



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

SEGREGACIÓN FAMILIAR DE MUTACIONES EN LOS GENES LPL, LMF1 Y APOA5 EN SUJETOS CON HIPERTRIGLICERIDEMIAS PRIMARIAS

ITZIAR LAMIQUIZ MONEO

DIRECTORES:

DRA. ISABEL DE CASTRO- ORÓS

DR. FERNANDO CIVEIRA MURILLO

MASTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

SEPTIEMBRE 2013



ÍNDICE

ABREVIATURAS	pág. 7
INTRODUCCIÓN	pág. 9
1. Metabolismo lipídico	pág. 9
1.1 Metabolismo de las lipoproteínas	pág. 10
1.1.1 Metabolismo de los quilomicrones	pág. 10
1.1.2 Metabolismo de las VLDL	pág. 13
1.1.3 Metabolismo de las LDL	pág. 15
1.1.4 Metabolismo de las HDL	pág. 15
1.2 Metabolismo de los Triglicéridos	pág. 17
2. Dislipidemias	pág. 19
2.1 Hipertrigliceridemia	pág. 19
2.2 Fenotipo de la Hipertrigliceridemia	pág. 20
2.3 Hipertrigliceridemia y riesgo cardiovascular	pág. 21
3. Variantes genéticas asociadas a la Hipertrigliceridemia	pág. 22
3.1 Lipoprotein lipasa y triglicéridos	pág. 22
3.2 Apolipoproteína A- V y los triglicéridos	pág. 24
3.3 Factor de la maduración de la Lipasa y los triglicéridos	pág. 25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	pág. 28
MATERIALES Y MÉTODOS	pág. 29
1. Descripción de la población de estudio	pág. 29
2. Obtención de la muestra	pág. 29
3. Obtención del DNA genómico	pág. 29
4. Análisis de la concentración y la pureza	pág. 29
5. Amplificación por PCR de los genes de estudio	pág. 30
5.1 Gen <i>LPL</i>	pág. 31
5.2 Gen <i>LMF1</i>	pág. 33
5.3 Gen <i>APOA5</i>	pág. 36
6. Purificación del producto de PCR mediante ExoSap-IT(USB)	pág. 38
7. Reacción de secuenciación	pág. 38
8. Análisis bioinformático	pág. 40
9. Extracción del RNA	pág. 40

ÍNDICE

10. Obtención del cDNA	pág. 41
11. Diseño de los cebadores para la amplificación del cDNA	pág. 42
12. Amplificación del cDNA	pág. 43
13. Análisis estadístico	pág. 43
RESULTADOS	pág. 45
1. Características de la población de estudio	pág. 45
2. Identificación de las variantes genéticas en el gen <i>LPL</i>	pág. 45
2.1 Variantes no comunes del gen <i>LPL</i>	pág. 45
2.2 Estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes comunes del gen <i>LPL</i>	pág. 47
2.3 Análisis bioinformático de las variantes en el gen <i>LPL</i>	pág. 48
2.4 Análisis funcional de la mutación en la posición c.1018+2	pág. 51
2.4.1 Extracción de RNA	pág. 51
2.4.2 Obtención de cDNA	pág. 52
2.5 Estudio de la segregación familiar de las mutaciones en <i>LPL</i>	pág. 53
3. Identificación de las variantes en el gen <i>LMF1</i>	pág. 54
3.1 Análisis bioinformático de las variantes en el gen <i>LMF1</i>	pág. 56
4. Identificación de las variantes en el gen <i>APOA5</i>	pág. 58
4.1 Análisis bioinformático de las variantes en el gen <i>APOA5</i>	pág. 58
DISCUSIÓN	pág. 61
CONCLUSIONES	pág. 63
BIBLIOGRAFÍA	pág. 64

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

INTRODUCCIÓN

1.1 Lipoproteína	pág. 10
1.2 Metabolismo de los quilomicrones	pág. 11
1.3 Lipólisis periférica de los TG	pág. 12
1.4 Aclaramiento hepático de los remanentes	pág. 13
1.5 Síntesis hepática de las VLDL	pág. 14
1.6 Síntesis y maduración de las partículas de HDL	pág. 16
1.7 Catabolismo de HDL hepático	pág. 17
1.8 Metabolismo de los TG	pág. 19
1.9 Estructura de la lipoprotein lipasa	pág. 23
1.10 Papel del Lmf1 en el ensamblaje y maduración de la LpL	pág. 26
1.11 Estructura de Lmf1	pág. 27

RESULTADOS

4.1 Esquema del ajuste de LpL	pág. 51
4.2 Visualización del gel del producto de PCR del fragmento exón 5-3'UTR del cDNA del gen <i>LPL</i>	pág. 52
4.3 Segregación familiar de la mutación c.1018+2G>A	pág. 53
4.4 Segregación familiar de la mutación p.Gln133X	pág. 53

Tablas

INTRODUCCIÓN

1.1 Clasificación de Fredrickson de las dislipemias primarias	pág. 21
---	---------

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR de LPL	pág. 31
3.2 Cebadores para la amplificación del gen <i>LPL</i>	pág. 32

ÍNDICE

3.3 Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR de LMF1	pág. 33
3.4 Cebadores para la amplificación del gen <i>LMF1</i>	pág. 35
3.5 Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR de APOA5	pág. 36
3.6 Cebadores para la amplificación del gen <i>APOA5</i>	pág. 37
3.7 Cantidades de los reactivos en la reacción de secuenciación	pág. 38
3.8 Cantidades y concentraciones para la reacción de cDNA	pág. 42
3.9 Secuencia y características de los cebadores empleados para la amplificación del fragmento que contiene la mutación c.1018+2G>A	pág.42
3.10 Cantidades y concentraciones de los reactivos de la PCR para la amplificación de cDNA	pág. 43
RESULTADOS	
4.1 Características de la población de estudio	pág. 46
4.2 Frecuencias de las variantes raras en el gen <i>LPL</i> encontradas en los sujetos de estudio	pág. 47
4.3 Frecuencias genotípicas de las variantes comunes del gen <i>LPL</i> encontrados en sujetos con HTG del estudio	pág. 48
4.4 Frecuencias alélicas de los SNPs identificadas en el gen <i>LPL</i> en la población HTG y los 1000 Genomas de la población europea	pág. 49
4.5 Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen <i>LPL</i>	pág. 50
4.6 Características del RNA obtenido	pág. 52
4.7 Frecuencias de las variantes raras en el gen <i>LMF</i> encontradas en los sujetos de estudio	pág. 54
4.8 Frecuencias genotípicas de las variantes comunes del gen <i>LMF1</i> encontrados en sujetos con HTG del estudio	pág. 55
4.9 Frecuencias alélicas de los SNPs identificadas en el gen <i>LMF1</i> en la población HTG	

ÍNDICE

y los 1000 Genomas de la población europea	pág. 56
4.10 Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen <i>LMF1</i>	pág. 57
4.11 Frecuencias genotípicas de los SNPs del gen <i>APOA5</i> encontradas en los sujetos del estudio	pág. 59
4.12 Frecuencias alélicas de los SNPs identificadas en el gen <i>APOA5</i> en la población HTG y los 1000 Genomas de la población europea	pág. 59
4.13 Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen <i>APOA5</i>	pág. 60

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

2- MG: 2 monoacilglicerol

AGL: Ácidos Grasos Libres

Apo: Apolipoproteína

APOA5: Gen de la apolipoproteína A-V

AVC: Accidente Vascular Cerebral

CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol

COP II: Proteína Coatome II

dNTP's: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DGAT: Enzima acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa

ECP: Enfermedad Coronaria Prematura

ECV: Enfermedad cardiovascular

FL: Fosfolípidos

GPIHBP1: glucosil-fosfatidil-inositol anclado a la lipoproteína de alta densidad unida a una proteína 1

HDL: Lipoproteína de elevada densidad

IDL: Lipoproteína de densidad intermedia

IMC: Índice de Masa Corporal

Kb: Kilobases

LH: Lipasa hepática

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LMF1: Factor de maduración de la lipasa 1

LPL: Lipoproteína lipasa

MTP: proteína microsomal Triglyceride Transfer Protein

ABREVIATURAS

PDI: proteína disulfito isomerasa

PLTP: proteína transferidora de fosfolípidos.

QM: Quilomicrón

QMr: Quilomicrón remanente

RE: Retículo Endoplasmático

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

TG: triglicéridos

TRLs: lipoproteínas ricas en triglicéridos

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en los países desarrollados y se considera que seguirá siendo en el futuro. La Organización Mundial de la Salud registró que en el año 2008 murieron por esta causa 17,3 millones de personas, representando un 30% de todas las muertes registradas en el mundo. Se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías e ictus y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte.

Una de las principales causas de las enfermedades cardiovasculares es la alteración del metabolismo lipídico, produciendo acumulación de lípidos a nivel arterial y la formación de placa de ateroma, causantes de cardiopatía isquémica y otros accidentes cardiovasculares¹.

Los lípidos plasmáticos son aportados por la dieta mediante absorción intestinal y por la síntesis endógena a nivel hepático. En el torrente sanguíneo, son transportados a lugares de modificación y almacenamiento. El metabolismo lipídico está finamente regulado para mantener el aporte entre las fuentes de aporte y las vías de eliminación (vías metabólicas y de excreción). La alteración de cualquiera de los mecanismos que mantienen la homeostasis produce una alteración en las concentraciones de los lípidos provocando una dislipemia¹.

1. Metabolismo lipídico

El metabolismo lipídico está finamente regulado por factores genéticos, ambientales y la interacción entre ambos. Todos ellos pueden alterar el metabolismo generando una situación conocida como dislipemia¹.

Clínicamente los lípidos más importantes en plasma son los triglicéridos (TG) y el colesterol². El colesterol juega numerosos papeles: es componente de las membranas celulares, precursor de hormonas esteroideas y de la vitamina D, y es necesario para la activación neuronal, como señal molecular³. El 80% del colesterol es derivado de la síntesis endógena por la HMG-CoA Reductasa y, sólo un pequeño porcentaje proviene de la dieta. Los TG son una llave energética formada por tres ácidos grasos unidos a un glicerol. Son sintetizados en el intestino y en células hepáticas y transportados hacia el plasma. Posteriormente se produce la lipólisis en la superficie endotelial, liberando los ácidos grasos en las células periféricas para su β -oxidación o su almacenaje⁴.

INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo de las lipoproteínas

La insolubilidad del colesterol y los TG requiere que sean transportados por macromoléculas esféricas llamadas lipoproteínas. Las lipoproteínas son agregados moleculares esféricos de 20 Å de grosor formados por un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y TG) cubiertos por una capa polar de 2 nm formada a su vez por apolipoproteínas (Apo), fosfolípidos y colesterol libre (CL)⁴.

El grupo de las lipoproteínas alberga 5 grandes clases en función de sus características físico químicas: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las principales lipoproteínas transportadoras de TG son los QM y las VLDL, mientras que el colesterol es principalmente transportado por las LDL y las HDL⁵.

Figura 1.1: Lipoproteína

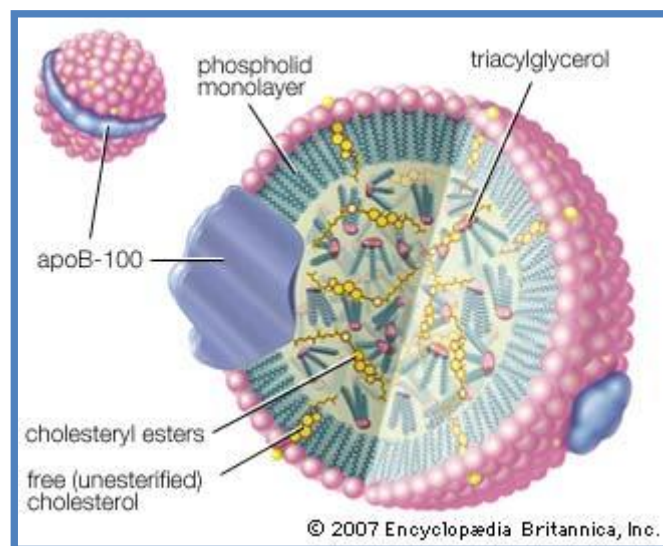


Imagen de una lipoproteína LDL. Se observan los esteres de colesterol, colesterol no esterificado, TG, FL y la apolipoproteína Apo B-100.

1.1.1 Metabolismo de los quilomicrones

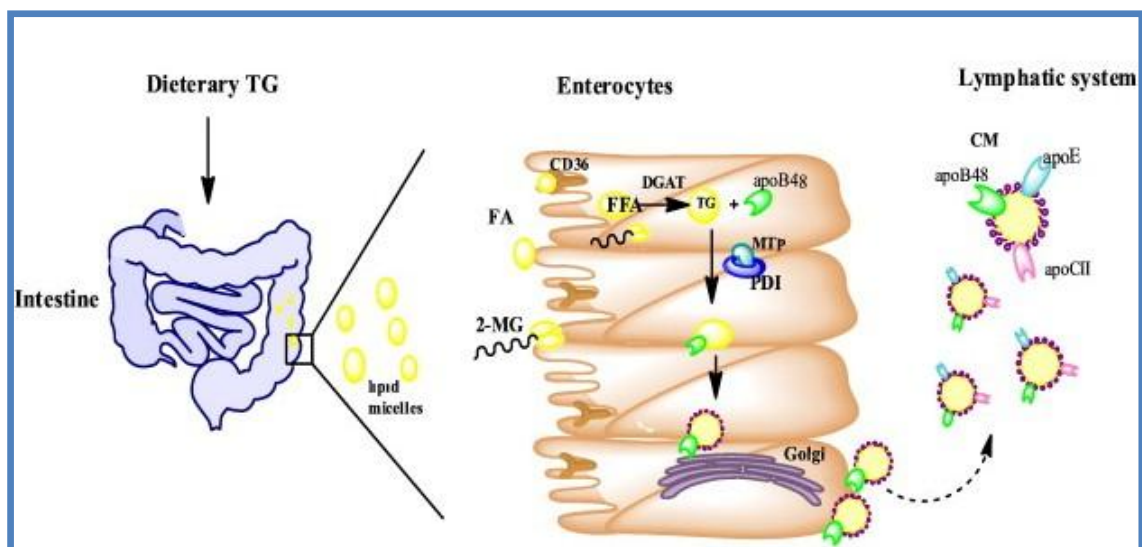
Los QM son las lipoproteínas más ricas en TG, con un contenido superior al 85%, y tan solo un 2% de proteína. Además, contienen las Apo B-48, Apo C-III, Apo C-II y Apo A-V⁴. Los TG derivados de la dieta son hidrolizados en el intestino por medio de la lipasa pancreática en 2-monoacilglicerol (2-MG) y ácidos grasos (AG), que pueden ser absorbidos por los enterocitos por difusión o por transporte específico como CD36⁶. En el interior del enterocito, el 2-MG y AG son resintetizados en TG por la acil-CoA diacilglicerolaciltransferasa (DGAT)⁷.

INTRODUCCIÓN

Posteriormente la proteína Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP), en conjunto con la proteína Disulphite isomerasa (PDI), facilita la lipidación de la Apo B-48, en el primer paso para la formación del QM. Posteriormente, son trasladados al aparato de Golgi mediante el complejo COP II (proteína Coatome II) y los transportadores SAR1a y SAR1b. Los QM nacientes son exocitados desde la membrana basolateral del enterocito hacia el torrente circulatorio⁶.

Una vez ha entrado la lipoproteína en la circulación, intercambia apolipoproteínas con las HDL enriqueciéndose en Apo E y Apo C-II y Apo C-I hasta formarse el QM maduro.

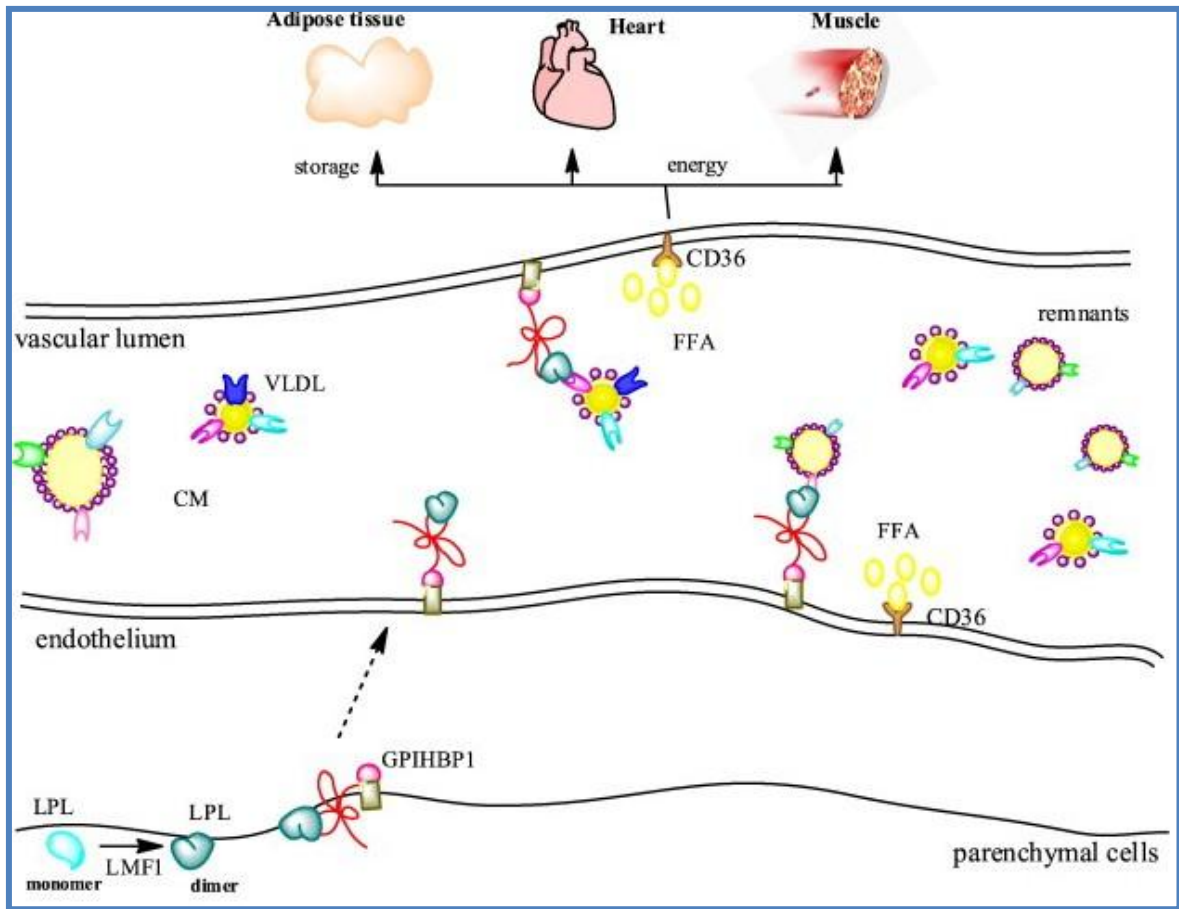
Figura 1.2. Síntesis de Quilomicrones



Tomada de Hassing HC, Surendran RP. "Pathophysiology of hypertriglyceridemia". Biochimica et Biophysica Acta. 2011

El QM maduro es sustrato de la lipoprotein lipasa (LpL)⁸, enzima glicoproteica anclada por medio de los glicosaminocicanos a la superficie endotelial. La LpL es sintetizada en el parénquima celular del tejido adiposo, corazón o músculo esquelético. El factor 1 de maduración de la lipasa (LMF1) es esencial para el propio ensamblaje dimerico de la LpL⁹. Posteriormente, la LpL es transportada a la superficie endotelial donde se une a la proteína glicosil-fosfatidil-inositol anclado a la lipoproteína de alta densidad unida a una proteína 1 (GPIHBP1)¹⁰. La GPIHBP1 proporciona una plataforma para la LpL y las lipoproteínas ricas en TG, resultando allí la hidrólisis de TG. Parece que tiene una función esencial para el transporte de LpL desde el endotelio celular hacia la superficie de los capilares¹¹.

