j.bbadis.2006.10.012.
- [119] M.A. Austin, P.J. Talmud, F.M. Farin, D.A. Nickerson, K.L. Edwards, D. Leonetti, et al., Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans, *Biochim.*

- Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1688 (2004) 1–9.
doi:10.1016/j.bbadis.2003.10.003.
- [120] H. S.E., B. L., I. C.R., O. J.D., K. D., D. R.J., et al., Loci for CETP, LPL, LIPC, and APOC3 affect plasma lipoprotein size and sub-population distribution in Hispanic and non-Hispanic white subjects: the Columbia University BioMarkers Study., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 12 (2002) 163–172.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36475226>.
- [121] A. Montali, G. Truglio, F. Martino, F. Ceci, G. Ferraguti, E. Ciociola, et al., Atherogenic dyslipidemia in children: Evaluation of clinical, biochemical and genetic aspects, *PLoS One.* 10 (2015).
doi:10.1371/journal.pone.0120099.
- [122] P. Echeverría, M. Guardiola, M. González, J.C. Vallvé, J. Puig, A. Bonjoch, et al., Polymorphisms in LPL, CETP, and HL protect HIV-infected patients from atherogenic dyslipidemia in an allele-dose-dependent manner., *J. Int. AIDS Soc.* 17 (2014) 19557.
doi:10.1089/AID.2015.0061.
- [123] A. Nohara, M. Kawashiri, T. Claudel, M. Mizuno, M. Tsuchida, M. Takata, et al., High frequency of a retinoid X receptor gamma gene variant in familial combined hyperlipidemia that associates with atherogenic dyslipidemia., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 923–928. doi:10.1161/01.ATV.0000258945.76141.8a.
- [124] G.E. Roytberg, O.O. Sharkhun, T.I. Ushakova, O.E. Serebryakova, The impact of TNF- α gene polymorphism, the development of atherogenic dyslipidemia and risk of atherosclerosis, *Vestn. Ross. Akad. Meditsinskikh Nauk.* (2010) 3–6.
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77952069403&partnerID=40&md5=602c9ee6b114de25189e92d7f0e3b168>.
- [125] P. Gomez, P. Perez-Martinez, C. Marin, A. Camargo, E.M. Yubero-Serrano, A. Garcia-Rios, et al., APOA1 and APOA4 gene polymorphisms influence the effects of dietary fat on LDL particle size and oxidation in healthy young adults., *J. Nutr.* 140 (2010) 773–8. doi:10.3945/jn.109.115964.

- [126] E. Esteve, E. Faure, F. Calvo, E. Aguillo, C. Blasco, M.J. Roche, et al., SNP3 polymorphism in apo A-V gene is associated with small dense LDL particles in Type 2 diabetes, *Diabetologia*. 47 (2004) 355–356. doi:10.1007/s00125-003-1308-0.
- [127] J.M. Ordovas, L. a Cupples, D. Corella, J.D. Otvos, D. Osgood, A. Martinez, et al., Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 1323–1329. doi:10.1161/01.ATV.20.5.1323.
- [128] P.J. Talmud, K.L. Edwards, C.M. Turner, B. Newman, J.M. Palmen, S.E. Humphries, et al., Linkage of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene to LDL particle size: use of a novel tetranucleotide repeat within the CETP promoter., *Circulation*. 101 (2000) 2461–2466.
- [129] M. Eto, M. Saito, M. Okada, Y. Kume, F. Kawasaki, M. Matsuda, et al., Apolipoprotein E genetic polymorphism, remnant lipoproteins, and nephropathy in type 2 diabetic patients, *Am. J. Kidney Dis.* 40 (2002) 243–251. doi:10.1053/ajkd.2002.34502.
- [130] K.C.B. Tan, A.W.K. Tso, O.C.K. Ma, R.W.C. Pang, K.S.L. Lam, Determinants of postprandial triglyceride and remnant-like lipoproteins in type 2 diabetes, *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 21 (2005) 209–214. doi:10.1002/dmrr.504.
- [131] M. Saito, M. Eto, K. Kaku, Remnant-like lipoprotein particles in type 2 diabetic patients with apolipoprotein E3/3 and apolipoprotein E2 genotypes, *Metabolism*. 51 (2002) 964–969. doi:10.1053/meta.2002.34014.
- [132] K. Yanagi, S. Yamashita, H. Hiraoka, M. Ishigami, S. Kihara, K.I. Hirano, et al., Increased serum remnant lipoproteins in patients with apolipoprotein E7 (apo E(Suita)), *Atherosclerosis*. 131 (1997) 49–58. doi:10.1016/S0021-9150(96)06068-6.
- [133] S. Lamon-Fava, B.F. Asztalos, T.D. Howard, D.M. Reboussin, K. V. Horvath, E.J. Schaefer, et al., Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of

- remnant lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 72 (2010) 169–175. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03644.x.
- [134] N. Matikainen, M.A. Burza, S. Romeo, A. Hakkarainen, M. Adiels, L. Folkersen, et al., Genetic variation in SULF2 is associated with postprandial clearance of triglyceride-rich remnant particles and triglyceride levels in healthy subjects, *PLoS One*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0079473.
- [135] M. Guardiola, N. Plana, D. Ibarretxe, A. Cabré, M. González, J. Ribalta, et al., Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidaemia in patients with high cardiovascular risk., *Clin. Sci. (Lond)*. 128 (2015) 877–82. doi:10.1042/CS20140832.
- [136] D. Nikolic, G. Castellino, M. Banach, P.P. Toth, E. Ivanova, A.N. Orekhov, et al., PPAR Agonists, Atherogenic Dyslipidemia and Cardiovascular Risk., *Curr. Pharm. Des.* (2016). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27719644>.
- [137] G. Camejo, Selective PPAR modulators (SPPARs) may fill the need for treatment of the atherogenic dyslipidemia of insulin resistance and type 2 diabetes: Can they reduce the associated cardiac risk?, *Atherosclerosis*. 249 (2016) 224–225. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.026>.
- [138] M. Rocha, C. Bañuls, L. Bellod, S. Rovira-Llopis, C. Morillas, E. Solá, et al., Association of serum retinol binding protein 4 with atherogenic dyslipidemia in morbid obese patients, *PLoS One*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0078670.
- [139] A. Cabré, N. Babio, I. Lázaro, M. Bulló, A. Garcia-Arellano, L. Masana, et al., FABP4 predicts atherogenic dyslipidemia development. The PREDIMED study, *Atherosclerosis*. 222 (2012) 229–234. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.003.
- [140] L. a Pennacchio, M. Olivier, J. a Hubacek, J.C. Cohen, D.R. Cox, J.C. Fruchart, et al., An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing., *Science*. 294 (2001) 169–173. doi:10.1126/science.1064852.

- [141] L. Qi, S. Liu, N. Rifai, D. Hunter, F.B. Hu, Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes, *Atherosclerosis*. 192 (2007) 204–210. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.006.
- [142] X. Mei, D. Atkinson, Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure: Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development, *Arch. Med. Res.* 46 (2015) 351–360. doi:10.1016/j.arcmed.2015.05.012.
- [143] I. Ramasamy, Update on the molecular biology of dyslipidemias, *Clin. Chim. Acta.* 454 (2016) 143–185. doi:10.1016/j.cca.2015.10.033.
- [144] A.B. Kohan, Apolipoprotein C-III: a potent modulator of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease., *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 22 (2015) 119–25. doi:10.1097/MED.000000000000136.
- [145] A.B. Kohan, F. Wang, C.-M. Lo, M. Liu, P. Tso, ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308 (2015) G472–G481. doi:10.1152/ajpgi.00098.2014.
- [146] A. Kretowski, J.E. Hokanson, K. McFann, G.L. Kinney, J.K. Snell-Bergeon, D.M. Maahs, et al., The apolipoprotein A-IV Gln360His polymorphism predicts progression of coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes, *Diabetologia*. 49 (2006) 1946–1954. doi:10.1007/s00125-006-0317-1.
- [147] W.R. Wong, E. Hawe, L.K. Li, G.J. Miller, V. Nicaud, L. a Pennacchio, et al., Apolipoprotein AIV gene variant S347 is associated with increased risk of coronary heart disease and lower plasma apolipoprotein AIV levels., *Circ. Res.* 92 (2003) 969–75. doi:10.1161/01.RES.0000069688.94567.7A.
- [148] H.N. Van der Vliet, M.G. Sammels, A.C.J. Leegwater, J.H.M. Levels, P.H. Reitsma, W. Boers, et al., Apolipoprotein A-V: A novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44512–44520. doi:10.1074/jbc.M106888200.

- [149] M. Guardiola, A. Alvaro, J.C. Vallvé, R. Rosales, R. Solà, J. Girona, et al., APOA5 gene expression in the human intestinal tissue and its response to in vitro exposure to fatty acid and fibrates, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22 (2012) 756–762. doi:10.1016/j.numecd.2010.12.003.
- [150] P.J. O'Brien, W.E. Alborn, J.H. Sloan, M. Ulmer, A. Boodhoo, M.D. Knierman, et al., The novel apolipoprotein a5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins, *Clin. Chem.* 51 (2005) 351–359. doi:10.1373/clinchem.2004.040824.
- [151] M. Merkel, J. Heeren, Give me A5 for lipoprotein hydrolysis!, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2694–2696. doi:10.1172/JCI26712.
- [152] R.B. Weinberg, V.R. Cook, J.A. Beckstead, D.D.O. Martin, J.W. Gallagher, G.S. Shelness, et al., Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34438–44. doi:10.1074/jbc.M303784200.
- [153] X. Shu, L. Nelbach, M.M. Weinstein, B.L. Burgess, J.A. Beckstead, S.G. Young, et al., Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav^{-/-} mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 2504–2509. doi:10.1161/ATVBAHA.110.210815.
- [154] M. Merkel, B. Loeffler, M. Kluger, N. Fabig, G. Geppert, L.A. Pennacchio, et al., Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21553–21560. doi:10.1074/jbc.M411412200.
- [155] P. Gin, L. Yin, B.S.J. Davies, M.M. Weinstein, R.O. Ryan, A. Bensadoun, et al., The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29554–29562. doi:10.1074/jbc.M802579200.