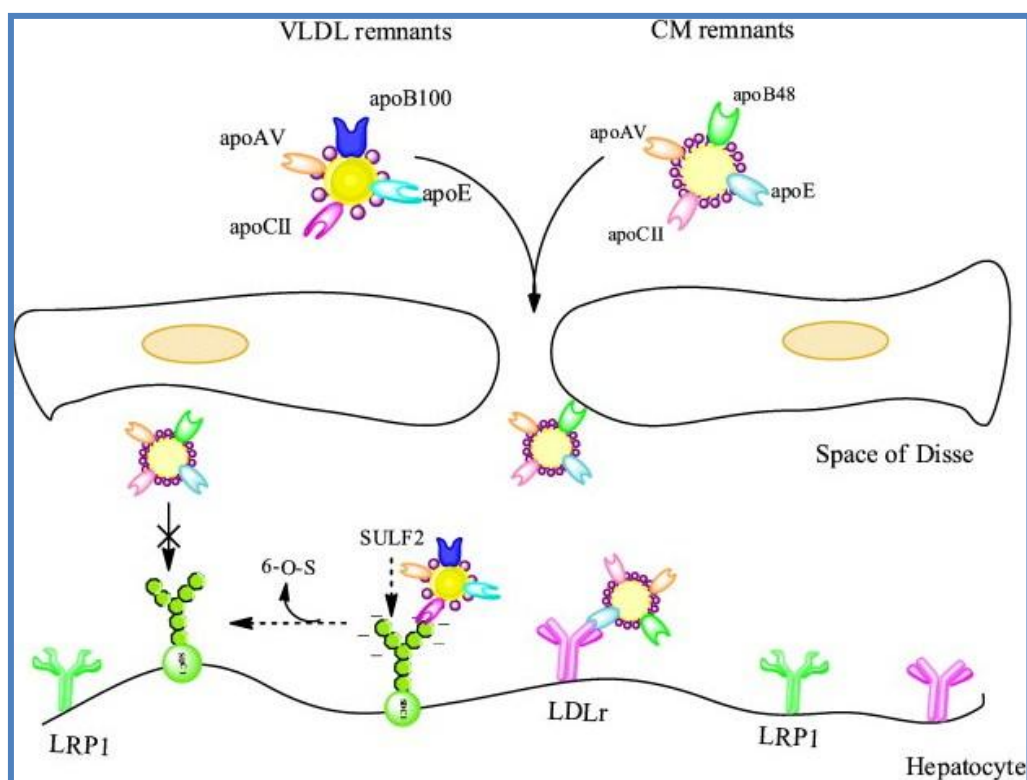
Figura 1.3: Lipólisis periférica de TG.



Tomada de Hassing HC, Surendran RP. "Pathophysiology of hypertriglyceridemia". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011

La LpL hidroliza los triglicéridos a 2-MG y AGL que son capturados por los tejidos adiposo y muscular. EL QM, tras perder los TG, mediante intercambio con las HDL, pierde contenido en Apo C-II y se enriquece en Apo C-III, dando lugar a los QM remanentes (QMr). Los QMr van al hígado, donde son metabolizados por la lipasa hepática (LH) ¹².

La Apo E es esencial para el aclaramiento de los QMr, ya que contiene residuos cargados positivamente que facilitan la unión con los dominios negativos de los receptores hepáticos. Finalmente los QMr ricos en Apo E y LpL, son reconocidos por el receptor LDL y por el LRP1 (proteína relacionada con el receptor LDL 1) e internalizados en las células hepáticas mediante endocitosis ¹³.

Figura 1.4: Aclaramiento hepático de remanentes

Tomada de Hassing HC, Surendran RP. "Pathophysiology of hypertriglyceridemia". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011

1.1.2 Metabolismo de las VLDL

Las VLDL son lipoproteínas de origen hepático precursoras de las LDL y participan en el transporte de las grasas endógenas. Son ricas en TG, que suponen el 55% de la masa total frente al 10-15% de colesterol. También contienen Apo B-100 y pequeñas cantidades de Apo Cs y E.

Los TG son sintetizados en el hígado y empaquetados en partículas de VLDL con Apo B-100 como proteína principal. Los AG requeridos son derivados de la síntesis *de novo*, usando glucosa como sustrato, o por lipólisis en el tejido adiposo por acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL). Los AGL penetran en el hígado y la enzima aciltransferasadiacilglicerolmicrosomal (DGAT) generará TG para almacenarlos en pequeñas gotas⁷. La enzima MTP es esencial para la lipidación de Apo B-100 y el complejo COPII es responsable de la translocación de partículas pequeñas de VLDL desde el RE hasta Golgi, donde se acaba formando la VLDL madura con las Apos B y E¹⁴.

Se ha postulado que la Apo C-III puede contribuir a la producción de VLDL, por lo menos en modelos animales¹⁵. Un aumento de la expresión de Apo C-III coincide con un aumento de la expresión de VLDL. Cuando las VLDL llegan al plasma, son retenidas por los proteoglicanos

INTRODUCCIÓN

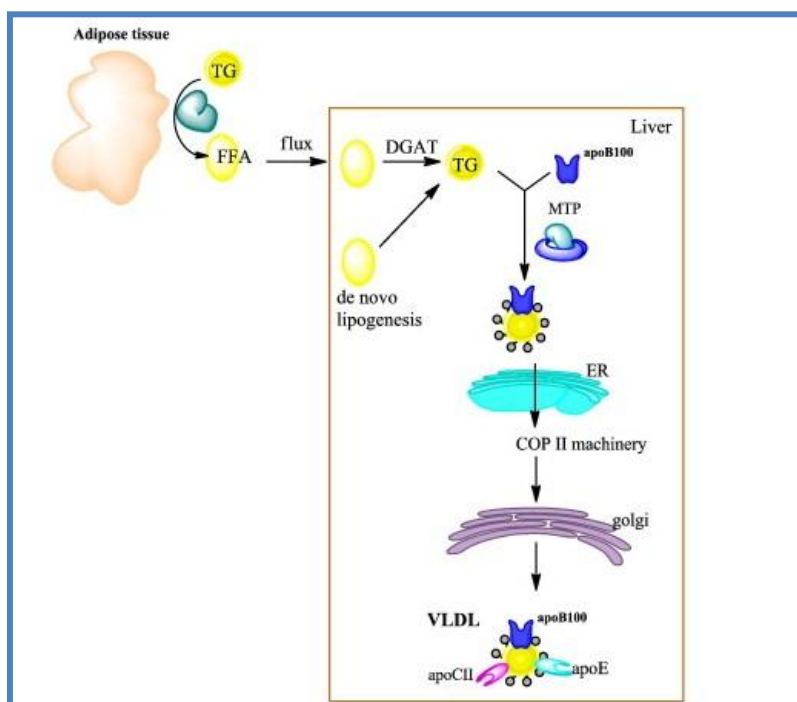
heparin sulfato y sus TG son hidrolizados por la acción de LpL liberando AGL y glicerol. Las lipoproteínas VLDL intercambian apolipoproteínas con las HDL de manera similar a lo que sucede en los QM. Finalmente, la partícula queda libre y convertida en VLDLr, conocida como IDL. Esta partícula puede ser captada de nuevo por el hepatocito mediante LDLr o ser metabolizada a LDL por la LH.

El papel de Apo A-V en la facilitación de la producción de VLDL remanentes no está determinado. Recientemente se ha demostrado que niveles altos de Apo A-V, localizado en gotas lipídicas en el hígado, coinciden con altos niveles de TG almacenados, sugiriendo un papel de Apo A-V en la movilización de TG en la producción de VLDL¹⁶. La disponibilidad de parte de TG determina el destino de Apo B y consecuentemente la secreción de partículas de VLDL¹⁷.

Por otra parte, las VLDL pueden ser reconocidas por receptores en función de su contenido en Apo E en tejidos como corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, cerebro y macrófagos¹⁸.

Las IDL son productos de la degradación de las VLDL que contienen Apo B100, Apo C y Apo E. Tienen un diámetro de cerca de 35 nm y una vida media corta, por lo que, normalmente, están en sangre en concentraciones muy bajas⁴.

Figura 1.5: Síntesis hepática de VLDL



Tomada de Hassing HC, Surendran RP. "Pathophysiology of hypertriglyceridemia". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011

INTRODUCCIÓN

1.1.3 Metabolismo de las LDL

La lipoproteína LDL es el principal transportador de colesterol. Su eliminación del plasma es dependiente del receptor de las LDL que reconoce Apo B-100. Las LDL (en su forma esterificada) contienen el 60-70% del colesterol total (CT) plasmático, por tanto, son las principales transportadoras de colesterol, cuya eliminación del plasma depende del receptor de las LDL que reconoce la única apolipoproteína que portan, la Apo B-100⁴.

Aproximadamente el 70% de los LDLr se encuentran en los hepatocitos y el 30% en las células periféricas¹⁹. La expresión de los LDLr es dependiente del contenido celular de colesterol y está controlada por SREBPS (Sterol Regulatory Element Binding Proteins). Las LDL son las lipoproteínas con mayor potencial aterogénico y, por ende, la principal diana de tratamiento⁴.

1.1.4 Metabolismo de las HDL

Las HDL son un complejo macromolecular compuesto, aproximadamente, por un 50% de lípidos y un 50% de proteínas. Contienen el 20-30% del CT y su función principal es el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su catabolismo. Sus principales Apos son Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo C y Apo E⁴.

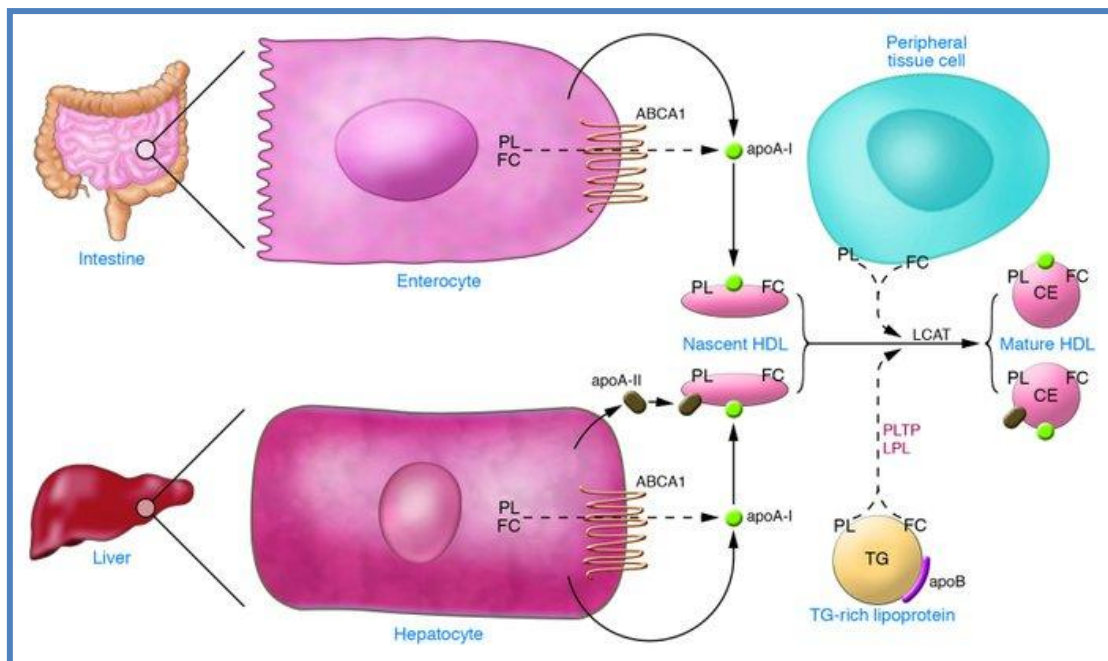
La biosíntesis de HDL es un proceso complejo que incluye la síntesis y secreción de las Apos componentes de la HDL, la adquisición de lípidos extracelulares (fosfolípidos y colesterol) y el ensamblaje de la HDL madura²⁰. La Apo A-I es la principal proteína de las HDL, constituyendo el 70% del contenido proteico de la partícula. La Apo A-II es la segunda proteína más importante, constituyendo el 20% de las proteínas de HDL. Las recién sintetizadas apolipoproteínas de HDL deben adquirir fosfolípidos (FL) y colesterol. En este paso, el transportador ABCA1 (ATP-Binding Cassete AI) tiene un papel importante en la lipidación de la Apo A-I facilitando el eflujo de colesterol hacia las lipoproteínas pobres en lípidos y que contienen Apo A-I. Dicho transportador se localiza en intestino e hígado y parece ser el responsable de la mayoría de la lipidación inicial de Apo A-I libre²¹.

En este paso de la formación de las HDL, dos moléculas de Apo A-I se unen alrededor de un núcleo hidrofóbico con estructura de bicapa fosfolipídica, adquiriendo la estructura discoidal o también llamada cinturón²². Las HDL nacientes van adquiriendo lípidos a través del flujo del colesterol y de la lipólisis de las lipoproteínas ricas en TG. Estas HDL nacientes se encuentran en muy baja concentración en el plasma, tan solo un 5%, ya que rápidamente se transforman a maduras²³.

INTRODUCCIÓN

La masa lipídica de las HDL proviene, principalmente, de tejidos periféricos, aunque los mecanismos mediante los cuales se produce la lipidación no se conocen en su totalidad. El proceso de maduración de la HDL se realiza por diferentes vías: una parte importante de las HDL nacientes maduran gracias a la lipólisis de partículas ricas en TG, principalmente VLDL y QM. La LpL actúa sobre estas partículas liberando lípidos superficiales, FL y CL. Los productos liberados se unen a las HDL nacientes. Las HDL nacientes también intercambian lípidos con las HDL maduras en un proceso de remodelado mediante la acción de la lipasa hepática (LH), la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de FL (PLTP). Los FL derivados de las VLDL y los QM se transfieren a las HDL a través de la PLTP, pero, para la maduración total de la partícula es necesario que el CL se esterifique y formen el núcleo hidrofóbico característico. El colesterol internalizado en la partícula de HDL es esterificado por la enzima LCAT (Lecitina Colesterol Acil Transferasa)²⁴, que cataliza la transferencia de grupos 2- acilo de la lecitina al CL²¹.

Figura1.6: Síntesis y maduración de las partículas de HDL



Fosfolípidos, FL; Colesterol no esterificado, CL; Colesterol esterificado, CE.

"Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies". J. Clin. Invest. 2006

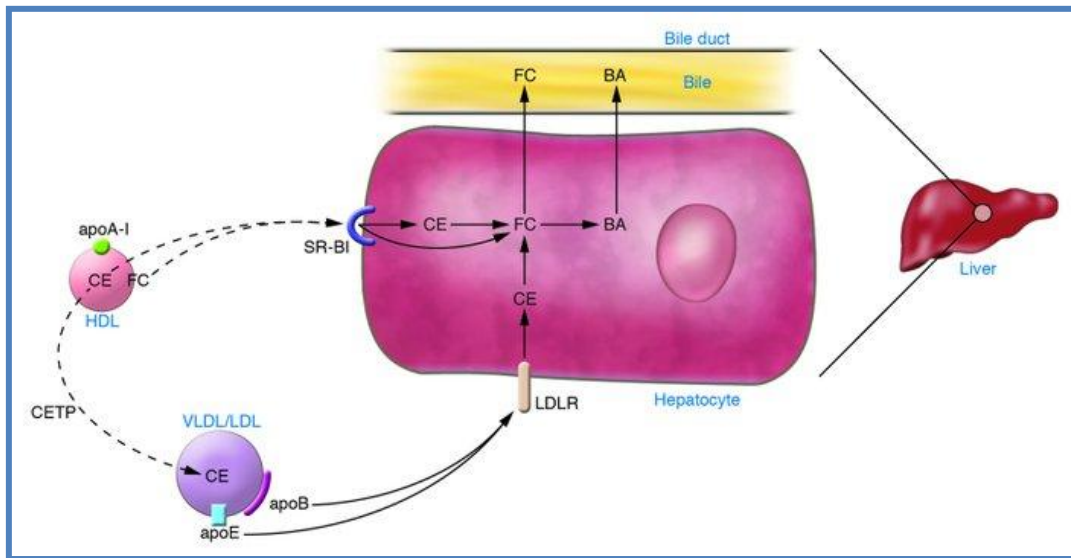
El riñón, el hígado y los tejidos esteroideogénicos son los principales sitios implicados en el catabolismo de las HDL. La eliminación de las HDL puede llevarse a cabo bien por captación selectiva de colesterol u otros lípidos de la partícula, o bien por endocitosis y degradación de toda la partícula.

INTRODUCCIÓN

El colesterol transportado por la HDL se retira principalmente en hígado por medio del receptor Scavenger SR-BI²⁵. Este receptor es capaz de captar selectivamente colesterol, tanto libre como esterificado, pero no apolipoproteínas²⁰. Estudios realizados con este receptor en hepatocitos polarizados, sugieren que SR-BI participa en la internalización de las partículas completas de HDL, la eliminación del colesterol y secreción de partículas HDL delipidadas²⁶.

Otro mecanismo clave en la eliminación del colesterol transportado por la HDL es el catalizado por la CETP^{27, 28}. Esta enzima cataliza el intercambio de TG desde las lipoproteínas de baja densidad, LDL, y VLDL por el CE de la HDL, resultando un empobrecimiento de CE y un enriquecimiento en TG de la partícula HDL.

Figura 1.7: Catabolismo de las HDL en el hepatocito



Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies". J. Clin. Invest. 2006.