- [156] S.K. Nilsson, A. Lookene, J.A. Beckstead, J. Gliemann, R.O. Ryan, G. Olivecrona, Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family, *Biochemistry*. 46 (2007) 3896–3904. doi:10.1021/bi7000533.
- [157] I. Grosskopf, N. Baroukh, S.J. Lee, Y. Kamari, D. Harats, E.M. Rubin, et al., Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 2573–2579. doi:10.1161/01.ATV.0000186189.26141.12.
- [158] X. Shu, L. Nelbach, R.O. Ryan, T.M. Forte, Apolipoprotein A-V associates with intrahepatic lipid droplets and influences triglyceride accumulation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1801 (2010) 605–608. doi:10.1016/j.bbalip.2010.02.004.
- [159] F.G. Schaap, P.C.N. Rensen, P.J. Voshol, C. Vrans, H.N. Van Der Vliet, R.A.F.M. Chamuleau, et al., ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglycerides (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27941–27947. doi:10.1074/jbc.M403240200.
- [160] X. Shu, J. Chan, R.O. Ryan, T.M. Forte, Apolipoprotein A-V association with intracellular lipid droplets., *J. Lipid Res.* 48 (2007) 1445–1450. doi:10.1194/jlr.C700002-JLR200.
- [161] X.Y. Zheng, S.P. Zhao, B.L. Yu, C.L. Wu, L. Liu, Apolipoprotein A5 internalized by human adipocytes modulates cellular triglyceride content, *Biol. Chem.* 393 (2012) 161–167. doi:10.1515/hsz-2011-0259.
- [162] S. Becker, L. Schomburg, K. Renko, M. Tölle, M. Van Der Giet, U.J.F. Tietge, Altered apolipoprotein A-V expression during the acute phase response is independent of plasma triglyceride levels in mice and humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 833–839. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.105.
- [163] M. Olivier, X. Wang, R. Cole, B. Gau, J. Kim, E.M. Rubin, et al., Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human

- chromosome 11, *Genomics*. 83 (2004) 912–923.
doi:10.1016/j.ygeno.2003.11.016.
- [164] L. a Pennacchio, M. Olivier, J. a Hubacek, R.M. Krauss, E.M. Rubin, J.C. Cohen, Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels., *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 3031–3038. doi:10.1093/hmg/11.24.3031.
- [165] P.J. Talmud, J. Palmen, W. Putt, L. Lins, S.E. Humphries, Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28215–28220. doi:10.1074/jbc.M502144200.
- [166] J. Palmen, A.J.P. Smith, B. Dorfmeister, W. Putt, S.E. Humphries, P.J. Talmud, The functional interaction on in vitro gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA5*2, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoAV levels, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1782 (2008) 447–452. doi:10.1016/j.bbadis.2008.03.003.
- [167] N. Sarwar, M.S. Sandhu, S.L. Ricketts, A.S. Butterworth, E. Di Angelantonio, S. Mattheijs Boekholdt, et al., Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: Collaborative analysis of 101 studies, *Lancet*. 375 (2010) 1634–1639. doi:10.1016/S0140-6736(10)60545-4.
- [168] R. De Caterina, P.J. Talmud, P.A. Merlini, L. Foco, R. Pastorino, D. Altshuler, et al., Strong association of the APOA5-1131T>C gene variant and early-onset acute myocardial infarction, *Atherosclerosis*. 214 (2011) 397–403. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.011.
- [169] J. a Hubacek, Z. Skodová, V. Adámková, V. Lánská, R. Poledne, The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction., *Clin. Genet.* 65 (2004) 126–30. doi:199 [pii].
- [170] R. Elosua, J.M. Ordovas, L.A. Cupples, C. Lai, S. Demissie, C.S. Fox, et al., Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham

- Study., *J Lipid Res.* 47 (2006) 990–996. doi:10.1194/jlr.M500446-JLR200.
- [171] C.-F. Liu, Q.-F. Yang, X.-L. Chen, C.-Y. Liu, Apolipoprotein a5 gene polymorphism and risk for metabolic syndrome: a meta-analysis, *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 16 (2012) 1241–1245. doi:10.1089/gtmb.2012.0183.
- [172] P.J. Talmud, Rare APOA5 mutations-Clinical consequences, metabolic and functional effects. An ENID review, *Atherosclerosis.* 194 (2007) 287–292. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.010.
- [173] R. Do, N.O. Stitzel, H.-H. Won, A.B. Jørgensen, S. Duga, P. Angelica Merlini, et al., Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction, *Nature.* 518 (2015) 102–106. doi:10.1038/nature13917.
- [174] A. Brautbar, M. Barbalic, F. Chen, J. Belmont, S.S. Virani, S. Scherer, et al., Rare APOA5 promoter variants associated with paradoxical HDL cholesterol decrease in response to fenofibric acid therapy., *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1980–7. doi:10.1194/jlr.M034132.
- [175] C.J. Willer, S. Sanna, A.U. Jackson, A. Scuteri, L.L. Bonnycastle, R. Clarke, et al., Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease., *Nat. Genet.* 40 (2008) 161–169. doi:10.1038/ng.76.
- [176] A.P. Van De Woestijne, Y. Van Der Graaf, P.I.W. De Bakker, F.W. Asselbergs, W. Spiering, F.L.J. Visseren, Rs964184 (APOA5-A4-C3-A1) is related to elevated plasma triglyceride levels, but not to an increased risk for vascular events in patients with clinically manifest vascular disease, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0101082.
- [177] Y.J. Li, Y.S. Wei, X.H. Fu, D.L. Hao, Z. Xue, H. Gong, et al., The apolipoprotein CIII enhancer regulates both extensive histone modification and intergenic transcription of human apolipoprotein AI/CIII/AIV genes but not apolipoprotein AV, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 28436–28444. doi:10.1074/jbc.M710289200.

- [178] X. Prieur, H. Coste, J.C. Rodríguez, The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- α and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25468–25480. doi:10.1074/jbc.M301302200.
- [179] A. Genoux, H. Dehondt, A. Helleboid-Chapman, C. Duhem, D.W. Hum, G. Martin, et al., Transcriptional regulation of apolipoprotein A5 gene expression by the nuclear receptor ROR γ , *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1186–1192. doi:10.1161/01.ATV.0000163841.85333.83.
- [180] X. Prieur, F.G. Schaap, H. Coste, J.C. Rodríguez, Hepatocyte nuclear factor-4 α regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , AMP-activated protein kinase, and, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 3107–25. doi:10.1210/me.2005-0048.
- [181] K.H. Song, Orphan nuclear receptor Nur77 participates in human apolipoprotein A5 gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (2010) 63–66. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.168.
- [182] X. Prieur, T. Huby, H. Coste, F.G. Schaap, M.J. Chapman, J.C. Rodríguez, Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27533–27543. doi:10.1074/jbc.M503139200.
- [183] M. Nowak, A. Helleboid-Chapman, H. Jakel, G. Martin, D. Duran-Sandoval, B. Staels, et al., Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor., *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 1537–1548. doi:10.1128/MCB.25.4.1537-1548.2005.
- [184] X. sheng Huang, S.P. Zhao, M. Hu, L. Bai, Q. Zhang, W. Zhao, Decreased apolipoprotein A5 is implicated in insulin resistance-related hypertriglyceridemia in obesity, *Atherosclerosis*. 210 (2010) 563–568. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.004.
- [185] M. Abifadel, M. Varret, J.-P. Rabès, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, et al., Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant

- hypercholesterolemia., *Nat. Genet.* 34 (2003) 154–156.
doi:10.1038/ng1161.
- [186] N.G. Seidah, S. Benjannet, L. Wickham, J. Marcinkiewicz, S.B. Jasmin, S. Stifani, et al., The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 928–33. doi:10.1073/pnas.0335507100.
- [187] A. Zaid, A. Roubtsova, R. Essalmani, J. Marcinkiewicz, A. Chamberland, J. Hamelin, et al., Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration, *Hepatology.* 48 (2008) 646–654.
doi:10.1002/hep.22354.
- [188] P. Labonté, S. Begley, C. Gúevin, M.C. Asselin, N. Nassoury, G. Mayer, et al., PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression, *Hepatology.* 50 (2009) 17–24.
doi:10.1002/hep.22911.
- [189] Y.Q. Chen, J.S. Troutt, R.J. Konrad, PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day, *Lipids.* 49 (2014) 445–455. doi:10.1007/s11745-014-3895-6.
- [190] N. Ferri, G. Tibolla, A. Pirillo, F. Cipollone, A. Mezzetti, S. Pacia, et al., Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels, *Atherosclerosis.* 220 (2012) 381–386.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.026.
- [191] T.A. Lagace, PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells., *Curr. Opin. Lipidol.* 25 (2014) 387–93.
doi:10.1097/MOL.000000000000114.
- [192] R. Schulz, K.-D. Schlüter, PCSK9 targets important for lipid metabolism, *Clin. Res. Cardiol. Suppl.* (2017). doi:10.1007/s11789-017-0085-0.

- [193] B. Cariou, K. Si-Tayeb, C. Le May, Role of PCSK9 Beyond Liver Involvement, *Curr. Opin. Lipidol.* 26 (2015) 155–161. doi:10.1097/MOL.000000000000180.
- [194] M.G. Silverman, B.A. Ference, K. Im, S.D. Wiviott, R.P. Giugliano, S.M. Grundy, et al., Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions, *JAMA.* 316 (2016) 1289. doi:10.1001/jama.2016.13985.
- [195] E. Levy, A.B.D. Ouadda, S. Spahis, A.T. Sane, C. Garofalo, É. Grenier, et al., PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells, *Atherosclerosis.* 227 (2013) 297–306. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.023.
- [196] S. Rashid, H. Tavori, P.E. Brown, M.F. Linton, J. He, I. Giunzioni, et al., Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein B lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and -independent mechanisms, *Circulation.* 130 (2014) 431–441. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006720.
- [197] S. Poirier, G. Mayer, S. Benjannet, E. Bergeron, J. Marcinkiewicz, N. Nassoury, et al., The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 2363–2372. doi:10.1074/jbc.M708098200.
- [198] A. Roubtsova, M.N. Munkonda, Z. Awan, J. Marcinkiewicz, A. Chamberland, C. Lazure, et al., Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 785–791. doi:10.1161/ATVBAHA.110.220988.
- [199] H. Sun, A. Samarghandi, N. Zhang, Z. Yao, M. Xiong, B.B. Teng, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 1585–1595. doi:10.1161/ATVBAHA.112.250043.

- [200] M. Ruscica, N. Ferri, C. Macchi, M. Meroni, C. Lanti, C. Ricci, et al., Liver fat accumulation is associated with circulating PCSK9., *Ann. Med.* 3890 (2016) 1–8. doi:10.1080/07853890.2016.1188328.
- [201] A. Baass, G. Dubuc, M. Tremblay, E.E. Delvin, J. O’Loughlin, E. Levy, et al., Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents, *Clin. Chem.* 55 (2009) 1637–1645. doi:10.1373/clinchem.2009.126987.
- [202] S.G. Lakoski, T.A. Lagace, J.C. Cohen, J.D. Horton, H.H. Hobbs, Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 2537–2543. doi:10.1210/jc.2009-0141.
- [203] J. Miao, P. V. Manthena, M.E. Haas, A. V. Ling, D.J. Shin, M.J. Graham, et al., Role of insulin in the regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 1589–1596. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305688.
- [204] D. Ibarretxe, J. Girona, N. Plana, A. Cabré, R. Ferré, N. Amigó, et al., Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes and related metabolic disorders., *Clin. Investig. Arterioscler.* (2015) 1–8. doi:10.1016/j.arteri.2015.11.001.
- [205] I.K. Kotowski, A. Pertsemlidis, A. Luke, R.S. Cooper, G.L. Vega, J.C. Cohen, et al., A Spectrum of PCSK9 Alleles Contributes to Plasma Levels of Low-Density Lipoprotein Cholesterol, *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 410–422. doi:10.1086/500615.
- [206] J. Cohen, A. Pertsemlidis, I.K. Kotowski, R. Graham, C.K. Garcia, H.H. Hobbs, Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9, *Nat. Genet.* 37 (2005) 161–165. doi:10.1038/ng1509.
- [207] S. Poirier, G. Mayer, The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: New and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 1135–1148. doi:10.2147/DDDT.S36984.