1.2 Metabolismo de los triglicéridos

Los niveles de TG en plasma pueden tener un origen endógeno (derivados de dietas ricas en ácidos grasos) o endógenos (provenientes de la síntesis hepática). En el intestino los TG de la dieta son hidrolizados por la lipasa hepática en 2 monoglicerol (2-MN) y ácidos grasos libres (AGL) formando micelas²⁹. Los AGL entran en los enterocitos por medio del transportadores FABP (proteína unida a los ácidos grasos), como los CD36. En su interior los TG son re-sintetizados de nuevo por medio de la enzima DGAT, estos pueden ser hidrolizados de nuevo por la ACTGL y por lipasa sensible a hormonas⁴. Posteriormente la MTP media el ensamblaje de los TG a la Apo B-48 y Apo E en un primer paso de formación de los QM. Estos QM se secretan al sistema linfático, después de su secreción los QM adquieren la Apo C-II, Apo C-III, que modulan en plasma el metabolismo de lipoproteínas ricas en TG³⁰.

INTRODUCCIÓN

Los QM son secretados al sistema linfático, entran en la vena cava y circulan hasta que interactúan con la lipoprotein lipasa (LpL), la secreción de esta enzima depende de LMF1 y está asegurada al endotelio vascular por los proteoglicanos y por GPIHBP1⁴.

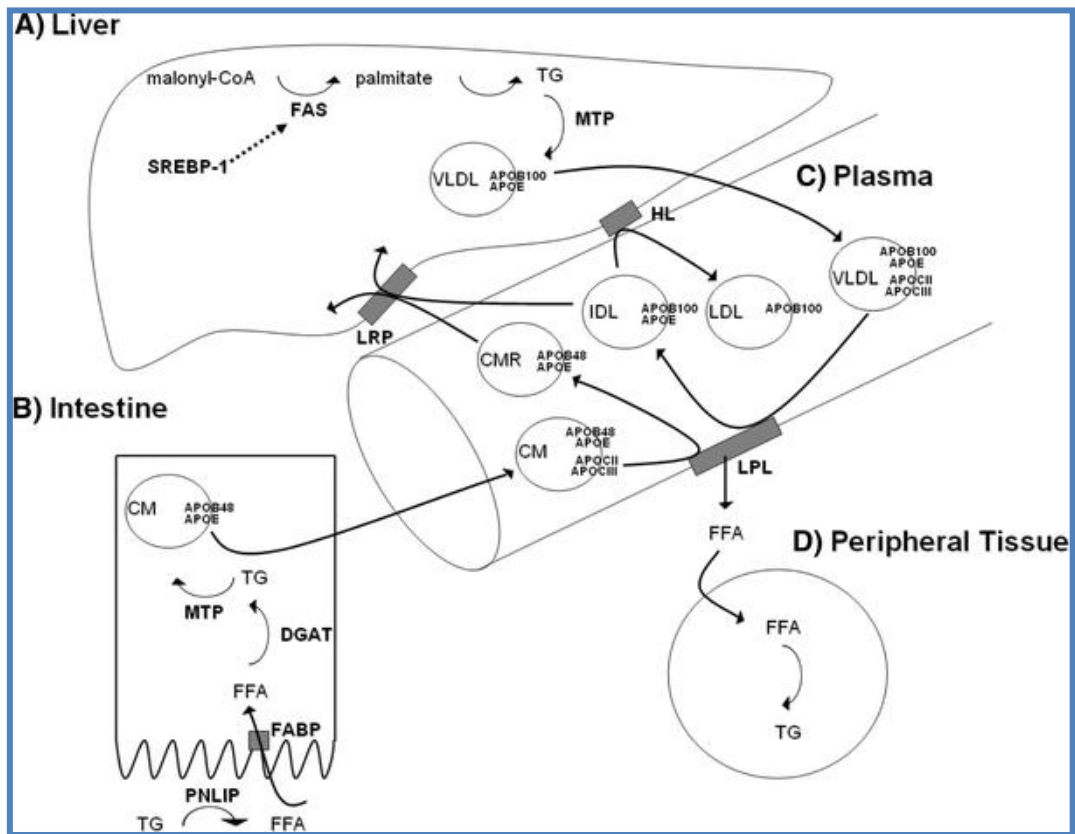
Los QM contienen Apo A-V, Apo C-II y Apo C-III. Apo C-II es un cofactor necesario para la LpL, mientras que Apo C-III puede interferir con LpL, inhibiéndola⁴. Ha sido demostrado que Apo A-V mejora la hidrólisis de lipoproteínas ricas en TG (TRL)³¹, aunque este mecanismo no está definido completamente.

En el hígado, los TG son sintetizados a partir de AGL extraídos del plasma o de AG sintetizados de nuevo. La enzima central para la síntesis *de novo* de AG es la FAS (Sintetasa de Ácidos Grasos) que cataliza la conversión del Malonyl-CoA a Palmitato. La enzima FAS es inducida por SREBP1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1), que se auto regula por los AG poliinsaturados, glucosa y la insulina. La MTP hepática media el ensamblaje de TG con los ésteres de colesterol, la Apo B-100 y la Apo E, para formar VLDL³².

En el tejido adiposo y los capilares musculares, los TG de los QM y las VLDL son hidrolizados en AGL por la lipasa unida al endotelio vascular. Los AGL son re-esterificados y almacenados en adipocitos o se lleva a cabo la β - oxidación de los mismos para obtener energía³².

Los QM se remodelan en partículas pequeñas, densas, de vida corta y ricas en colesterol esterificado, llamadas QMr, y las VLDL convirtiéndose, del mismo modo, en VLDLr (también llamados IDL). Los QMr y algunas IDL son aclarados mediante endocitosis a través de la unión de la Apo E a los receptores LDL y en su ausencia, por los receptores LRP1. IDL puede ser hidrolizado por la LH generando partículas pequeñas ricas en colesterol esterificado, denominadas partículas LDL ricas en CE³².

Figura 1.8: Metabolismo de los TG



2. Dislipemias

Las dislipemias son un conjunto de patologías caracterizadas por alteraciones en las concentraciones lipídicas plasmáticas. Es un término genérico para denominar cualquier situación clínica en la cual existan concentraciones anormales de colesterol total, colesterol HDL (c-HDL), colesterol LDL (c-LDL) o TG¹.

2.1 Hipertrigliceridemia

La hipertrigliceridemia (HTG) está definida como la concentración de TG en plasma en ayunas, sin tratamiento previo, por encima del percentil 90 ajustado por sexo y edad en la población (3.0 mmol/l en adultos de edad media)³². La HTG es una forma común de dislipemia que se encuentra frecuentemente asociada con una enfermedad coronaria prematura. La aparición del evento cardiovascular puede verse adelantada en caso de pacientes fumadores en 5 o 10 años. La hipertrigliceridemia está correlacionada negativamente con la concentración de c-HDL³³.

INTRODUCCIÓN

Existen varios trastornos genéticos comunes relacionados con las HTG que pueden generar un evento cardiovascular prematuro (ECP), que incluyen la hiperlipemia familiar combinada (HFC), la dislipemia residual en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y la hipoalfalipoproteinemia familiar, pudiendo ser los responsables del 50% de los ECP. En contrapartida, otra forma hereditaria de HTG, la hipertrigliceridemia familiar monogénica no está asociada con ECP³.

La obesidad, en particular la troncular, está asociada con un incremento de los niveles de TG, una disminución de los niveles de c-HDL y resistencia a la insulina, siendo éste el mayor factor que puede contribuir a la dislipemia asociada con la diabetes tipo 2³⁴.

La HTG secundaria puede deberse a otras anormalidades como la diabetes descontrolada, el consumo de alcohol, hipotiroidismo, enfermedad renal o una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana³⁴.

2.2 Fenotipos de las hipertrigliceridemias

Los pacientes con HTG presentan un cuadro que puede cursar con xantomas palmares, hepatoesplenomegalia, pancreatitis lipémica, así como la formación de placas de ateroma que suponen un aumento del riesgo de padecer un evento cardiovascular³⁴.

La HTG de tipo 1 o hiperquilomicronemia (OMIM 238600), tiene una frecuencia en la población menor a 1:10⁶ suele aparecer en la infancia o adolescencia y se caracteriza por niveles de TG de 1000-10000 mg/dl debidos a deficiencia en la actividad de la LpL o Apo C-II³³. Suele ir acompañada de alteraciones cutáneas y oculares, así como pancreatitis recurrente³². Actualmente, se conocen más de 80 variantes disfuncionales en el gen *LPL* que producen la reducción o eliminación de la actividad LpL, resultando en la acumulación de TRL³⁰. Mutaciones en homocigosis en *APOC2* pueden generar un fenotipo similar, ya que codifica para la Apo C-II, un cofactor clave para la LpL. Variaciones en homocigosis que se han demostrado disfuncionales para el gen *APOC2* son causantes de variaciones en la actividad de LpL en plasma³³.

La mayoría de las HTG primarias se diagnostican en adultos, con un rango de TG entre 200 y 2000 mg/dl, principalmente debido a la acumulación de partículas VLDL, que pueden acompañarse o no de QM. Normalmente los pacientes son asintomáticos pero dependiendo del grado de HTG, pueden presentar xantomas eruptivos, lipemia retinalis, hepatomegalia, síntomas focales neurológicos, dolor recurrente epigástrico y pancreatitis³⁵. Apo A-V es una apolipoproteína clave, cuya relación con la HTG fue confirmada con la evidencia de

INTRODUCCIÓN

triglicéridos altos en ratones *knockout* (KO)³². Recientemente, se han identificado mutaciones en los genes *LMF1* y *GPIBHP1* como causales de este tipo de HTG^{10, 11 12,36,42 y 59}.

Tradicionalmente se ha usado la clasificación Fredrickson (Tabla 1.1) para fenotipar las dislipemias. Actualmente, se ha observado que la frontera entre estos fenotipos no es tan clara, y, en la práctica clínica, las decisiones terapéuticas se basan en el nivel de TG y el contexto asociado a la anormalidad lipídica¹².

Tabla 1.1: Clasificación de Fredrickson de las dislipemias primarias.

	Prevalencia en la población	Perfil lipídico	Variación lipoproteína	Variaciones genéticas
HLP tipo 1	1:10 ⁶	↑↑↑ TG ↑ CT	Alto QM con Baja LDL y VLDL	Mutaciones en <i>LPL</i> y también en Apo C-II
HLP tipo 2A	1:50	↑↑ CT	Alto LDL	Mutaciones en Apo B y LDLr
HLP tipo 2B	5%	↑↑↑ TG ↑↑↑ CT	Alto VLDL Alto LDL	Mutaciones en Apo B, Apo C-III y USF1.
HLP tipo 3	1:10 ⁴	↑↑↑ CT ↑↑ TG	Alto CT Alto TG	Mutaciones en homocigosis en Apo E
HLP tipo 4	5-10%	↑↑ TG ↑ CT	Alto VLDL	No se conoce
HLP tipo 5	1:10 ⁸	↑ CT ↑↑↑ TG	Alto QM Alto VLDL	Mutaciones en heterocigosis en <i>LPL</i> en el 5-10% de los casos.

HLP: hiperlipoproteinemia. TC: Colesterol total. TG: triglicéridos. LDL: Lipoproteína de baja densidad. VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad. LPL: lipoproteína lipasa. ↑↑↑ Muy elevado (por encima del percentil 99 por edad y por sexo). ↑↑ Elevado (por encima del percentil 95 por edad y sexo). ↑ Moderadamente elevado (por encima del percentil 90).

2.3 HTG y el riesgo cardiovascular

Una moderada HTG es factor de riesgo independiente para enfermedades arterioescleróticas, particularmente para un evento cardíaco prematuro^{37, 38}. El estudio de cientos de sujetos durante más de 10 años, muestran que un incremento de 1 mmol/l en los niveles de TG plasmáticos incrementan el riesgo de un ECP del 32% al 76%, incluso después de ajustar el c-HDL³⁹. Más recientemente, se ha confirmado que concentraciones en plasma de TG en ayunas tienen una fuerte asociación con el riesgo de ECP^{40, 41}. Complejos mecanismos subyacen la asociación TG- arterioesclerosis, ya que existen anormalidades metabólicas, como la obesidad,

INTRODUCCIÓN

la Diabetes Mellitus tipo 2, niveles de c-HDL bajos, concentraciones elevadas de LDL, altos niveles de AGL, la hiperinsulinemia y el incremento de la viscosidad plasmática que pueden estar asociadas con niveles altos de TG. Sin embargo, se ha demostrado que las lipoproteínas ricas en TG (QM y VLDL) y sus remanentes pueden contribuir directamente a la formación de la placa de ateroma⁴².

3. Variantes genéticas asociadas a la hipertrigliceridemia

Junto con las influencias ambientales, variantes genéticas comunes y raras pueden determinar las concentraciones de TG en plasma. Identificar genes y variantes genéticas asociadas con la concentración de TG en plasma permite mejorar el entendimiento sobre las vías metabólicas de las lipoproteínas ricas en TG e identificar a los sujetos con alta susceptibilidad al desorden metabólico, lo que permite desarrollar intervenciones terapéuticas para mejorar los niveles de TG, su concentración, disminuyendo así el riesgo de ECP⁴³.

El entendimiento de la arquitectura genética, mediante el estudio de todas las variantes genéticas que puedan tener efecto sobre las concentraciones plasmáticas de TG, se ha visto incrementado substancialmente mediante el estudio de los GWAS (Genome Wide Association Study). Los GWAS muestran asociaciones entre variantes genéticas comunes con frecuencias superiores al 1% (polimorfismo de un solo nucleótido o SNPs), y otros rasgos cualitativos y discretos⁴⁴. Gracias a estos estudios se han identificado nuevas regiones genómicas que pueden relacionarse con los TG para estudios posteriores⁴⁵⁻⁴⁶. Sin embargo, para establecer totalmente la arquitectura genómica de las concentraciones de TG en plasma se requieren experimentos complementarios, incluyendo secuenciación, estudio con modelos animales, estudios de linaje y familiares, funciones celulares y experimentos bioquímicos⁴⁴.

3.1 Lipoprotein lipasa (LpL) y triglicéridos

La existencia de la enzima LpL fue descubierta por primera vez en 1943⁴⁷. La LpL es una glicoproteína de 55 KDa, localizada en la cara luminal de las células endoteliales. El gen LPL se encuentra en el cromosoma 8 y se extiende 30 kb, contiene 9 exones. La producción de LpL está altamente regulada en la transcripción, post-transcripción y mecanismos postraduccionales⁴⁷.

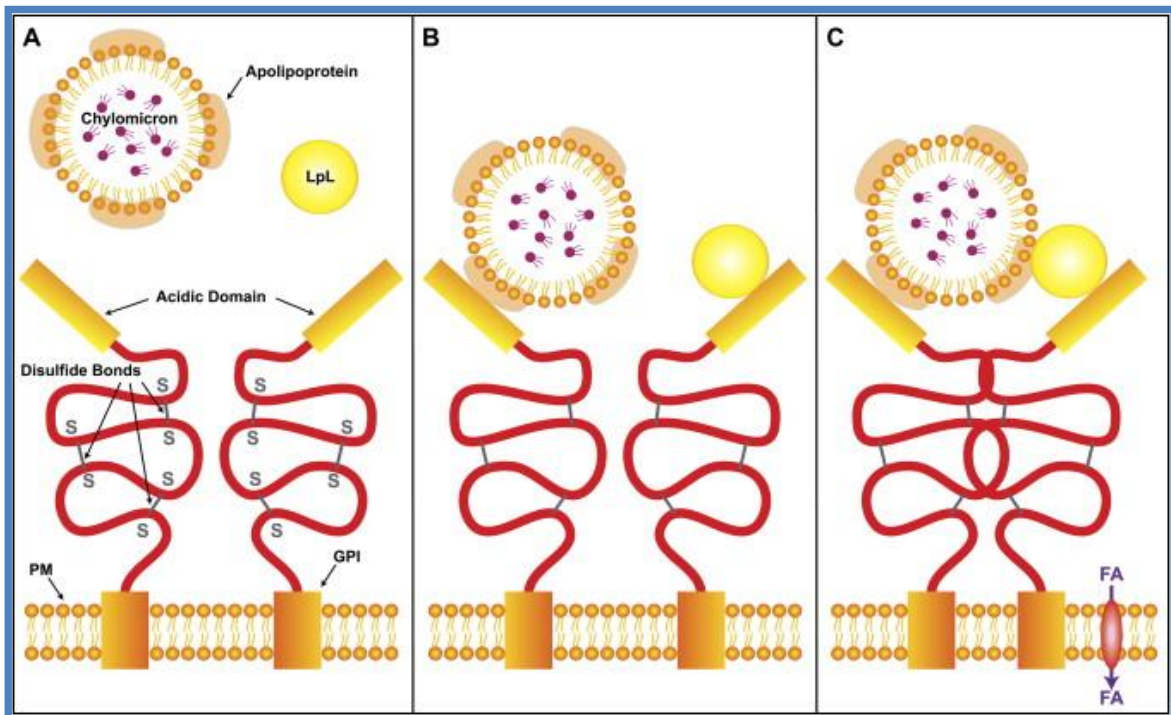
La LpL se sintetiza en gran cantidad en los tejidos que requieren AGL para su metabolismo energético, predominantemente en corazón, tejido adiposo y músculo esquelético. Posteriormente, es secretada al torrente sanguíneo donde se unirá a la GPIHBP1 en la superficie de las células endoteliales⁴⁸.

INTRODUCCIÓN

La síntesis, procesamiento (glicosilación) y secreción de LpL está regulada bajo control hormonal. Se ha demostrado en estudios con ratas que la adición de insulina, genera un aumento de la actividad de LpL. En humanos, el aumento de la ingesta de carbohidratos genera un incremento de LpL de 3 a 6 h después, aunque el papel de la insulina todavía no es claro ⁴⁹. También se ha demostrado que el sistema adrenérgico disminuye la actividad de LpL en tejido adiposo y aumenta la síntesis de LpL en el músculo ⁴³.

La LpL hidroliza los TG de QM y VLDL liberando AGL, que podrán ser usados para re-sintetizar de nuevo TG en tejido adiposo o ser β -oxidados en el músculo. La acción de LpL es dependiente de Apo C-II, un cofactor esencial para su activación. Sin embargo, la Apo C-III puede inhibir la lipólisis mediante inactivación de LpL.