- [208] S. Benjannet, J. Hamelin, M. Chrétien, N.G. Seidah, Loss- and gain-of-function PCSK9 variants: Cleavage specificity, dominant negative effects, and low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 33745–33755. doi:10.1074/jbc.M112.399725.
- [209] J.C. Cohen, E. Boerwinkle, T.H. Mosley, H.H. Hobbs, Sequence Variations in *PCSK9*, Low LDL, and Protection against Coronary Heart Disease, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 1264–1272. doi:10.1056/NEJMoa054013.
- [210] M.S. Sabatine, R.P. Giugliano, A.C. Keech, N. Honarpour, S.D. Wiviott, S.A. Murphy, et al., Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease, *N. Engl. J. Med.* (2017) NEJMoa1615664. doi:10.1056/NEJMoa1615664.
- [211] C.J. Cui, S. Li, J.J. Li, PCSK9 and its modulation, *Clin. Chim. Acta.* 440 (2015) 79–86. doi:10.1016/j.cca.2014.10.044.
- [212] J.A. Krysa, T.C. Ooi, S.D. Proctor, D.F. Vine, Nutritional and Lipid Modulation of PCSK9: Effects on Cardiometabolic Risk Factors, *J. Nutr.* (2017) jn235069. doi:10.3945/jn.116.235069.
- [213] P. Costet, B. Cariou, G. Lambert, F. Lalanne, B. Lardeux, A.L. Jarnoux, et al., Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 6211–6218. doi:10.1074/jbc.M508582200.
- [214] C.F.K.K. and J.L. Vikram Ravindra Shende, Minhao Wu, Amar Bhadur Singh, Bin Dong, Reduction of circulating PCSK9 and LDL-C levels by liver specific knockdown of HNF1a in normolipidemic mice, *J. Lipid Res.* 56 (2006) 1–30. doi:10.1194/jlr.M052969.
- [215] Y. Duan, Y. Chen, W. Hu, X. Li, X. Yang, X. Zhou, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor ?? activation by ligands and dephosphorylation induces proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and low density lipoprotein receptor expression, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23667–23677. doi:10.1074/jbc.M112.350181.
- [216] C. Langhi, C. Le May, S. Kourimate, S. Caron, B. Staels, M. Krempf, et al., Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9

- expression in human hepatocytes, *FEBS Lett.* 582 (2008) 949–955. doi:10.1016/j.febslet.2008.02.038.
- [217] S. Kourimate, C. Le May, C. Langhi, A.L. Jarnoux, K. Ouguerram, Y. Zaïr, et al., Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9666–9673. doi:10.1074/jbc.M705831200.
- [218] A.A. Momtazi, M. Banach, M. Pirro, E.A. Stein, A. Sahebkar, PCSK9 and diabetes: is there a link?, *Drug Discov. Today.* (2017). doi:10.1016/j.drudis.2017.01.006.
- [219] J.A. Martínez, F.I. Milagro, K.J. Claycombe, K.L. Schalinske, Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes., *Adv. Nutr.* 5 (2014) 71–81. doi:10.3945/an.113.004705.
- [220] A. Bansal, S.E. Pinney, DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes., *Pediatr. Diabetes.* 18 (2017) 167–177. doi:10.1111/pedi.12521.
- [221] M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, E. Li, DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development, *Cell.* 99 (1999) 247–257. doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6.
- [222] M. Okano, X. Shaoping, E. Li, Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases, *Nat. Genet.* 19 (1998) 219–220. doi:10.1038/890.
- [223] M. Fatemi, M.M. Pao, S. Jeong, E.N. Gal-Yam, G. Egger, D.J. Weisenberger, et al., Footprinting of mammalian promoters: Use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005). doi:10.1093/nar/gni180.
- [224] F. Larsen, G. Gundersen, R. Lopez, H. Prydz, CpG islands as gene markers in the human genome, *Genomics.* 13 (1992) 1095–1107. doi:10.1016/0888-7543(92)90024-M.

- [225] K. Luger, a W. Mäder, R.K. Richmond, D.F. Sargent, T.J. Richmond, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution., *Nature*. 389 (1997) 251–260. doi:10.1038/38444.
- [226] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications., *Nature*. 403 (2000) 41–45. doi:10.1038/47412.
- [227] K.P. Nightingale, L.P. O’Neill, B.M. Turner, Histone modifications: Signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16 (2006) 125–136. doi:10.1016/j.gde.2006.02.015.
- [228] G.C. Hon, R.D. Hawkins, B. Ren, Predictive chromatin signatures in the mammalian genome, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009). doi:10.1093/hmg/ddp409.
- [229] G.C. Shukla, J. Singh, S. Barik, MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions, *Mol Cell Pharmacol.* 3 (2011) 83–92. doi:10.1097/OPX.0b013e3182540562.The.
- [230] D.P. Bartel, MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions, *Cell*. 136 (2009) 215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [231] A. Grimson, K.K.H. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engel, L.P. Lim, D.P. Bartel, MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing, *Mol. Cell*. 27 (2007) 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.
- [232] S.P. Guay, D. Brisson, J. Munger, B. Lamarche, D. Gaudet, L. Bouchard, ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia, *Epigenetics*. 7 (2012) 464–472. doi:10.4161/epi.19633.
- [233] Y. Ma, C.E. Smith, C.Q. Lai, M.R. Irvin, L.D. Parnell, Y.C. Lee, et al., Genetic variants modify the effect of age on APOE methylation in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study, *Aging Cell*. 14 (2015) 49–59. doi:10.1111/accel.12293.
- [234] K. Richardson, J.A. Nettleton, N. Rotllan, T. Tanaka, C.E. Smith, C.Q. Lai, et al., Gain-of-function lipoprotein lipase variant rs13702

- modulates lipid traits through disruption of a MicroRNA-410 seed site, *Am. J. Hum. Genet.* 92 (2013) 5–14.
doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.020.
- [235] C.-Q. Lai, M.K. Wojczynski, L.D. Parnell, B.A. Hidalgo, M.R. Irvin, S. Aslibekyan, et al., Epigenome-wide association study of triglyceride postprandial responses to a high-fat dietary challenge, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 2200–2207. doi:10.1194/jlr.M069948.
- [236] P. Volkov, A.H. Olsson, L. Gillberg, S.W. Jørgensen, C. Brøns, K.F. Eriksson, et al., A genome-wide mQTL analysis in human adipose tissue identifies genetic variants associated with DNA methylation, gene expression and metabolic traits, *PLoS One.* 11 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0157776.
- [237] E.J. Parra, A. Mazurek, C.R. Gignoux, A. Sockell, M. Agostino, A.P. Morris, et al., Admixture mapping in two Mexican samples identifies significant associations of locus ancestry with triglyceride levels in the BUD13/ZNF259/APOA5 region and fine mapping points to rs964184 as the main driver of the association signal., *PLoS One.* 12 (2017) e0172880. doi:10.1371/journal.pone.0172880.
- [238] M. Das, M.R. Irvin, J. Sha, S. Aslibekyan, B. Hidalgo, R.T. Perry, et al., Lipid changes due to fenofibrate treatment are not associated with changes in DNA methylation patterns in the GOLDN study, *Front. Genet.* 6 (2015). doi:10.3389/fgene.2015.00304.
- [239] C. Caussy, S. Charrière, C. Marçais, M. Di Filippo, A. Sassolas, M. Delay, et al., An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers apoA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site, *Am. J. Hum. Genet.* 94 (2014) 129–134. doi:10.1016/j.ajhg.2013.12.001.
- [240] G. Cui, Z. Li, R. Li, J. Huang, H. Wang, L. Zhang, et al., A functional variant in APOA5/A4/C3/A1 gene cluster contributes to elevated triglycerides and severity of cad by interfering with MicroRNA 3201 binding efficiency, *J. Am. Coll. Cardiol.* 64 (2014) 267–277. doi:10.1016/j.jacc.2014.03.050.
- [241] R. Tao, X. Xiong, R.A. DePinho, C.X. Deng, X.C. Dong, FoxO3 transcription factor and Sirt6 deacetylase regulate low density

- lipoprotein (LDL)-cholesterol homeostasis via control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 29252–29259. doi:10.1074/jbc.M113.481473.
- [242] T. Zambrano, M.H. Hirata, Ivaró Cerda, E.L. Dorea, G.A. Pinto, M.C. Gusukuma, et al., Impact of 3'UTR genetic variants in PCSK9 and LDLR genes on plasma lipid traits and response to atorvastatin in Brazilian subjects: A pilot study, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8 (2015) 5978–5988.
- [243] T. Frahnöw, M.A. Osterhoff, S. Hornemann, M. Kruse, M.A. Surma, C. Klose, et al., Heritability and responses to high fat diet of plasma lipidomics in a twin study., *Sci. Rep.* [w dрукu] (2017). doi:10.1038/s41598-017-03965-6.
- [244] A.L. Miranda-Lora, J. Vilchis-Gil, M. Molina-Díaz, S. Flores-Huerta, M. Klönder-Klönder, Heritability, parental transmission and environment correlation of pediatric-onset type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome-related traits, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 126 (2017) 151–159. doi:10.1016/j.diabres.2017.02.005.
- [245] M. Guardiola, I. Oliva, A. Guillaumet, Á. Martín-Trujillo, R. Rosales, J.C. Vallvé, et al., Tissue-specific DNA methylation profiles regulate liver-specific expression of the APOA1/C3/A4/A5 cluster and can be manipulated with demethylating agents on intestinal cells, *Atherosclerosis*. 237 (2014) 528–535. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.029.
- [246] A.-A. Houde, C. Légaré, S. Biron, O. Lescelleur, L. Biertho, S. Marceau, et al., Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women, *BMC Med. Genet.* 16 (2015) 29. doi:10.1186/s12881-015-0174-1.
- [247] Y.T. Huang, S. Chu, E.B. Loucks, C.L. Lin, C.B. Eaton, S.L. Buka, et al., Epigenome-wide profiling of DNA methylation in paired samples of adipose tissue and blood, *Epigenetics*. 11 (2016) 227–236. doi:10.1080/15592294.2016.1146853.