Figura 1.9: Estructura de la lipoprotein lipasa



Modelo para la unión de los QM y LpL GPIHBP1 en la superficie de células endoteliales. GPIHBP1 está atado a la superficie de la célula endotelial por un anclaje GPI y contiene un dominio de ácido amino-terminal que se propone ser un lugar de unión específica para los QM y LpL. El dominio ácido de GPIHBP1 puede unirse a quilomicrones a través de la interacción con los dominios cargados positivamente de apolipoproteínas expuestas en la superficie de las lipoproteínas. El dominio ácido de GPIHBP1 también puede servir como el sitio de unión para LpL, que contiene dominios de unión a heparina cargados positivamente. La interacción entre los quilomicrones GPIHBP1-enlazados y LpL puede implicar la agrupación de las proteínas ancladas a GPI o homodimerización. La lipólisis de TG asociados a los quilomicrones libera ácidos grasos libres (FA), que son transportados en las células endoteliales ⁵⁰.

INTRODUCCIÓN

La expresión anormal de LpL está asociada con arterioesclerosis, obesidad, diabetes y quilomicronemia.⁴⁹ Estudios realizados con ratones KO para LPL, han demostrado un aumento de la concentración de TG con un incremento en las VLDL después del nacimiento y de los QM después de mamar. La acumulación de TRL es letal tras 18 horas desde el inicio de la alimentación. A la inversa, la sobreexpresión de LpL en ratones confiere un fenotipo protector, aumentando el aclaramiento de QM y VLDL y disminuyendo la concentración de TG cerca de un 75%⁵¹.

3.2 Apolipoproteína A-V y triglicéridos

El gen que codifica para la Apo A-V (*APOA5*) fue identificado bioinformáticamente dentro de la agrupación génica *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* en el cromosoma 11⁵². El gen *APOA5* de 1,9 Kb está formado por 4 exones que codifican 366 aminoácidos. Se expresa exclusivamente en el hígado, particularmente en zonas de regeneración hepática. El 80% de Apo A-V está asociado con QMs, VLDLs y HDLs, mientras que aproximadamente el 20% es retenido a nivel intrahepático asociado con gotas lipídicas¹⁶. La Apo A-V en plasma afecta, probablemente, a la distribución de moléculas de Apo C-III en VLDL, aunque el papel intracelular de Apo A-V no está claro. Presumiblemente, Apo A-V afecta directamente al ensamblaje intracelular de VLDL o a su secreción a nivel hepático⁵³.

El papel de Apo A-V todavía debe ser dilucidado. Ensayos celulares sugieren que el complejo QM/Apo A-V, pero sin partículas de Apo E y Apo C-III está ávidamente unido al dominio ácido de GPIHPB1, aunque Apo A-V puede no competir con el LpL unido. Por otro lado, los QM unidos requieren tanto de Ly6, como del dominio ácido. Así los quilomicrones se unen a GPIHPB1 en presencia tan solo de LpL, y Apo A-V no parece desempeñar un papel esencial en este proceso.

Se ha observado en ratones que la sobreexpresión de *APOA5* disminuye marcadamente la concentración de TG plasmáticos, mientras que en ratones KO para *APOA5* se observa una severa HTG (los TG se ven multiplicados por cuatro, respecto a concentraciones basales)^{34, 54}. La expresión de *APOA5* está regulada por factores transcripcionales, que están involucrados en las lipoproteínas plasmáticas y en la homeostasis de la glucosa, sugiriendo que responde a múltiples señales ambientales⁵⁴. ApoA-V es claramente crucial en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG tanto en ratones como en humanos, aunque su regulación y funciones moleculares son todavía desconocidas. Algunas variantes comunes de *APOA5* se han asociado con los niveles de TG en plasma en numerosas etnias⁵⁵.

INTRODUCCIÓN

Los análisis funcionales realizados en las mutaciones en *APOA5* que se asocian con HTG, han revelado generalmente una pérdida de la actividad de LpL, particularmente cuando existe mutaciones en extremo C-terminal, que interfiere con la capacidad de Apo A-V para interactuar con lípidos y lipoproteínas⁵⁶.

3.3 Factor de Maduración de la Lipasa 1 y triglicéridos

Las proteínas LpL, LH y lipasa endotelial son enzimas lipolíticas involucradas en el metabolismo lipídico. En 1983 fue descrita por primera vez una mutación en ratón denominada deficiencia combinada de lipasa (*cl**d*) que cursaba con deficiencia tanto de LpL como de LH⁵⁸. Los ratones homocigotos para la mutación *cl**d* desarrollan QM postparto y mueren por isquemia y cianosis debida a un aumento de la viscosidad sanguínea^{57, 9}. El fenotipo *cl**d* fue mapeado en el cromosoma 17 usando análisis de ligamiento, y posteriormente se identificó el gen *Tmen112*, renombrándolo como *Lmf1* (factor 1 de maduración de la lipasa)⁹. Estudios posteriores han demostrado que Lmf1 está localizado en tejidos que expresan LpL o HL. La proteína Lmf1 se localiza en la membrana del RE estimulando la maduración tanto de LpL como de HL^{9, 57}.

La mutación *cl**d* produce un truncamiento prematuro de Lmf1 que afecta a un dominio conservado de función incierta, que impide la maduración de las lipasas, independientemente de la localización subcelular y sin requerir ninguna intervención directa⁵⁸. Se ha demostrado, en estudios, *in vitro* que mutaciones en *Lmf1* comprometen la actividad de Lmf1⁵⁹.

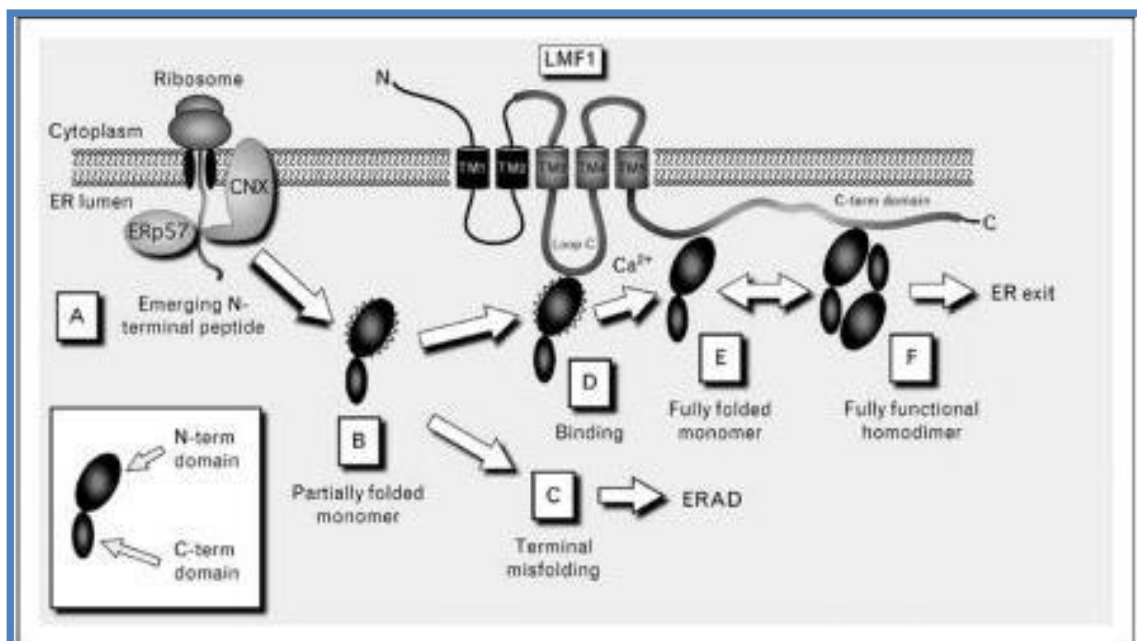
En humanos se ha identificado el gen *LMF1*, homólogo al de los ratones, localizado en el cromosoma 16, como un candidato para el metabolismo de TG. En un estudio realizado con 11 pacientes con hiperquilomicronemia y un defecto en la actividad de LpL se identificó la mutación Y439X que genera un codón Stop en el exón 9 de *LMF1* de un paciente que presentaba episodios de pancreatitis recurrente y una concentración de TG de 30 mmol/l. La mutación W464X fue encontrada en pacientes con una actividad disminuida en LpL y HL en un 76% y un 27% respectivamente⁹. Así, *LMF1* parece ser un gen clave que regula el metabolismo de TG⁶⁰.

Lmf1 es una proteína transmembrana localizada en el RE. La proteína está formada por 5 segmentos transmembrana, que separan la proteína en 6 dominios, la mitad de los cuales dan al lumen del retículo endoplasmático y la otra mitad al citoplasma⁶¹. Los defectos en Lmf1 producen una deficiencia combinada de LpL y HL. Ambas, junto con la lipasa endotelial, son lipasas homodiméricas, pero no afecta a la lipasa pancreática, monomérica. Por tanto, la proteína Lmf1 interviene en la dimerización y maduración de estas lipasas, para convertirlas en

INTRODUCCIÓN

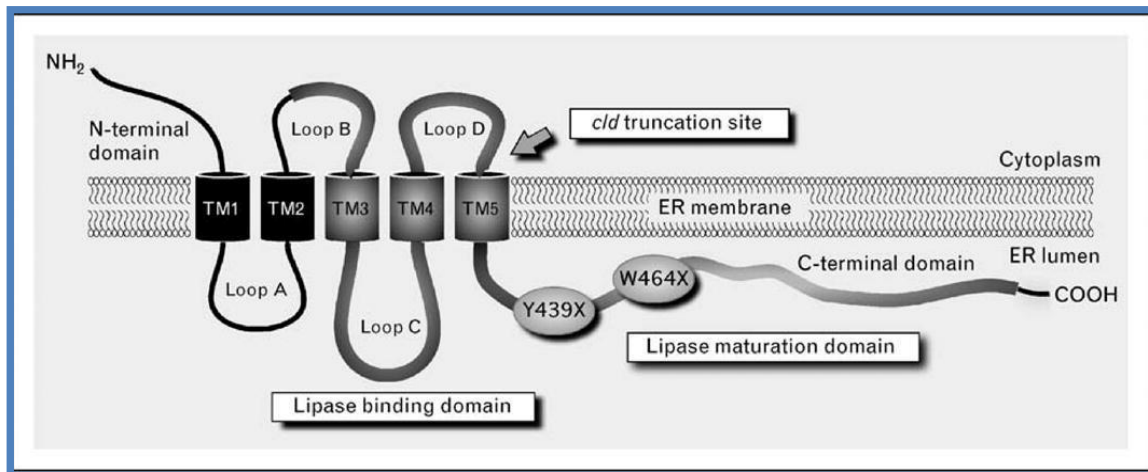
enzimas activas (Figura 1.9) ⁶². Las mutaciones identificadas truncan el dominio C- terminal, que indica el papel esencial de esta región en la maduración de las lipasas (Figura 1.10). Mientras que la mutación Y439X causa una pérdida completa de la funcionalidad, la mutación W464X es menos severa, generando tan sólo una pérdida de la funcionalidad del 60% ⁶³.

Figura 1.10: Papel del factor de maduración de la lipasa 1 en el ensamblaje y maduración de la lipoprotein lipasa.



Las chaperonas y factores de plegamiento ayudan al péptido nascente, tan pronto como los péptidos penetran en la luz del RE, el translocón Sec61 ayuda a su plegamiento. Esto proporciona vigilancia en la maduración de las proteínas, asegurando que todas las cadenas nascentes permanecen en el retículo endoplasmático hasta su completo plegamiento. Por otra parte, las proteínas mal plegadas son dirigidas a por diferentes vías de degradación del RE (denominado ERAD), lo que proporciona garantías contra las proteínas mal formadas. Además, la maduración de la lipasa requiere de la chaperona Calnexina (CNX), que es un factor general que es requerida en la maduración eficiente de la lipasa. LMF1 probablemente promueve las etapas posteriores de plegamiento y ensamblaje en las lipasas, mientras CNX juega un importante papel en la estabilización de la salida de la porción N-terminal en las lipasas durante su plegamiento ⁶⁴.

Figura 1.11: Estructura del factor de maduración de la lipasa.



LMF1 puede unirse a las proteínas y estabilizar sus formas, en contraste, las lipasas malformadas no pueden asociarse con LMF1 y terminarán en ERAD. De hecho, en *cld*, los homodímeros de LPL disminuyen severamente, mientras que las lipasas malformadas se acumulan, así la disfuncionalidad de LMF1 genera un plegamiento insuficiente⁶⁴.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la actualidad las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países desarrollados y se considera que lo seguirá siendo en el futuro. La hipertrigliceridemia (HTG) es una dislipemia asociada frecuentemente a enfermedad cardiovascular prematura. La mayoría de las HTG son debidas a una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales, como la obesidad y la resistencia a la insulina, entre otros⁶⁵. La hiperquilomicronemia grave que se presenta en la infancia y cursa con pancreatitis recurrente y niveles de TG entre 1.000-10.000 mg/dl ha sido ampliamente estudiada asociándose a la herencia recesiva de mutaciones en los genes *LPL* y *APOC2*³⁵. Sin embargo, la HTG que se asocia con eventos cardiovasculares, se presenta en adultos y los niveles de TG plasmáticos se encuentran entre 500-2.000 mg/dl, sus causas moleculares no están del todo elucidadas y se ha planteado como posible causa la herencia dominante de mutaciones o la interacción de diferentes variantes comunes^{32,41}. Varios son los genes que se han relacionado con este tipo de HTG, como por ejemplo: *LPL*, *APOA5* y *LMF1*.

Considerando estos datos establecimos las siguientes hipótesis:

- La población adulta afecta de HTG primaria grave presenta una mayor cantidad de variantes genéticas patogénicas comunes y no comunes en genes asociados con hiperquilomicronemia que la población general.
- La HTG primaria grave con valores >500 mg/dl es causada por mutaciones funcionalmente graves en heterocigosidad, y/o acumulación de variantes patogénicas comunes asociados con TG elevados.

Teniendo en cuenta estos hechos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar las variantes génicas, comunes y no comunes en los genes candidatos: *LPL*, *LMF1* y *APOA5* en sujetos con HTG grave de causa primaria.
2. Conocer si existe asociación entre las variantes alélicas de los genes *LPL*, *LMF1* y *APOA5* y la HTG mediante comparación de las frecuencias alélicas de la población hipertrigliceridemia frente a los 1000 genomas.
3. Analizar bioinformáticamente el efecto de las variantes encontradas en los genes candidatos.
4. Analizar *in vitro* la funcionalidad de las mutaciones no estudiadas previamente.
5. Establecer la segregación familiar de las variantes genómicas encontradas *de novo* en nuestra población de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Descripción de la muestra:

Se seleccionó un grupo de 112 sujetos (87 varones y 25 mujeres) procedentes de la Unidad de Lípidos del Hospital Universitario Miguel Servet, con edades comprendidas entre los 21 y los 73 años, afectados de hipertrigliceridemia (HTG) grave definida con niveles de triglicéridos (TG) > 500 mg/dl en dos determinaciones diferentes tras una dieta hipolipemiente y sin tratamiento farmacológico previo.

Se descartaron los pacientes con hipertrigliceridemias secundarias:

- Diabetes descompensada (hemoglobina glicosidada superior al 7,5%)
- Índice de Masa Corporal (IMC) superior a 30 kg/m²
- Consumo de alcohol superior a 30gr/día
- Insuficiencia renal crónica (filtrado glomerular por debajo de 30 ml/min o creatinina sérica por encima de 2 mg/dL)
- Tratamiento con fármacos que aumenten los triglicéridos: estrógenos, antirretrovirales, corticoides, andrógenos y ácido retinoico
- Hemocromatosis
- Hipotiroidismo

2. Obtención de la muestra:

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, tras ayuno previo de 10-12 horas. Se extrajeron 10 ml de sangre en tubos con 1 mg/ml de EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulante. A continuación la muestra sanguínea se centrifugó a 1800 xg a temperatura ambiente durante 15 minutos en una centrífuga Kubota 5220. Posteriormente el plasma se distribuyó en alícuotas de 500 µl y se conservó a -80 °C. El precipitado con las células sanguíneas se reconstituyó con un volumen de suero fisiológico igual al que se ha retirado de plasma y se guardó a -80 °C para análisis posteriores.

3. Obtención del DNA genómico

El DNA genómico se aisló a partir de 10 ml de sangre periférica recogida sobre tubos con EDTA, mediante el producto comercial Flexigene® DNA (Qiagen). Para la obtención de DNA, se descongeló rápidamente la sangre en un baño húmedo a 37 °C con leve agitación y se almacenó en hielo hasta comenzar el procedimiento. En un tubo tipo falcon de 50 ml se

MATERIAL Y MÉTODOS

añadieron 25 ml del buffer FG1 (Qiagen) y 10 ml de sangre que se mezclaron invirtiendo el tubo 5 veces. Se centrifugó 5 minutos a 2.000 xg. Se decantó el sobrenadante y se dejó el tubo abierto y boca abajo durante 2 min. Posteriormente se adicionaron 5 ml de buffer FG2 /QIAGEN proteasa y se homogeneizó el pellet por completo mediante agitación con vórtex. A continuación, se incubó el tubo durante 10 min a 65 °C. Para la precipitación, se añadieron 5 ml de isopropanol (100%) y se mezcló por inversión hasta que el DNA se hizo visible en forma de hilos o un grupo. A continuación, se centrifugó durante 3 min a 2.000 xg, se descartó el sobrenadante y se invirtió el tubo sobre un papel absorbente limpio, teniendo cuidado de que el sedimento permanece en el tubo. El lavado del pellet se realizó añadiendo 5 ml de etanol al 70%, se agitó con vortex 5 seg y se centrifugó durante 3 min a 2.000 xg. El sobrenadante se decantó y se dejó el tubo invertido sobre un papel absorbente durante al menos 5 min teniendo cuidado de que el gránulo permanezca en el tubo. A continuación se deja secando al aire el sedimento de DNA hasta que todo el líquido se haya evaporado. Finalmente se eluyó el DNA en 300 µl de buffer FG3 (Qiagen) agitando con vortex suavemente durante 5 segundos y se disolvió el DNA mediante una incubación de 1 hora a 65 °C en un baño húmedo. Las alícuotas de DNA se almacenaron a -80 °C en ultrancongeladores (Sanyo).

4. Análisis de concentración y pureza

Los ácidos nucleicos, debido a su estructura molecular, absorben la radiación en el rango del ultravioleta, a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Las proteínas, sin embargo, absorben la radiación a una λ de 280 nm. Tras la obtención del DNA se llevó a cabo el análisis de la concentración y pureza mediante espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). La medida de la pureza se determinó mediante el cociente entre la absorbancia (A) medida a 260 nm y la obtenida a 280 nm. Se consideró que los valores óptimos de pureza eran los comprendidos entre 1.8-2.0 para la relación A_{260}/A_{280} .

Posteriormente, se llevó a cabo una dilución de trabajo del DNA a 100 ng/µl con TE 0.1X. La preparación de TE se llevó a cabo a partir de 1.211 g de Trizma®Base (Casa comercial) y 0,336 g de EDTA- Na_2 (Casa comercial) en 900 ml de agua, ajustándose el pH a 8, mediante la adición de ácido clorhídrico, se conservó a 4 °C y posteriormente se realizó una dilución 1:10 que se conservó -20 °C.