- [248] E. Danese, A.M. Minicozzi, M. Benati, M. Montagnana, E. Paviati, G.L. Salvagno, et al., Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma – the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer, *Br. J. Cancer*. 109 (2013) 807–813. doi:10.1038/bjc.2013.351.
- [249] I. Oliva, M. Guardiola, J.-C. Vallvé, D. Ibarretxe, N. Plana, L. Masana, et al., APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate circulating triacylglycerol levels., *Clin. Sci. (Lond)*. 130 (2016) 2053–2059. doi:10.1042/CS20160433.
- [250] Y. a Medvedeva, M. V Fridman, N.J. Oparina, D.B. Malko, E.O. Ermakova, I. V Kulakovskiy, et al., Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome, *BMC Genomics*. 11 (2010) 48. doi:10.1186/1471-2164-11-48.
- [251] A.P. Bauer, D. Leikam, S. Krinner, F. Notka, C. Ludwig, G. Längst, et al., The impact of intragenic CpG content on gene expression, *Nucleic Acids Res*. 38 (2010) 3891–3908. doi:10.1093/nar/gkq115.
- [252] A.K. Maunakea, R.P. Nagarajan, M. Bilenky, T.J. Ballinger, C. D'Souza, S.D. Fouse, et al., Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters, *Nature*. 466 (2010) 253–257. doi:10.1038/nature09165.
- [253] K.F. Dekkers, M. van Iterson, R.C. Slieker, M.H. Moed, M.J. Bonder, M. van Galen, et al., Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells, *Genome Biol*. 17 (2016) 138. doi:10.1186/s13059-016-1000-6.
- [254] E. Nilsson, P.A. Jansson, A. Perfilyev, P. Volkov, M. Pedersen, M.K. Svensson, et al., Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes, *Diabetes*. 63 (2014) 2962–2976. doi:10.2337/db13-1459.
- [255] M.C. García-Cardona, F. Huang, J.M. García-Vivas, C. López-Camarillo, B.E. del Río Navarro, E. Navarro Olivos, et al., DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin

- resistance, *Int. J. Obes.* 38 (2014) 1457–1465.
doi:10.1038/ijo.2014.30.
- [256] J. Girona, D. Ibarretxe, N. Plana, S. Guaita-Esteruelas, N. Amigo, M. Heras, et al., Circulating PCSK9 levels and CETP plasma activity are independently associated in patients with metabolic diseases, *Cardiovasc. Diabetol.* 15 (2016) 107. doi:10.1186/s12933-016-0428-z.
- [257] A.F. Schmidt, D.I. Swerdlow, M. V Holmes, R.S. Patel, Z. Fairhurst-Hunter, D.M. Lyall, et al., PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 5 (2017) 97–105. doi:10.1016/S2213-8587(16)30396-5.
- [258] R. Verbeek, M. Boyer, S.M. Boekholdt, G.K. Hovingh, J.J.P. Kastelein, N. Wareham, et al., Carriers of the PCSK9 R46L variant are characterized by an antiatherogenic lipoprotein profile assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy - Brief report, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 43–48.
doi:10.1161/ATVBAHA.116.307995.
- [259] S.M. de la Monte, L. Longato, M. Tong, J.R. Wands, Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis., *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 10 (2009) 1049–60.
doi:10.1016/j.ygyno.2014.12.035.Pharmacologic.
- [260] G.J. Biessels, I.J. Deary, C.M. Ryan, Cognition and diabetes: a lifespan perspective, *Lancet Neurol.* 7 (2008) 184–190.
doi:10.1016/S1474-4422(08)70021-8.
- [261] R. Kandimalla, V. Thirumala, P.H. Reddy, Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* (2016). doi:10.1016/j.bbadis.2016.08.018.
- [262] S. Vikarunnessa, M.F. Weiner, G.L. Vega, LDL phenotype in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 36 (2013) 571–575. doi:10.3233/JAD-130443.
- [263] G. William Rebeck, J.S. Reiter, D.K. Strickland, B.T. Hyman, Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: Allelic variation

- and receptor interactions, *Neuron*. 11 (1993) 575–580.
doi:10.1016/0896-6273(93)90070-8.
- [264] R. Chaudhary, A. Likidilid, T. Peerapatdit, D. Tresukosol, S. Srisuma, S. Ratanamanechat, et al., Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease, *Cardiovasc. Diabetol.* 11 (2012) 36.
doi:10.1186/1475-2840-11-36.
- [265] A. Martínez-García, I. Sastre, M. Recuero, J. Aldudo, E. Vilella, I. Mateo, et al., PLA2G3, a gene involved in oxidative stress induced death, is associated with Alzheimer's disease., *J. Alzheimers. Dis.* 22 (2010) 1181–7. doi:10.3233/JAD-2010-101348.
- [266] M. Napolitano, H.S. Kruth, E. Bravo, Phospholipase A2 mediates apolipoprotein-independent uptake of chylomicron remnant-like particles by human macrophages, *Int. J. Vasc. Med.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/501954.
- [267] X. Lin, M. Xu, J. Tang, L. Mai, X. Wang, M. Ren, et al., Effect of intensive insulin treatment on plasma levels of lipoprotein-associated phospholipase A2 and secretory phospholipase A2 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes, *Lipids Health Dis.* 15 (2016) 203. doi:10.1186/s12944-016-0368-3.
- [268] L. Bertram, M.B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, R.E. Tanzi, Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database, *Nat. Genet.* 39 (2007) 17–23.
doi:10.1038/ng1934.
- [269] L. Civitelli, M.E. Marcocci, I. Celestino, R. Piacentini, E. Garaci, C. Grassi, et al., Herpes simplex virus type 1 infection in neurons leads to production and nuclear localization of APP intracellular domain (AICD): implications for Alzheimer's disease pathogenesis, *J. Neurovirol.* 21 (2015) 480–490. doi:10.1007/s13365-015-0344-0.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