5. Amplificación por PCR de los genes de estudio

Las secuencias genómicas de los genes de interés se obtuvieron de la base de datos del Ensembl (www.ensembl.org).

5.1 Gen *LPL*

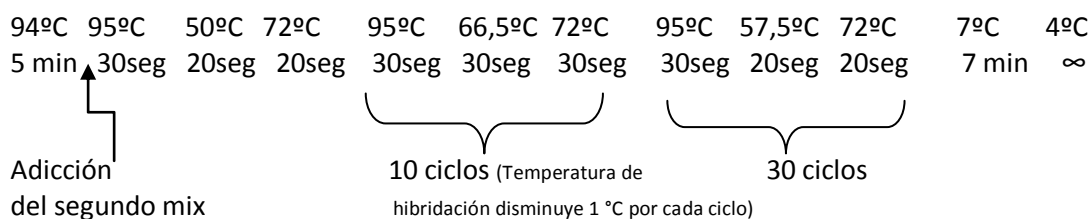
Se amplificó el promotor, los 9 exones y los nexos exón-intrón del gen de *LPL*, tomando como referencia la secuencia ENSG00000175445 mediante los cebadores diseñados por Ikeda et al⁶⁶ modificados al añadir una secuencia homóloga a M13 en la zona 5'UTR que permitió la secuenciación de todos los fragmentos con un único par de cebadores. Para la amplificación de todos los fragmentos de PCR se usaron las mismas condiciones.

La reacción en cadena de la polimerasa requiere la preparación de dos mezclas, la primera con agua destilada, tampón 10X (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 50% glicerol), MgCl₂ (Bioline) y el DNA. En la segunda mezcla, se añaden los dNTPs (Lifetechnologies), la enzima Taq DNA polimerasa (Biotaq, Bioline) y la pareja de cebadores correspondiente. Se adicionó la segunda mezcla tras una primera desnaturalización, buscando de este modo disminuir las hibridaciones inespecíficas. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl con las cantidades y concentraciones que se muestran en la tabla 3.1

Tabla 3.1: Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR *LPL*

REACTIVO	CANTIDAD(µL)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O	14	
Tampón (10x)	2	1x
dNTPs (2mM)	1,6	160µM
MgCl ₂ (50mM)	0,48	1,2mM
Primer F (10µM)	0,4	200µM
Primer R (10µM)	0,4	200µM
Biotaq DNA polimerasa (5u/µl)	0,16	0,04U/µl
DNA genómico (100µg/µl)	1	5ng/µl

Los programas térmicos fueron los mismos para todas las amplificaciones del gen *LPL*:



MATERIAL Y MÉTODOS

En la tabla 3.2 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados, el tamaño de los productos amplificados (en pb) y la temperatura de unión de cada par de cebadores (T_m).

Tabla 3.2: Cebadores para la amplificación del gen *LPL*.

CEBADOR			PRODUCTO	
Exón	Nombre	Secuencia	Pb	Tamaño
1^u	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTAGCGAACAGGAGCCTAACAAAGCAA-3'	43	340
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCTTTGGCGCTGAGCAAGTCGC-3'	38	
1^D	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTCACTTCTAGCTGCCCTGCCA-3'	35	330
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCAGGGGAGTTTGC GCGCAAAA-3'	35	
2	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTAACCTCCAGTTAACCTCATATCCAA-3'	44	227
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCCACCACCCCAATCCACTCTTCCAC-3'	40	
3	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTTAGGTGGGGTATTTAAGAAAGCTGTG-3'	42	296
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCCACTGTTTTGGACACATAAGTCTCC-3'	43	
4	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTGCAGAACTGTAAGCACCTTCATTTTC-3'	43	180
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCTTCACCTCTTATGATAAGACCAACGAA-3'	45	
5	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTAAATTTACAATCTGTGTTCCCTGCTTTTT-3	46	350
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCGATAAGAGTCACATTTAATTGCTTCTA-3	46	
6	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTTTCTGCCGAGATAACAATCTTGGTGTC-3'	44	359
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCGACTCCTTGGTTTCCTTATTTACAACA-3'	45	
7	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTATAAAGATTGATCAACATGTTCTGAATTTTC-3	46	237
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCGGGACTGGTGCCATGATGACCGCCC-3'	42	
8	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTGATCTCTATAACTAACCAATTTATTGCT-3	45	299
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCTGGGGGTCTAAAGTGAAGGAAGAAAA-3'	43	
9	Directo	5'-TGTA AACGACGGCCAGTTTGTCTACATGGCATCTTCACATCCA-3'	44	310
	Reverso	5'-CAGGAAACAGCTATGACCAGCTCAGGATGCCAGTCAGCTTTA-3'	42	

1^u: amplificación que incluye la zona del promotor lejano. 1^D: amplificación que incluye la zona del promotor y el exón 1. Pb: pares de bases

El resultado de las amplificaciones se comprobó mediante electroforesis de 96V durante 20 min en un gel de agarosa convencional al 2% en TAE 1X y teñido con SYBR® Safe (Lifetechnologies).

MATERIAL Y MÉTODOS

5.2 Gen *LMF1*

Se amplificaron el promotor, los 11 exones y las uniones exón-intrón del gen *LMF1* utilizando como secuencia de referencia ENSG00000103227. Los exones 7 y 8 se amplificaron en un único fragmento. Para la amplificación se usaron diferentes programas de amplificación para cada exón.

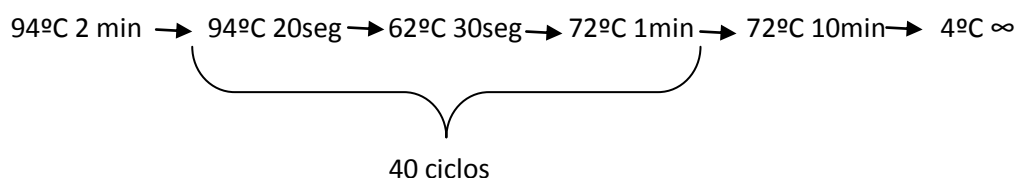
Para cada reacción de amplificación se mezcló la enzima Biotaq DNA polimerasa (Bioline), el tampón 10x (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 50% glicerol), el $MgCl_2$, los dNTPs (Life Technologies), los cebadores correspondientes, el DNA de interés y el agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados en la reacción de PCR *LMF1*

REACTIVO	CANTIDAD (μ L)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O	13,5	
Tampón (10x)	2	1x
dNTPs (2mM)	2	200 μ M
MgCl ₂ (50mM)	0,6	1,5mM
Cebador directo (10 μ M)	0,4	200 μ M
Cebador reverso (10 μ M)	0,4	200 μ M
Biotaq DNA polimerasa (5U/ μ l)	0,12	0,03 U/ μ l
DNA genómico (100 μ g/ μ l)	1	5ng/ μ l

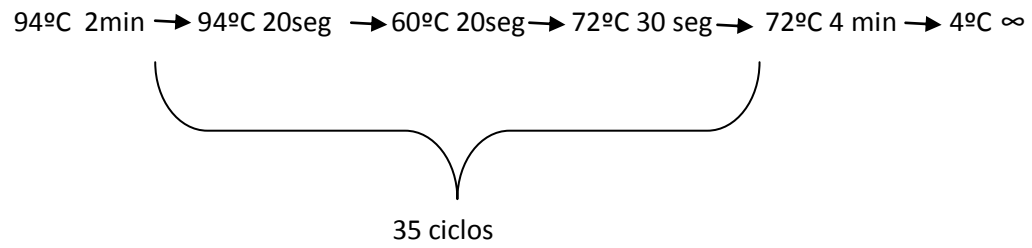
Los programas térmicos difirieron según atendiendo a las necesidades de cada amplificación en cuanto a tamaño y temperatura de hibridación de los cebadores (Tabla 3.4):

Exón 1

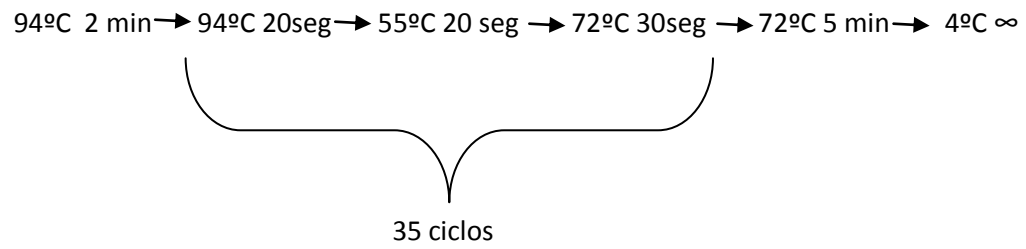


MATERIAL Y MÉTODOS

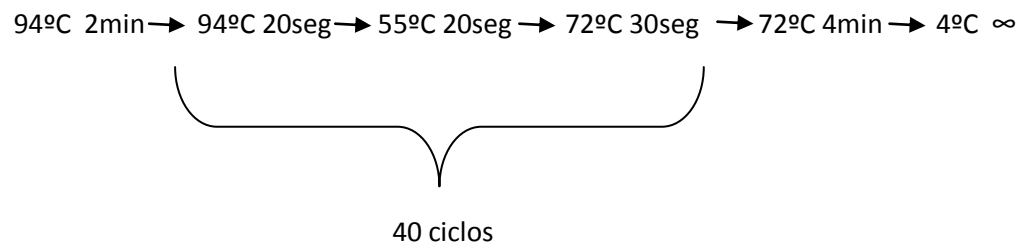
Exones 2 y 4



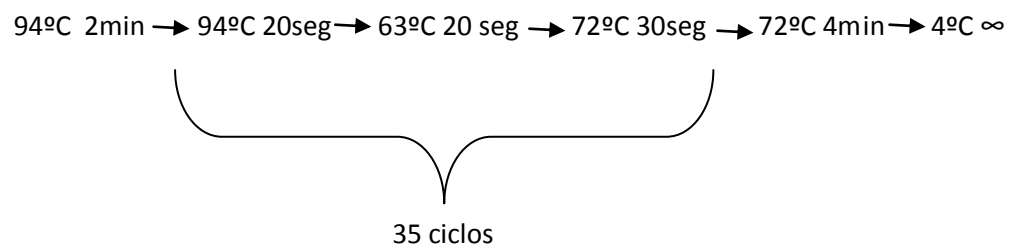
Exón 3



Exón 5



Exón 10



Exones 6, 7-8,9 y 11

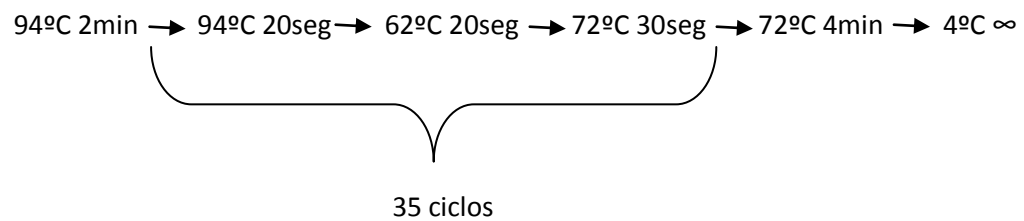


Tabla 3.4: Cebadores para la amplificación del gen *LMF1*.

CEBADOR			PRODUCTO	
Exón	Nombre	Secuencia	Pb	Tamaño
1	Directo	5'-GTGCCTCCGGGACTGTGA-3'	18	422
	Reverso	5'- CGGAGGAGTCTCGAGGGA-3'	18	
2	Directo	5'- ATTCTGAGCTGCGCCCAT-3'	18	466
	Reverso	5'- CAGTGCCTGTGCTGAGTGAC -3'	20	
3	Directo	5'- CAAGCCAAAGTGTTAATACTCGTTTC-3'	26	170
	Reverso	5'- GAAGGCTGATGGCAGAGGCTAAGGAA-3'	26	
4	Directo	5'- GGCTGGTGTCTCTCAGTAGCA-3'	21	345
	Reverso	5'- AAGCCCTCACAGGTTAGAAGAG- 3'	21	
5	Directo	5'- CTTCGTGGATGGTTCGTCTT-3'	20	269
	Reverso	5'- TGATGCGACAGCTACCA-3'	18	
6	Directo	5'- GGGGATCCTGTGTGCAGTAG-3'	20	354
	Reverso	5'- GGGCAGCCAGAAATAGGG-3'	18	
7	Directo	5'- GCTCCAGGAAGAGAGGCG-3'	18	308
	Reverso	5'- CCGACTTTCTCCTGCCCT-3'	18	
8	Directo	5'- AGCAGCAGCTGGGGTCTC-3'	18	320
	Reverso	5'- GCACTGTAACCCACCTGAA-3'	20	
9	Directo	5'- ATGGACAGTCGGGGAACC-3'	18	330
	Reverso	5'- AAGAGGGTGGGGGTACAG-3'	17	
10	Directo	5'- ATGGACAGTCGGGGAACC-3'	18	259
	Reverso	5'- AAGAGGGTGGGGGTAC-3'	17	
11	Directo	5'- CAGCAGCAGGCTGAGGAG-3'	18	363
	Reverso	5'- CTCTCCTCTCCACGTCTCTT-3'	22	

El resultado de las diferentes amplificaciones se comprobó mediante electroforesis de 96V durante 20 minutos en un gel de agarosa 2% en TAE 1X teñido con SYBR® Safe (Life Technologies).

MATERIAL Y MÉTODOS

5.3 Gen *APOA5*

Utilizando como referencia la secuencia ENSG00000110243 del gen *APOA5* se amplificaron el promotor, los 4 exones y las uniones exón-intrón en 4 fragmentos individuales. Debido a su gran tamaño, el exón 4 se dividió en dos fragmentos de amplificación: 4.1 y 4.2. Los exones 2 y 3 se amplificaron en único fragmento.

En cada reacción de amplificación se mezcló la enzima Biotaq DNA polimerasa (Bioline), el tampón 10x (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 50% glicerol), el $MgCl_2$, los dNTPs (Life Technologies), los cebadores correspondientes, el DNA de interés y el agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 3.5

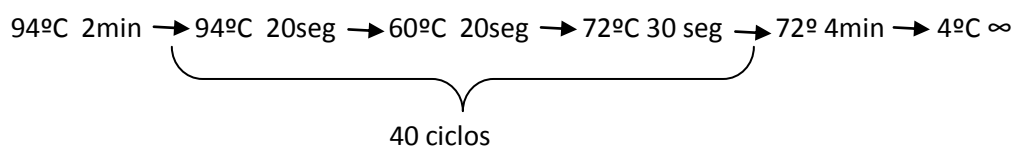
Tabla 3.5: Cantidades y concentraciones de los reactivos usados en la reacción de PCR *APOA5*.

REACTIVO	CANTIDAD(μ L)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O	13,5	
Tampón (10X)	2	1X
dNTPs(2mM)	2	200 μ M
MgCl ₂ (50mM)	0,6	1,5mM
Cebador directo (10 μ M)	0,4	200 μ M
Cebador reverso (10 μ M)	0,4	200 μ M
Biotaq DNA polimerasa (5U/ μ l)	0,12	0,03U/ μ l
DNA genómico	1	5ng/ μ l

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® 9700 (AppliedBiosystem).

Los programas térmicos son diferentes para cada uno de los exones de acuerdo a las características de los cebadores y el producto de PCR (Tabla 3.6).


Exón 1



MATERIAL Y MÉTODOS

Exón 2-3


94°C 2min → 94°C 20seg → 65°C 20seg → 72°C 30 seg → 72°C 4min → 4°C ∞



40 ciclos

Exon 4.1


94°C 2 min → 94°C 20seg → 65°C 30seg → 72°C 1min → 72°C 4min → 4°C ∞



35 ciclos

Exon 4.2

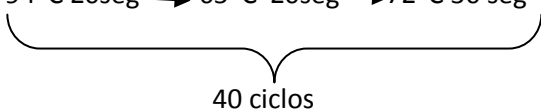
94°C 2min → 94°C 20seg → 60°C 20seg → 72°C 30seg → 72°C 10min → 4°C ∞



35 ciclos

PCR unión:

94°C 2min → 94°C 20seg → 65°C 20seg → 72°C 30 seg → 72°C 4min → 4°C ∞



40 ciclos

Tabla 3.6: Cebadores para la amplificación del gen *APOA5*.

CEBADOR			PRODUCTO	
Exón	Nombre	Secuencia	Pb	Tamaño (nt)
1	Directo	5'- GTGAGTGCTGGGAGGCAGCTGAGGTCAACTT-3'	31	184
	Reverso	5'- CCACCTGCAAT//GCCCTCCCTTAGGACTGTG-3'		
2-3	Directo	5'- GCATTGCAGGTGG//CGCCATGTCCCTTC-3'	31	408
	Reverso	5'- ATGGCCCAGCTGTGTCTCCCTTCGCCTACA-3'		
4.1	Directo	5'- CAGAGGATCAGTGC GCGATGACTTG-3'	25	834
	Reverso	5'- ATGGCGCGAGTGAAGGCAGCTATC-3'	25	
4.2	Directo	5'- GAGGTGCGCCAGCGACTT-3'	18	1042
	Reverso	5'- GGCGTGCTCTTGCTACCTC-3'	19	

Para disminuir el número de reacciones de secuenciación se llevó a cabo una PCR de unión del exón 1 y los exones 2-3. Para ello, el diseño del cebador reverso de la amplificación del exón 1 incluyó una cola complementaria al cebador directo de la amplificación 2-3 que permitiría su

MATERIAL Y MÉTODOS

unión mediante PCR utilizando los cebadores directo del exón 1 y el reverso del exón 2-3. La reacción de PCR se llevó a cabo con las mismas cantidades y concentraciones descritas en la tabla 3.5, utilizando como DNA molde 0,5 µl del producto de PCR del exón 1 y 0,5 µl del producto de la PCR de los exones 2-3.

El resultado de las diferentes amplificaciones se comprobó mediante electroforesis de 96V durante 20 minutos en un gel de agarosa 2% en TAE 1x teñido con SYBR® Safe (Lifetechnologies).

6. Purificación del producto de PCR mediante ExoSAP-IT® (USB)

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el producto comercial ExoSAP-IT® (USB) que consta de las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón (SAP), elimina los cebadores y nucleótidos sin hibridar sin pérdida de muestra. La enzima exonucleasa I degrada los cebadores residuales y cualquier DNA de cadena única, mientras que la SAP hidroliza los dNTPs remanentes de la mezcla de la PCR.

Se preparó una dilución 1:10 de ExoSAP-IT® (USB) en dH₂O de la que se añadieron 2 µl a 5 µl del producto de PCR. En un termociclador Gene Amp® 9700 (Applied Biosystem) se realizó una incubación a 37 °C durante 45 min, seguida de 15 min a 80 °C con objeto de inactivar la enzima.

Las muestras purificadas se conservaron a -20 °C para su posterior utilización.

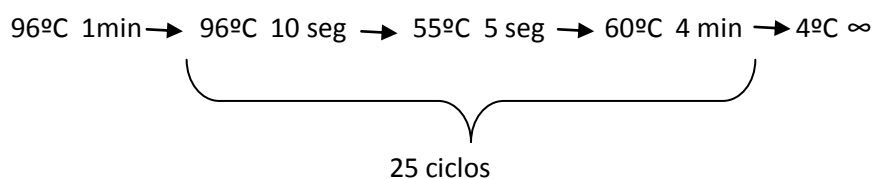
7. Reacción de secuenciación

Para la identificación de variantes comunes y raras en los genes de interés, se realizó la secuenciación, por electroforesis capilar, de los fragmentos amplificados utilizando el producto comercial BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems), que contiene un vial de BigDye v3.1 ReactionMix que contiene una DNA polimerasa termoestable y dNTPs marcados con fluorocromos y un vial con el tampón de secuenciación BigDye v3.1 5X que aporta las condiciones idóneas para la acción enzimática. Por cada muestra, en primer lugar se realizó una dilución de 0,5 µl de BigDye v3.1 Reaction mix en 1,75 µl de tampón de secuenciación BigDye v3.1 5X y 4,75 µl de agua estéril destilada. Posteriormente, se añadieron 7 µl de esta mezcla a 1,5 µl del producto purificado y 1,5 µl del cebador de secuenciación a 2,1 µM. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y protegiendo el reactivo BigDye y sus diluciones de la luz. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10 µl según indica la tabla 3.7.

Tabla 3.7: Cantidades de los reactivos empleadas en la reacción de secuenciación.

REACTIVO	CANTIDADES (μl)
Producto de PCR purificado	1,5
Mix BigDye	7
Primer de secuenciación (2,1 μM)	1,5

Siendo el programa térmico utilizado el siguiente:



El resultado de las reacciones de secuenciación se purificó por precipitación alcohólica con el fin de eliminar los terminadores sobrantes. Para ello se añadió 4 μl de EDTA 62,5mM a los 10μl de la reacción de secuenciación. A continuación se preparó una mezcla de 2,6 μl de NaAc 3M pH 5,2, 7,8 μl de agua destilada y 67,71 μl de etanol al 96% (v/v) de la que se añadieron 60 μl a la muestra, se agitó por inversión y se centrifugó durante 1 min a 2.090 xg en una centrífuga 3-16K (Sigma). Seguidamente, la muestra se incubó protegida de la luz durante 15 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 30 min a 2.090 xg. Para eliminar el sobrenadante se realizó una centrifugación con las muestras invertidas durante 1 min a 180 xg. A continuación, se añadieron 70 μl de etanol al 70% y se centrifugaron las muestras durante 15 min a 4 °C a 2.090 xg. De nuevo se eliminó el sobrenadante centrifugando las muestras invertidas durante 1 min a 180 xg. Tras este paso, el pellet obtenido se guardó a -20 °C para su posterior utilización.

Previamente a realizar la electroforesis capilar, se resuspendió el pellet en 20 μl de formamida (LifeTechnologies) y para la desnaturalización de las muestras se realizó una incubación en un termociclador Gen Amp® 9700 (AppliedBiosystems) de 2 min a 94 °C. La electroforesis capilar se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI 3500XL (AppliedBiosystems). El alineamiento y la lectura de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante el programa informático VariantReporter™ (AppliedBiosystems).

8. Análisis bioinformático

Para evaluar la patogenicidad de las variantes génicas identificadas, se usaron los siguientes programas informáticos y bases de datos, cuando el cambio era no –sinónimo: PolyPhen-2⁶⁶, SIFT⁶⁷ y MutationT@ster⁶⁸.

Polyphen-2 clasificó las variantes en benignas, posiblemente dañinas y probablemente dañinas, de acuerdo a la conservación de la secuencia y la estructura de la proteína. SIFT clasificó las variantes en función de la homología de secuencia, como tolerante o intolerante. Mutation Taster se utilizó también para variantes que incluían codones de parada y alteraciones intrónica o complejas, clasificándolas como posiblemente causal de la enfermedad o posiblemente polimorfismos.

El efecto de las variantes en sitios potenciales de ajuste se estudió mediante NetGene2⁶⁹ y NNSplice⁷⁰, analizando la estructura de los sitios donador y aceptor.

9. Extracción del RNA

Para el estudio de las mutaciones identificadas por primera vez en este trabajo y cuyo efecto puede alterar el patrón de ajuste se recogió una muestra de sangre, de los pacientes portadores de dichas variantes, en un tubo PAXgene (PreAnalytiX) que contiene un estabilizador que evita la degradación del RNA. La muestra sanguínea se obtuvo por medio de una punción venosa tras un ayuno de 10-12 horas y tras la extracción de 2ml de sangre en un tubo con EDTA para evitar la contaminación. Los tubos PAXgene con la muestra sanguínea se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

Para la extracción de RNA, en campana de flujo vertical y con material específico para RNA, se llevó a cabo el siguiente protocolo utilizando TRI Reagent (Sigma):

Se centrifugó el tubo PAXgene durante 10 min a 4.000 xg a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf 5415. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de agua DEPC (agua ultrapura) para resuspender el pellet que se transfirió a un tubo de 2 ml. La muestra fue centrifugada durante 10 min a 4000xg en una centrífuga Eppendorf 5415. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml del TRI Regent™ (Sigma) para producir la lisis celular. Se resuspendió el pellet y se incubó la muestra durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 200 µl de cloroformo (Carlo Erba Reagenti) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. La muestra fue incubada durante 7 min a temperatura ambiente hasta observarse claramente 2 fases. Posteriormente, se centrifugó el tubo a 12.000

MATERIAL Y MÉTODOS

12.000 xg durante 15 min a 6 °C. Tras la centrifugación se observaron tres fases: una fase orgánica (en la que se encontraban las proteínas), una interfase (donde se localizaba el DNA) y una fase acuosa superior (donde se encontraba el RNA). Se recogió esta fase acuosa y se traspasó a un nuevo tubo donde se añadieron 500 µl de isopropanol (AnalarNormapur[®]). La mezcla se incubó durante 7 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugó durante 10 min a 12.000 xg a 6 °C, resultando en la precipitación del RNA precipitó y formándose un pellet visible.

Para lavar el RNA obtenido se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol 75%, se agitó con vortex hasta la disolución del pellet de RNA y se centrifugó a 7500 xg durante 5 min a 6 °C. Para eliminar los alcoholes, se llevó a cabo el secado del RNA dejando el tubo abierto en posición horizontal.

Finalmente se eluyó el RNA en 50 µl de agua libre de RNAsas previamente calentada a 55 °C y se llevó a cabo la cuantificación con NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) tal y como se describe en el apartado 4.

Tras la cuantificación del RNA, se llevó a cabo una electroforesis, en un gel de agarosa 1% durante 45 minutos a 90V, de la muestra para estudiar su viabilidad.

10. Obtención del cDNA

Para la obtención del DNA complementario (cDNA) al RNA obtenido en el apartado 8 se utilizó la enzima Retrotranscriptasa inversa en una reacción RT-PCR. Para ello se preparó una mezcla de 0.8 µl de RandomPrimers (300 ng/µl) (Lifetechnologies), 1 µl de dNTPs, 1210 ng de RNA y 1,2 µl de agua destilada estéril que se incubó durante 5 min a 65 °C en un termociclador Gen Amp[®] 9700 (AppliedBiosystems) y un minuto en hielo. Posteriormente, se adicionaron 4 µl de Tampón 5X (Lifetechnologies), 1 µl de DTT 1M (Ditiotreitol), 1 µl del inhibidor de RNAsas RNase OUT[™] (Lifetechnologies) y un 200 U de enzima SuperScript[™] III RT (Lifetechnologies). A continuación se realizó una incubación en un termociclador GenAmp 9700[®] (Applied Biosystems) durante 5 minutos a 25 °C, 60 min a 50 °C y 15 min a 20 °C.

Tabla 3.8: Cantidades y concentraciones para la reacción de cDNA

REACTIVOS	CANTIDADES (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O	1,2	
Randomprimers (300 ng/μl)	0,8	240 ng
dNTP's (10 mM)	1	500 μM
RNA (120 ngr/μl)	10	1,2 μg/μl
Tampón 5x	4 μl	1 X
DTT 0.1 M	1 μl	5 μM
RNAse OUT (40 unidades/μl)	1 μl	2 U/μl
SuperScrit III RT (200 unidades/μl)	1 μl	10 U/μl

11. Diseño de cebadores para la amplificación del cDNA

Para el análisis del efecto de la mutación c.1018+2G>A, que se localiza en el intrón 6, se obtuvo la secuencia genómica de LPL (ENSG 00000175445) de la base de datos Ensembl (www.ensembl.org).

Se amplificó una región del cDNA de *LPL* desde la posición c.1149 a la c.2283, que contiene parte del exón 5, los exones 6, 7, 8 y 9, y parte de la región 3'UTR. Mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI) se diseñaron los cebadores para el amplificar el fragmento de interés, de manera que se obtuvo un producto de amplificación de 1150 pb.

En la tabla 3.9 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados, el tamaño del producto amplificado y la temperatura de unión de los cebadores (T_m).

Tabla 3.9: Secuencia y características de los cebadores empleados para la amplificación del fragmento que contiene la mutación c.1018+2G>A.

PRIMERS	SECUENCIA	T. PRIMER	T _m	%GC	T. PRODUCTO
DIRECTO, F	5' GTT GGG CAT GTT GAC ATT-3'	18nt	63,6 °C	44.4	1150pb
REVERSO, R	5' - GGC CTC AGT CCG AAA G-3'	16 nt	63,5 °C	62.5	

12. Amplificación del cDNA

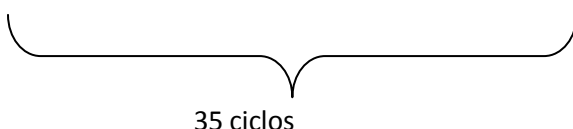
La reacción de amplificación del cDNA obtenido se preparó en un volumen de 20 μ l con las condiciones de la tabla 3. 10

Tabla 3.10: Cantidades y concentraciones de los reactivos de la PCR para la amplificación de cDNA

REACTIVO	CANTIDAD (μ l)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O estéril	13,5	
Tampón 10 X	2	1 X
dNTP's (2 mM)	2	200 μ M
MgCl ₂ (50 mM)	0,6	1,5mM
Cebador directo (10 μ M)	0,4	200 μ M
Cebador reverso (10 μ M)	0,4	200 μ M
BioTaq DNA polimerasa (5 U/ μ l)	0,12	0,03 U/ μ l
cDNA (1,2 ng/ μ l)	1	0,06 ng/ μ l

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp[®] 9700 (AppliedBiosystems) con el programa de temperaturas:

94°C 2 min → 94°C 20 seg → 54°C 30 seg → 72°C 1 min 30 seg → 72°C 4 min → 4°C infinito



35 ciclos

El producto de amplificación se comprobó mediante una electroforesis de un gel de agarosa 2% con SyBsafe (Life Technologies) durante 40 min a 96 V, utilizando como referencia el marcador DNA ladder 100 bp (Life Technologies).

13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS 15.0 (SPSS Inc) tomando como nivel significativo estadístico valores de p menor a 0,05.

Para conocer si una variable sigue la distribución normal se realizó un análisis de Kolmogorov-Smirnov. Los rasgos cuantitativos que siguieron una distribución normal se expresaron como media \pm desviación estándar y se analizaron con la prueba T-Student, mientras que aquellos

MATERIAL Y MÉTODOS

que no siguieron esta distribución se expresaron como mediana y rango intercuartílico y se analizaron con el test Mann-Whitney U. Las variables cualitativas, incluyendo la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas, se expresaron en porcentaje y se analizaron mediante Chi-cuadrado.

RESULTADOS

1. Características de la población de estudio

El estudio de las variantes genéticas fue llevada a cabo por el grupo de investigación Dislipemias Primarias del Hospital universitario Miguel Servet dirigido por el Dr. Fernando Civeira según el protocolo descrito en el apartado 1 del capítulo *Material y Métodos*.

El grupo de individuos seleccionados estuvo finalmente compuesto por 112 sujetos: 87 varones y 25 mujeres. En la tabla 4.1 se muestran las características clínicas y bioquímicas de los sujetos. Todos los sujetos presentaron una hipertrigliceridemia grave con una mediana de 670 mg/dl consecuencia de los criterios de inclusión. El 22.3% de los sujetos fueron mujeres y, en comparación con los varones, eran mayores, con niveles más elevados de CT, c-HDL, Apo A-I y Apo B ($p < 0.05$) y menor concentración de TG ($p < 0.05$).

2. Identificación de las variantes en el gen LPL

Para la identificación de las variantes comunes y la detección de mutaciones nuevas y previamente descritas en el gen *LPL* asociadas con HTG, se realizó la secuenciación automática del promotor, los exones y los nexos de unión-intrón del gen *LPL*, tal y como se describe en el apartado 7 del capítulo *Material y Métodos*. En la población afecta de HTG estudiada se identificaron las variantes raras que se muestran en la tabla 4.2, considerando como tales, aquellas que no han sido registradas en el proyecto de los 1000 Genomas.

2.1 Variantes no comunes en el gen LPL

Dos sujetos presentaron sendas variantes raras en el promotor (c.-16A>G y c.-241G>C) que habían sido identificadas como causales de HTG en trabajos anteriores de De Castro-Orós et al. y Yang et al.^{62,71}. Cuatro sujetos presentaron mutaciones previamente descritas como causales de la enfermedad: p.Gln16Xfs39 (exón 1), p.Gln133X (exón 3) y p.Gly215Glu. Además, se identificaron dos variantes en la región intrónica que pueden afectar al ajuste, la variante c.250-8A>G, descrita aquí por primera vez y c.1018+2G>A, identificada recientemente por De Castro-Orós et al.⁷¹.

RESULTADOS

Tabla 4.1: Características de la población de estudio.

	VARONES	MUJERES	TOTAL	P
N	87 (77,7%)	25 (22,3%)	112	
Edad, años	45,91 ± 10,58	54,28 ± 12,12	47,83 ± 11,436	0,001
IMC, Kg/m²	27,15 ± 2,845	26,88 ± 2,67	27,09 ± 2,8	0,678
Cintura, cm	96 (92-102)	89 (87-95)	93,73 ± 12,6	0,049
CT, mg/dl	289 ± 73,6	333 ± 86,4	299 ± 78,4	0,015
TG, mg/dl	717 (554-1026)	576 (535-727)	670 (549-998)	0,023
c-HDL, mg/dl	34 ± 8,6	40 ± 13,0	36 ± 10,0	0,010
Lp(a), mg/dl	7,1 (3,4-21,9)	7,7 (3,6-42,8)	7,1 (3,6-22,9)	0,959
Apo A1, mg/dl	131 ± 25,3	144 ± 27,2	134 ± 23,1	0,046
Apo B, mg/dl	128 ± 30,8	155 ± 33,2	134 ± 33,0	0,001
Glucosa, mg/dl	96 (83-107)	94 (84-112)	95 (84-110)	0,802
HbA1c (%)	5,4 (5,1-5,8)	5,5 (5,3-6,3)	5,4 (5,1-5,9)	0,288
Diabetes (%)	14,1	8	12,7	0,642
HTA (%)	24,7 %	36 %	27,3 %	0,390
ECV (%)	9,4	8	9,1	0,857
Tabaco (%)				0,114
No fumador	22,1	58,3	30	
Fumador	46,5	29,2	42,7	
Exfumador	31,4	12,5	27,3	

Los datos de variables cuantitativas se expresan como media ± Desviación estándar, excepto para las variables que no siguen la distribución normal (mediana, rango intercuartiles). Las variables cualitativas se expresan como %. IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total, TG: triglicéridos, cHDL: colesterol HDL, Lp(a): Lipoproteína (a), ApoA1: Apolipoproteína A 1. Apo B: Apolipoproteína B, ECV: enfermedad cardiovascular, HTA: hipertensión arterial. El valor p fue calculado por las pruebas t-Student o Mann-Whitney U según fuera conveniente

RESULTADOS

Tabla 4.2: Frecuencia de las variantes raras en el gen *LPL* encontradas en los sujetos del estudio.

Variante	Localización	N	Frecuencia (%)	Descrita por
c.-16A>G	Promotor	1	0.89	De Castro-Orós et al. ⁷¹
c.-241G>C	Promotor	1	0.89	Yang et al. ⁶²
p.Gln16GlufsX39	Exón 1	2	1.78	Wang et al. ⁷³
c.250-8A>G	Intrón 2	1	0.89	Nueva
p.Gln133X	Exón 3	1	0,89	Yang et al. ⁶²
p.Gly215Glu	Exón 6	1	0.89	Emi et al. ⁷⁴
c.1018+2G>A	Intrón 6	2	1.78	De Castro-Orós et al. ⁷¹

N: número individuos.

2.2 Estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes comunes del gen *LPL*.

Se registraron todas las variantes comunes que presentaron los 112 sujetos con HTG en el gen *LPL*, calculándose las frecuencias alélicas y genotípicas, que se muestran en la Tabla 4.3.

El análisis de las frecuencias genotípicas mostró que todos los polimorfismos a excepción del p.Glu145Glu se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, siendo su frecuencia la esperada en la población general.

Se realizó la comparación de las frecuencias alélicas de estas variantes comunes o polimorfismos en nuestra población de estudio frente a la población Europea del estudio de los 1000 Genomas (www.1000Genomes.org). Los SNPs c.-281T>G, p.Asp36Asn, p.Val135Val, c.430-6C>T, p.Pro234Leu y p.Thr379Ile mostraron una frecuencia significativamente mayor en los sujetos con HTG ($p < 0.05$), mientras que el SNP p.Ser474X mostró una frecuencia 3 veces menor.

RESULTADOS

Tabla 4.3: Frecuencias genotípicas de las variantes comunes del gen *LPL* encontradas en los sujetos con HTG del estudio.