Llistat d'abreviatures

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

ABCA1: Membre 1 de la subfamília A de les proteïnes ATP-binding cassette

ABCG1: Membre 1 de la subfamília G de les proteïnes ATP-binding cassette

ABCG2: Membre 2 de la subfamília G de les proteïnes ATP-binding cassette

ARF-1: Factor 1 de la ribosilació de l'ADP

AG: Àcids grassos

Apo AI-V: Apolipoproteïnes A-I, A-II, A-IV i A-V

APOA1-5: Gens codificants per les Apo AI-V

Apo B48-100: Apolipoproteïnes B48 i B100

Apo CII-III: Apolipoproteïnes C-I, C-II i C-III

APOC3: Gen codificant per l'apoC-III

Apo E: Apolipoproteïna E

APOB: Gen de l'apoB

APOER: Receptor de l'apoE

Apos: Apolipoproteïnes

CD36: Clúster de diferenciació 36

CE: Èsters de colesterol

CETP: Proteïna transferidora d'èsters de colesterol

CETP: Gen codificant per la CETP

cHDL: Colesterol HDL

ChREBP: Proteïnes d'unió a elements de resposta a carbohidrats

cLDL: Colesterol LDL

CpG: Dinucleòtid CG

CpG4: Quarta CpG estudiada de la ICG al promotor de *PCSK9*

cRLP: Colesterol dels RLP

CT: Colesterol total

DA: Dislipèmia aterògena

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DNMT: DNA metil-transferases tipus 3A, 3B i 1

DT2: Diabetis tipus 2

DT3: Diabetis tipus 3

EWAS: Estudi d'associació de l'epigenoma complet

FABP4: Proteïna d'unió a àcids grassos lliures tipus 4

FXR: Receptor X farnesoid

GOF: Variant genètica de guany de funció

GPIHBP1: Proteïna d'unió a HDL tipus 1 ancorada a glicosilfosfatidilinositol

GWAS: Estudi d'associació del genoma complet

HDL: Lipoproteïna d'alta densitat

HNF1 α -4: Factors nuclears 1 α i 4 hepàtics

HP: Lipasa hepàtica

| Llistat d'abreviatures

HTG: Hipertrigliceridèmia

ICG: Illa CpG

IDL: Lipoproteïna de densitat intermèdia

IR: Resistència a la insulina

LCAT: Leucina-colesterol aciltransferasa

LDL: Lipoproteïna de baixa densitat

LDLR: Receptor de la LDL

LIPC: Gen codificant de la HL

LOF: Variant genètica de pèrdua de funció

LPL: Lipoproteïna lipasa

LPL: Gen codificant per la LPL

LRP: Proteïna relativa al LDLR

LXR: Receptor X hepàtic

MCV: Malalties cardiovasculars

MDC: Malalties deteriorament cognitiu

miRNA: MicroRNA

MTTP: Proteïna microsomal transferidora de triglicèrids

NPC1L1: Proteïna Niemann-Pick C1-Like-1

mQTL: Regió de metilació de caràcter qualitatiu

NR1H4: Gen codificant per FXR

MRE: Element de reconeixement de miRNA

MRESS: *Seed site* dels MRE

Nur77: Factor de creixement nervi IB

PCSK9: Proproteïna convertasa subtilsin/kexina tipus 9

PCSK9: Gen codificant de la PCSK9

PI3K: Fosfoinositol-3 kinasa

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat

PLA2G3: Fosfolipasa A2 del grup III

PLA2G3: Gen codificant de la PLA2G3

PLD1: Fosfolipasa D1

PLTP: Proteïna transferidora de fosfolípids

PPAR: Receptor actiu per la proliferació del peroxisoma

PPAR α - γ : PPAR tipus α i γ

Qm: Quilomicrons

RBP4: Proteïna d'unió a retinol tipus 4

RE: Reticle endoplasmàtic

RISC: Complex inductor del silenci del RNA

RLP: Lipoproteïna romanent

RMN: Ressonància magnètica nuclear

RNA: Àcid ribonucleic

ROR: Receptor orfe relatiu a RAR

sdLDL: LDL petita i densa

SNP: Polimorfisme d'un sol nucleòtid

SORLA: Receptor relatiu a la sortilina

SR-BI: Membre 1 de la classe B dels receptors scavenger

SREBP: Proteïnes d'unió a elements de resposta a esterols

TagSNP: Variant representant d'una regió del genoma amb un alt desequilibri d'unió, que representa el conjunt de polimorfismes presents en aquesta regió

TG: Triglicèrids

TNF: Gen codificant pel factor de necrosi tumoral α

TRL: Lipoproteïnes riques en triglicèrids

VLDL: Lipoproteïna de molt baixa densitat

VLDL₁: VLDL gran

WT: Genotip salvatge

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Estudi genètic i epigenètic sobre la dislipèmia aterògena en pacients amb diabetis tipus 2,
síndrome metabòlica o diabetis tipus 3

Iris Oliva Rodríguez