Variante		GENOTIPOS	N	FRECUENCIA
c.-281T>G	rs1800590	GG	101	0.902
		GT	11	0.098
		TT	0	0
p.Asp36Asn	rs1801177	GG	103	0.919
		GA	9	0.08
		AA	0	0
p.Val135Val	rs1121923	GG	109	0.973
		GA	3	0.026
		AA	0	0
p.Glu145Glu	rs248	GG	102	0.91
		GA	8	0.071
		AA	2	0.018
c.430-6C>T	rs11570897	CC	101	0.902
		CT	11	0.098
		TT	0	0
p.Pro234Leu	rs118204060	CC	110	0.982
		CT	2	0.018
		TT	0	0
p.Asn318Ser	rs268	CC	110	0.982
		CT	2	0.018
		TT	0	0
p.Thr379Ile	rs76708715	GG	111	0.991
		GA	1	0.009
		AA	0	0
p.Thr388Thr	Rs316	CC	93	0.83
		CA	18	0.16
		AA	1	0.009
p.Ser474X	Rs328	CC	103	0.919
		CG	9	0.08
		GG	0	0

Tabla 4.4. Frecuencias alélicas de los SNPs identificados en el gen LPL en la población con HTG y los 1000 Genomas de la población europea.

Variante		Alelo	Frecuencia alélica	Frecuencia alélica	P
		menor	HTG	1000 Genomas	
c. 281T>G	rs1800590	G	0,049	0,013	0,001
p.Asp36Asn	rs1801177	A	0,040	0,013	0,002
p.Val135Val	rs1121923	A	0,125	0,041	0,047
p.Glu145Glu	rs248	A	0,054	0,063	0,579
c.430-6C>T	rs11570897	T	0,049	0,002	<0,001
p.Pro234Leu	rs118204060	T	0,009	0,000	<0,001
p.Asn318Ser	rs268	T	0,090	0,016	0,444
p.Thr379Ile	rs76708715	A	0,040	0,000	0,002
p.Thr388Thr	rs316	A	0,089	0,120	0,201
p.Ser474X	rs328	G	0,040	0,123	<0,001

2.3 Análisis bioinformático de las variantes en el gen LPL

Todas las variantes que supusieron un cambio no sinónimo fueron analizadas con los programas informáticos PolyPhen-2⁶⁶, SIFT⁶⁷ y MutationTaster⁶⁸, las mutaciones que se encontraban en promotores o dieron lugar a un codón de parada sólo pudieron ser analizadas por MutationTaster. El resultado de este análisis bioinformático de las variantes del gen LPL se muestra en la tabla 4.5.

El análisis mediante PolyPhen-2 mostró que las variantes raras p.Pro234Leu y p.Gly215Glu eran probablemente dañinas y por tanto causales para la enfermedad, tal y como también se obtuvo mediante MutationTaster. De igual manera, para estas dos variantes se obtuvo una puntuación de 0 con el análisis de SIFT, lo que implica que son perjudiciales para la proteína. El resto de variantes no pudieron ser analizadas por PolyPhen-2 y SIFT o resultaron benignas. El análisis mediante MutationTaster, mostró que además de las mutaciones nombradas con anterioridad, los cambios c.1018+2G>A, p.Gln16GlufsX11, p.Asp36Asn, p.Gln133X, c.430-6C>T y p.Asn318Ser eran posibles causas para la HTG.

RESULTADOS

Tabla 4.5. Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen *LPL*.

<u>Análisis <i>in silico</i></u>			
Variante	PolyPhen-2	SIFT	MutationTaster
c.-16A>G	NA	NA	0.999 Polimorfismo
c.-241G>C	NA	NA	1 Causal de enfermedad
c.-281T>G	NA	NA	0 Polimorfismo
c.1018+2G>A	NA	NA	1 Causal de enfermedad
p.Gln16GlufsX39	NA	NA	0,986 Causal de enfermedad
p.Asp36Asn	Benigna	0,14	0,416 Causal de enfermedad
c.250-8A>G			0,999 Polimorfismo
p.Gln133X	NA	NA	1 Causal de enfermedad
p.Val135Val	NA	NA	0 Polimorfismo
p.Glu145Glu	NA	NA	0 Polimorfismo
p.Pro234Leu	Probablemente dañina	0	0,999 Causal de enfermedad
p.Gly215Glu	Probablemente dañina	0	0,999 Causal de enfermedad
c.430-6C>T	NA	NA	0,999 Causal de enfermedad
p.Asn318Ser	Benigna	0,22	0,989 Causal de enfermedad
p.Thr379Ile	Benigna	0,25	0,998 Polimorfismo
p.Thr388Thr	NA	NA	0 Polimorfismo
p.Ser474X	NA	NA	0 Polimorfismo

NA: no analizado.

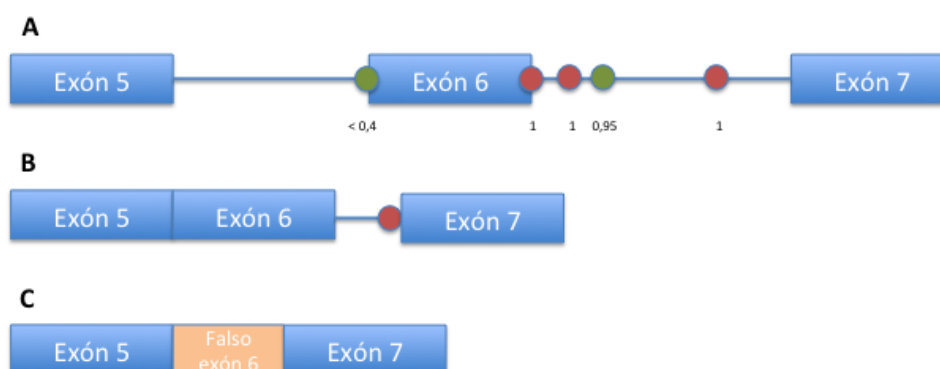
En el caso de las variantes c.250-8A>G y c.1018+2G>A se analizó específicamente el efecto sobre el ajuste de *LPL* tal y como se describe en el apartado 8 de *Material y Métodos*. El análisis del cambio c.250-8G>A no predijo ninguna alteración en el ajuste. Sin embargo, el

RESULTADOS

análisis de la mutación c.1018+2G>A mostró la eliminación del sitio donador natural en el intrón 6 (Fig 4.1). Se observa que, en la región del intrón 6 existen tres potenciales sitios donadores, con unas puntuaciones de 1, 0,66 y 0,71, respectivamente (siendo 1 el valor de mayor probabilidad de ajuste). Además, este análisis no mostraba el sitio natural aceptor de ajuste del intrón 5, lo que implica que es un aceptor débil, pero sí que se observó un posible aceptor de ajuste en el intrón 6, en una posición más 5' que el donador potencial con puntuación 1. Se observaron 3 posibles resultados:

- Ajuste usando el aceptor natural del intrón 5 y el donador con puntuación 1 del intrón 6, o, con menor probabilidad, los otros dos donadores, el cDNA observado sería de mayor longitud que el esperado (Fig 4.1A y B).
- El ajuste usando los sitios aceptor y donador con puntuación 0.95 y 1 del intrón 6 (Fig 4.1C) daría lugar a la eliminación completa del exón 6, generándose a la vez un falso exón 6 con una región del intrón 6 de 259 bp.

Figura 4.1: Esquema del ajuste de *LPL*



2.4 Análisis funcional de la mutación c.1018+2G>A del gen *LPL*

La mutación c.1018+2G>A ha sido descrita simultáneamente a este trabajo por nuestro grupo⁷¹. Para el análisis funcional se realizó la extracción de RNA y su posterior transformación a cDNA para, posteriormente, llevar a cabo una PCR de elongación, que nos permitió dar una explicación plausible del efecto de dicha mutación.

2.4.1 Extracción del RNA

A partir de 2 tubos de sangre PAXgene (PreAnalytiX) correspondientes al paciente y a un control sano se extrajo el RNA mediante el método del TRI Reagent™ (Sigma), tal y como se detalla en el apartado 9 del capítulo *Material y Métodos*. Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación con NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), como se detallan en apartado 4 del capítulo *Material y Métodos*. Sus concentraciones se detallan a continuación, en la tabla 4.4.

RESULTADOS

Tabla 4.6: Características del RNA obtenido

RNA	CONCENTRACIÓN (ngr/ μ l)	A _{260/280}	A _{260/230}
Control	180.6 ng/ μ l	1.80	0.92
Paciente problema	242 ng/ μ l	1.80	0.92

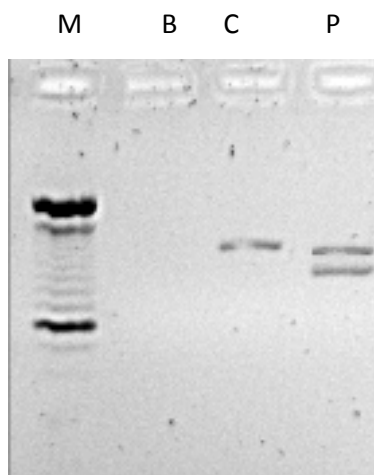
Posteriormente para estudiar la viabilidad de la muestra obtenida se llevó a cabo una electroforesis del RNA extraído, descartando así que este se pueda haber degradado.

2.4.2 Obtención del cDNA

Tras la extracción del RNA, este se convierte en cDNA mediante una PCR Retrotranscriptasa Inversa tal y como se describe en el apartado 10 del capítulo *Material y Métodos*, se llevó a cabo una PCR de prueba para poder comprobar que la retrotranscripción se ha llevado a cabo con éxito.

Para confirmar la predicción resultado del análisis bioinformático se amplificó, mediante PCR, una región de 1150 bp del cDNA comprendiendo los exónes 5-9 y parte de la zona 3'UTR del gen *LPL*, tal y como se describe en los apartados 11 y 12 del capítulo *Material y Métodos*. Los resultados de dicha PCR se muestran en la figura 4.2.

Figura 4.2: Visualización del gel del producto de PCR del fragmento exón 5-3'UTR del cDNA del gen *LPL*.



M: Marcador DNA Lapper 100 bp. B: Blanco. C: muestra control sano. P: Paciente problema, portador de la mutación c.1018+2A>G.

En la figura 4.2 se observa una banda a la altura de 1.150 bp tanto en el carril correspondiente al control como en el paciente correspondiente al cDNA imagen del chequeo de la PCR se puede observar la doble banda del paciente, que contiene la mutación en heterocigosidad, a

RESULTADOS

diferencia de la única banda que aparece en el sujeto control. Esta doble banda podría ser la respuesta a la patología del paciente.

2.5 Estudio de la segregación familiar de las mutaciones en *LPL*

En el caso de dos sujetos portadores de las mutaciones c.1018+2G>A y p.Gln133X, respectivamente, se recogieron muestras de familiares directos, para llevar a cabo un estudio de la segregación familiar de las variantes. Se obtuvo una muestra sanguínea de los familiares y se llevó a cabo el protocolo tal y como se describe en el apartado 5.1 de *Material y Métodos* pero exclusivamente para los fragmentos específicos. En la figura 4.3 se muestra la segregación familiar de la mutación c.1018+2G>A y la figura 4.4 muestra la segregación familiar de la mutación p.Gln133X.

Figura 4.3: Segregación familiar de la mutación c.1018+2G>A

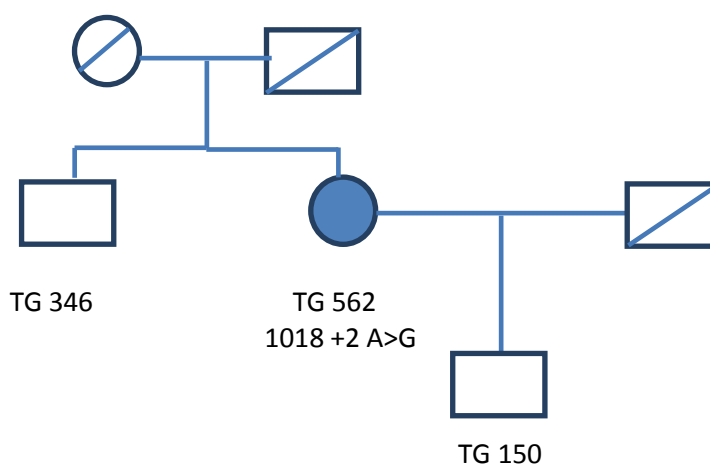
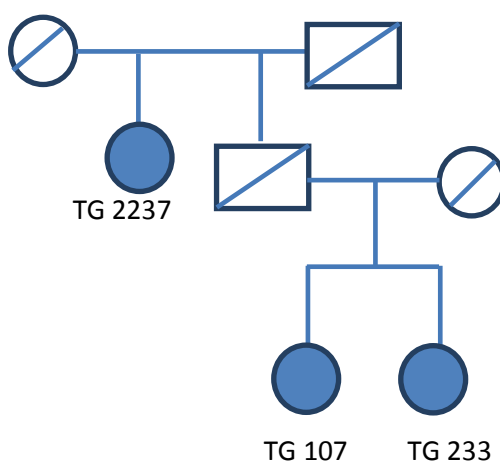


Figura 4.4: Segregación familiar de la mutación p.Gln133X



3. Identificación de las variantes en el gen *LMF1*

El gen *LMF1* es un gen que codifica para el factor 1 de maduración de la lipasa, dicha proteína es requerida para la maduración post-traducciona de LpL, LH y lipasa endotelial. La pérdida de función de *LMF1* produce HTG.

Para la identificación de las variantes comunes y la detección de mutaciones nuevas y previamente descritas en el gen *LMF1* asociadas con HTG, se realizó la secuenciación automática del promotor, los exones y los nexos de unión-intrón del gen *LMF1*, tal y como se describe en el apartado 7.X del capítulo *Material y Métodos*. En la población afecta de HTG estudiada se identificaron las variantes raras que se muestran en la tabla 4.7, considerando como tales, aquellas que no han sido registradas en el proyecto de los 1000 Genomas.

Tabla 4.7 Frecuencia de las variantes raras en el gen *LMF1* encontradas en los sujetos del estudio.

Variante	Localización	N	Frecuencia (%)
p.Arg451Trp	Exón 8	1	0,89
p.Pro562Arg	Exón 11	2	1,778

N: número de individuos

Se registraron todas las variantes comunes que presentaron los 112 sujetos con HTG en el gen *LMF1*, calculándose las frecuencias alélicas y genotípicas, que se muestran en la Tabla 4.8.

El análisis de las frecuencias genotípicas mostró que todos los polimorfismos a excepción del c.194-28T>C se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, siendo su frecuencia la esperada en la población general.

Se realizó la comparación (Tabla 4.4) de las frecuencias alélicas de estas variantes comunes o polimorfismos en nuestra población de estudio frente a la población Europea del estudio de los 1000 Genomas (www.1000Genomes.org). Los SNPs c.194-28T>C y c.729+18C>G mostraron una frecuencia significativamente menor en los sujetos con HTG ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Tabla 4.8: Frecuencias genotípicas las variantes comunes del gen *LMF1*.

SNP		FRECUENCIAS GENÓMICAS		
		GENOTIPOS	N	FRECUENCIA
p.Leu85Leu	Rs12448005	TT	96	0.857
		CT	16	0.143
		CC	0	0
p.Thr102Thr	Rs371667	GG	63	0.5625
		GA	45	0.4018
		AA	4	0.0357
c.194-28T>C	Rs3751666	TT	65	0.58
		CT	31	0.277
		CC	16	0.143
p.Tyr180Tyr	Rs2277892	GG	84	0.75
		GA	27	0.241
		AA	1	0.009
p.Glu181Glu	Rs2277893	GG	67	0.598
		GA	40	0.357
		AA	5	0.044
c.664-58G>C	Rs4984706	GG	67	0.598
		GC	40	0.357
		CC	5	0.044
c.664-35T>C	rs4984705	TT	71	0.634
		CT	35	0.3125
		CC	6	0.0535
c.729+18C>G	Rs11864203	CC	83	0.741
		CG	29	0.2589
		GG	0	0
p.Ala252Ala	Rs2076425	GG	95	0.847
		GA	16	0.143
		AA	1	0.009
c.897+28G>A	rs18431133	GG	111	0.991
		GA	1	0.009
		AA	0	0
c.897+27C>T	rs76200860	CC	111	0.991
		CT	1	0.009
		TT	0	0
p.Arg351Gln	Rs192520307	GG	111	0.991
		GA	1	0.009
		AA	0	0
p.Arg354Trp	rs138461953	CC	107	0.955
		CT	5	0.0446
		TT	0	0
p.Arg364Gln	Rs351683	GG	106	0.946
		GA	6	0.535
		AA	0	0

Tabla 4.9. Frecuencias alélicas de los SNPs identificados en el gen *LMF1* en la población con HTG y los 1000 Genomas de la población europea.

Variante		Alelo menor	Frecuencia alélica HTG	Frecuencia alélica 1000 Genomas	P
p.Leu85Leu	Rs12448005	C	0,071	0,065	0,690
p.Thr102Thr	Rs371667	A	0,237	0,206	0,322
c.194-28T>C	Rs3751666	C	0,281	0,385	0,004
p.Tyr180Tyr	Rs2277892	A	0,129	0,096	0,153
p.Glu181Glu	Rs2277893	A	0,223	0,177	0,118
c.664-58G>C	Rs4984706	C	0,223	0,263	0,235
c.194-28T>C	Rs3751666	T	0,090	0,016	0,444
c.729+18C>G	Rs11864203	G	0,129	0,273	<0,001
p.Ala252Ala	Rs2076425	A	0,080	0,104	0,293
c.897+28G>A	rs18431133	A	0,040	0,000	0,066
c.897+27C>T	rs76200860	T	0,040	0,000	0,066
p.Arg351Gln	Rs192520307	A	0,040	0,010	0,359
p.Arg354Trp	rs138461953	T	0,022	0,025	0,815
p.Arg364Gln	Rs351683	A	0,027	0,033	0,641

3.1 Análisis bioinformático de las variantes en el gen *LMF1*

Todas las variantes que supusieron un cambio no sinónimo fueron analizadas con los programas informáticos PolyPhen-2⁶⁶, SIFT⁶⁷ y MutationTaster⁶⁸, las mutaciones que se encontraban en promotores o dieron lugar a un codón de parada sólo pudieron ser analizadas por Mutation Taster. El resultado de este análisis bioinformático de las variantes del gen *LMF1* se muestra en la tabla 4.10.

Tabla 4.10: Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen *LMF1*

Análisis in Silico			
Variante	Polyphen	SIFT	MutationTaster
p.Arg351Gln rs19520307	Benigno	0,63	Polimorfismo 0,999
p.Arg354Trp rs138461953	Benigno	0,78	Polimorfismo 0,999
p.Arg364Gln rs35168378	Probablemente dañino	0,07	Causal de enfermedad 0,999
p.Arg451Trp COSM417215	Probablemente dañino	0,04	Polimorfismo 0,999
p.Pro562Arg rs4984948	Posiblemente dañino	0,23	Causal de enfermedad 0,999
p.Leu85Leu rs12448005	NA	NA	Causal enfermedad 1,00
p.Thr102Thr rs3751667	NA	NA	Polimorfismo 0,999
c.194-28T>C rs3751666	NA	NA	Polimorfismo 0,999
p.Tyr180Tyr rs2277892	NA	NA	Polimorfismo 0,999
p.Glu181Glu rs2277893	NA	NA	Polimorfismo 0,00
c.664-58G>C rs4984706	NA	NA	Polimorfismo 0,999
c.664-35T>C rs4989705	NA	NA	Polimorfismo 0,999
c.729+18C>G rs11864203	NA	NA	Polimorfismo 0,999
p. Ala252Ala rs2076425	NA	NA	Polimorfismo 0,00
c.897+28G>A rs18431133	NA	NA	Polimorfismo 0,999
c.897+27C>T rs76200860	NA	NA	Polimorfismo 0,999

El análisis mediante PolyPhen-2 mostró que las variantes raras p.Arg364Gln, p.Arg451Trp y p.Pro562Arg eran probablemente dañinas y por tanto causales para la enfermedad, tal y como también se obtuvo mediante Mutation Taster. De igual manera, para estas tres variantes se obtuvieron puntuaciones cercanas de 0 con el análisis de SIFT, lo que implica que son perjudiciales para la proteína. El resto de variantes no pudieron ser analizadas por PolyPhen-2 y SIFT o resultaron benignas. El análisis mediante Mutation Taster, mostró que además de las

RESULTADOS

mutaciones nombradas con anterioridad, el cambio p.Leu85Leu es una posible causa para la HTG.

4. Identificación de las variantes en el gen *APOA5*

El gen *APOA5* fue el último miembro descubierto de la agrupación génica *APOA1/C3/A4*, consta de 4 exones, 369 aminoácidos y está fundamentalmente expresado en el hígado.

Para la identificación de las variantes comunes y la detección de mutaciones nuevas y previamente descritas en el gen *APOA5* asociadas con HTG, se realizó la secuenciación automática del promotor, los exones y los nexos de unión-intrón del gen *APOA5*, tal y como se describe en el apartado 7 del capítulo *Material y Métodos*. En la población afecta de HTG estudiada sólo se identificó la mutación p.Pro253Leu en 2 sujetos.

El análisis de las frecuencias genotípicas mostró que todos los polimorfismos a excepción del c.162-43A>G se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, siendo su frecuencia la esperada en la población general.

Se realizó la comparación (Tabla 4.12) de las frecuencias alélicas de estas variantes comunes o polimorfismos en nuestra población de estudio frente a la población Europea del estudio de los 1000 Genomas (www.1000Genomes.org). Los SNPs c.-3A>G, p.Ser19Trp, p.Asp37Glu, c.162-43A>G y c.*76C>T mostraron una frecuencia significativamente mayor en los sujetos con HTG ($p < 0.05$)

4.1 Análisis bioinformático de las variantes del gen *APOA5*

Todas las variantes que supusieron un cambio no sinónimo fueron analizadas con los programas informáticos PolyPhen-2⁶⁶, SIFT⁶⁷ y MutationTaster⁶⁸, las mutaciones que se encontraban en promotores o dieron lugar a un codón de parada sólo pudieron ser analizadas por MutationTaster. El resultado de este análisis bioinformático de las variantes del gen *APO5* se muestra en la tabla 4.13.

RESULTADOS

Tabla 4.11: Frecuencias genotípicas de los SNPs del gen *APOA5* encontrados en los sujetos del estudio.

SNP		FRECUENCIAS GENOTÍPICAS		
		GENOTIPOS	N	FRECUENCIA
c.162-43A>G	rs2072560	GG	75	0.6696
		GA	16	0.143
		AA	8	0.071
c.*31C>T	Rs619054	CC	75	0.669
		CT	29	0.259
		TT	3	0.0267
c.*76C>T	Rs3489864	CC	104	0.928
		CT	3	0.0267
		TT	0	0
c.*158T>C	Rs22667788	TT	69	0.616
		CT	32	0.285
		CC	6	0.0535
c.-3G>A	Rs651821	AA	70	0.667
		AG	23	0.219
		GG	12	0.114
p.Ser19Trp	Rs3135506	CC	57	0.543
		CG	44	0.419
		GG	4	0.038
p.Asp37Glu	Rs34282181	CC	103	0,981
		CA	2	0,019
		AA	0	0

N: número individuos; p: grado de significación estadística según la prueba Chi- cuadrado; EHV: Equilibrio Hardy-Weinberg.

Tabla 4.12: Frecuencias alélicas de los SNPs identificados en el gen *APOA5* en la población con HTG y los 1000 Genomas de la población europea.

Variante		Alelo menor	Frecuencia alélica HTG	Frecuencia alélica 1000 Genomas	P
c.-3A>G	Rs651821	G	0,224	0,080	<0,001
p.Ser19Trp	Rs3135506	G	0,233	0,057	<0,001
p.Asp37Glu	Rs34282181	T	0,010	0,000	0,002
c.162-43A>G	rs2072560	G	0,162	0,080	<0,001
c.*31C>T	Rs619054	T	0,164	0,223	0,059
c.*76C>T	Rs3489864	T	0,014	0,026	0,293
c.*158T>C	Rs22667788	C	0,206	0,091	<0,001

Tabla 4.13: Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen *APOA5*

VARIANTE	Polyphen	SIFT	MutationTaster
c.-3A>G rs651821	NA	NA	Polimorfismo 0,999
p.Ser19Trp rs3135506	Probablemente dañino	0	Polimorfismo 0,999
p.Asp37Glu rs34282181	Benigno	0,6	Polimorfismo 0,999
c.162-43A>G rs2072560	NA	NA	Polimorfismo 0,999
p.Leu253Pro c.758T>C	Probablemente dañina 1,000	0	Causal de enfermedad 0,999
c.*31C>T rs619054	NA	NA	Polimorfismo 0,999
c.*76C>T rs34089864	NA	NA	Polimorfismo 0,999
c.*158T>C rs2266788	NA	NA	Polimorfismo 0,999

El análisis mediante PolyPhen-2 y SIFT mostró que la variante raras p.L253P y el SNP p.Ser19Trp, clásicamente asociado con HTG, son probablemente dañinas y por tanto probablemente causales para la enfermedad, tal y como también se obtuvo mediante Mutation Taster. De igual manera, para esta variante se obtuvieron puntuaciones cercanas de 0 con el análisis de SIFT, lo que implica que son perjudiciales para la proteína. El resto de variantes no pudieron ser analizadas por PolyPhen-2 y SIFT o resultaron benignas en el análisis de Mutation Taster.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos realizado el análisis genómico de los genes asociados a hiperquilomicronemia en 112 sujetos con HTG primaria, encontrando que 13 pacientes (11,6%) son portadores de 11 variantes raras asociadas a HTG en genes candidatos que participan en la función de la LpL (*LPL*, *LMF1* y *APOA5*), de las cuales 1 de ellas es descrita por primera vez este trabajo. Además, hemos identificado variantes comunes o polimorfismos que se asocian con la HTG ya que se encuentran en una frecuencia alélica diferente de la que se observa en población general: C.281T>G, p.Asn36Asn, p.Val135Val, c.430-6C>T, p.Pro234Leu, p.Thr379Ile y p.Ser474X en *LPL*; c.194-28 T>G y c.729+18C>G en *LMF1*; y c.-3A >G, p.Ser19Trp, p.Asp37Glu, c.162-43A >G y c.*158 T>C en *APOA5*. Nuestros resultados confirman que la HTG primaria es altamente heterogénea en su etiología y se asocia con la acumulación de variantes comunes y raras en los genes involucrados en el metabolismo de los TG.

Los pacientes de este estudio presentaron una concentración media de TG de 670 mg/dl, lo que explica la menor frecuencia de defectos raros en nuestro estudio comparadas con el trabajo publicado por Surendran et al⁷⁴, que encontró 46 mutaciones en 86 pacientes seleccionados por sufrir hiperquilomicronemia y por tanto, con niveles más altos de TG.

Los SNPsp.Asp36Asn de *LPL* y el p.Ser19Trp de *APOA5* están fuertemente asociados con la HTG^{71, 72} resultados confirmados en este estudio.

De los 112 pacientes incluidos en el estudio, 9 heterocigotos para mutaciones en *LPL*, las variantes p.Gln16Glufs39X, p. Gln133X y p.Gly215Glu y p.Pro234Leu habían sido previamente descritas como causales de HTG. Las variantes c.-16A>G y c. -241A>G afectan a la funcionalidad del promotor de LPL tal y como se ha descrito recientemente^{72, 62, 74y 75}. Mediante un análisis bioinformático y un estudio del RNA, se demostró que mutación c. 1018+2 G>A produce la eliminación del exón 6, generando una nueva región codificante que da lugar a una proteína LPL aberrante. Sin embargo, la mutación descrita “de novo” en este trabajo, c.250-A>G, no parece producir efecto, aunque se requiere un análisis a mayor profundidad.

La segregación de la mutación c. 1018+2G>A no se ha podido demostrar, ya que ninguno de los familiares analizados presentan la mutación ni fenotipo HTG. Sin embargo, la mutación p.Gln133X, pese a observarse en todos los familiares analizados, solo se asoció con una HTG muy grave en el caso índice, quien era portadora del genotipo E3/E2, que asocia con HTG, y del polimorfismo p.Ser19Trp.

LMF1 se ha asociado recientemente con niveles elevados de TG cuando hay mutaciones en homocigosidad en el dominio C- terminal de la proteína^{9,58}. Las variantes raras de *LMF1*

DISCUSIÓN

P.Arg451Trp y p.Pro562Arg son dañinas de acuerdo con el análisis bioinformático y se encuentran localizadas cercanas a la región crítica para la dimeración de LpL⁵⁶. Para determinar si los polimorfismo c. 194-28T>G y c. 729+18C>G son causales hacen falta más estudios.

Hemos identificados dos sujetos heterocigotos para la mutación p.Leu256Pro75 de *APOA5*, recientemente se ha identificado que esta mutación provoca una unión defectuosa de Apo A-V con la sortilina y SorLA/LR11, fallando en la activación de LpL⁷⁶.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la HTG primaria del adulto con TG alrededor de 500-1000mg/dl presenta mayor cantidad de variantes genéticas respecto a la población general, con una combinación de mutaciones de efecto entre moderado y agresivo, y polimorfismos clásicamente asociados con la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. Hemos identificado 7 mutaciones en *LPL*, 2 en *LMF1* y 1 en *APOA5* en 13 de 112 sujetos, con HTG primaria grave.
2. Los polimorfismos c.281T>G, p.Asn36Asn, p.Val135Val, c.430-6C>T, p.Pro234Leu, p.Thr379Ile y p.Ser474X en *LPL*; c.194-28 T>G y c.729+18C>G en *LMF1*; y c.-3A>G, p.Ser19Trp, p.Asp37Glu, c.162-43A>G y c.*158T>C en *APOA5* presentaron una distribución de la frecuencia alélica diferente a la población general ($p<0,05$).
3. Las variantes c.-241G>C, c. 1018+2G>A, p.Gln16Glu>X39, p.Asp36Asn, p.Gln133X, p.Pro234Leu, p.Gly215Glu, c.430-6C>T y p.Asn318Ser de *LPL*, p.Arg364Gln, p.Arg451Trp, p.Pro562Arg y p.Leu85Leu de *LMF1*, p.Pro253Leu y p.Ser19Trp de *APOA5*, se consideran como potencialmente dañinas, de acuerdo con el análisis bioinformático.
4. Análisis de la de la mutación c.1018+2G>A, demuestra la eliminación del exón 6, generando una nueva región codificante, que da a lugar a una proteína LpL aberrante.
5. La segregación familiar de la mutación c. 1018+2 G>A no se ha podido determinar, por no encontrarse en ninguno de los familiares contactados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Durrington P. **Dyslipidaemia**. *Lancet*. 2003;362:717-31.
2. Brown M.S, Goldstein J L. **A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis**. *Science*. 1986;232:34-.47
3. Rader DJ, Mangelsdorf DJ. **The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis**. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;57:1709-19.
4. Hegele RA. **Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications**. *Nature Rev Genet*. 2009;10:109-19.
5. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. **Atherogenic lipoprotein particles in Atherosclerosis**. *Circulation*. 2004;109(suppl III): III-2 –III-7.
6. Iqbal J, Hussain MM. **Intestinal lipid absorption**. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:1183-94.
7. Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese Jr. **Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis**. *J Lipid Res*. 2008;49:2283-301.
8. Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quettermous T, Cooper AD. **Endothelial lipase: a new lipase on the block**. *J Lipid Res*. 2002;43:1763-9.
9. Peterfy M, Ben- Zeev O, Mao HZ, Weissglas- VolkovBE. **Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia**. *Nature Genet*. 2007;39:1483-7.
10. Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale F et al. **Glycosylphosphatidylinositol- anchored high- density lipoprotein- binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons**. *Cell Metab*. 2007;5:279-90.
11. Davies BS, Beigneux AP, Barnes II, Tu Y, Gin P, Weinstein MM et al. **GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries**. *Cell Metab*. 2010;12:42-52.
12. Hassing H C, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdrop M, Dallinga- Thie GM. **Pathophysiology of hypertriglyceridemia**. *BiochimBiophysActa*. 2012;1821:826-32.
13. Havel JL, Hamilton RL. **Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:213-5.
14. Shelness GS, Sellers JA. **Very low density lipoprotein assembly and secretion**. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:151-7.
15. Aalto-setala K, Fisher E.A, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R et al. **Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice**.

- Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo C III and reduced apo E on the particles.** *J Clin Invest.* 1992;90:1889-90.
16. Shu X, Nelbach L, Ryan RO, Forte TM. **Apolipoprotein A-V associated with intrahepatic lipid droplets and influences triglyceride accumulation.** *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:605-8.
 17. Fisher EA, Khanna RS, McLeod RS. **Ubiquitination regulates the assembly of VLDL in HepG2 cells and is the committing step of the apoB- 100 ERAD pathway.** *J Lipid Res.* 2011;52:1170-80.
 18. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J et al. **The very low density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor.** *J Atheroscler Thromb.* 2004;11:200-8.
 19. Brown MS, Goldstein JL. **Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic.** *J Clin Invest.* 1983;72:743-50.
 20. Rader D. **Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies.** *J Clin Invest.* 2006;116:3090-100.
 21. Lewis G, Rader D. **New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport.** *Circ Res.* 2005;96:1221-53.
 22. Fukuda M, Nakano M, Sriwongsitanont S, Ureno M, Kuroda Y, Handa T. **Spontaneous reconstitution of discoidal HDL from sphingomyelin- containing model membranes by apolipoprotein A- I.** *J Lipid Res.* 2007;48:882-91.
 23. Rye K, Barter P. **Formation and metabolism of prebeta- migrating lipid- poor apolipoprotein A-I.** *ArteriosclerThromb Vas Biol.* 2004;24:421-9.
 24. Jonas A. **Lecithincholesterolacyltransferase.** *BiochimBiophysActa.* 2000;1529:245-301.
 25. Saddar S, Mineo C, Shaul PW. **Signaling by the high- affinity HDL receptor scavenger receptor B type I.** *ArteriosclerThromb Vasc Biol.* 2010;30:144-94.
 26. Silver D, Wang N, Xiao X, Tall A. **High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion.** *J Biol Chem.* 2001;276:25287-380.
 27. Brown M, Inazu A, Helser C et al. **Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high- density lipoproteins.** *Nature.* 1989;342:448-91.
 28. Inazu A, Brown M, Helser C et al. **Increased high- density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl- ester transfer protein gene mutation.** *N England J Med.* 1990;323:1234-42.
 29. John D. Brunzell, M.D. **Hypertriglyceridemia.** *N Engl J Med.* 2007;357:1009-26.

30. Christopher T, Johansen and Robert A, Hegele MD. **Genetic bases of hypertriglyceridemia phenotypes.** *Cur OpinLipidol.* 2011;22:247-53.
31. Pennachio LA, Olivier M, Hubacek JA et al. **An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing.** *Science.* 2001; 294:169-73.
32. Hegele R, Pollex RL. **Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics.** *Mol Cell Biochem.* 2009;326:35-43.
33. Connelly PW, Maguire GF, Little JA. **Structure of apolipoprotein C- II deficiency associated with premature vascular disease.** *J Clin Invest.* 1987;80:1597-606.
34. Criqui MH, Heiss G, Cohn R et al. **Plasma Triglyceride level and mortality form coronary heart disease.** *N Engl J Med.* 1993;328:1220-5.
35. Santamarina-Fojo, S. **The familial chylomicronemia syndrome.** *Endocrinol Metab ClinNorth Am.* 1998;27:551-5.
36. Peterfy, Miklos; Ben-Zeev, Osnat; Mao, Hui Z.; et al. **Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia.** *Nature Genet.* 2007;29:1483-7.
37. Hokanson JE, Austin MA. **Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high- density lipoprotein cholesterol level: a meta- analysis of population – based prospective studies.** *J Cardiovasc Risk.* 1996;3:213-9.
38. Bansal S, Buring JE, Rifai N et al. **Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women.** *JAMA.* 2007;298:309-16.
39. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P et al. **Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease and death in men and women.** *JAMA.* 2007;298:299-308.
40. Hegele RA. **Phenomics, lamin A/C, and metabolic disease.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4566-8.
41. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. **Genetics determinants of plasma triglycerides.** Thematic Review Series: Genetics of Human Lipid Diseases. *JLipid Res.* 2011;52:189-206.
42. Altshuler D, Daly JM, Lander ES. **Genetic mapping in human disease.** *Science.* 2008;322:881-8.
43. Attia J, Ioannidis JP. **How to use an article about genetic association: A: Background concepts.** *JAMA.* 2009;301:74-81.
44. Attia J, Ioannidis JP. **How to use an article about genetic association: B: Are the results and of the study valid?** *JAMA.* 2009;301:191-7.

45. Attia J, Ioannidis JP. **How to use an article about genetic association: C: What are the results and they help me in caring for my patients?** *JAMA*. 2009;301:304-8.
46. Brunzell JD, Deeb SS. **Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. Apo C- II Deficiency and Hepatic Lipase Deficiency.** *The metabolic and molecular bases of inherited this is*. New York: Mc Graw-Hill. 2001.117;2789-2808.
47. James R. M, Scott A. I,Dipak P. R. **Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease.** *J Mol Med*.2002;80:753-66.
48. Kirchgessner TG, LeBoeuf CA, Lagner S, Zollman C, Chang B, Taylor MC.**Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci both distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression.** *J Biol Chem*. 1989;264:1473-82.
49. Shimada M, Shimano T, Gotoda K, Yamamoto M, Kawamura T, Inaba I et al. **Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. Resistance to diet-induced hypertiglyceridemia and hypercholesterolemia.** *J Biol Chem*. 1993;268:17924-9.
50. Daniel S. Ory1. **Chylomicrons and Lipoprotein Lipase at the Endothelial Surface: Bound and GAG-ged?***Cell Metabolism*. 2007;5:229-31.
51. Van der Vliet HN, Sammels MG. **Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration.***J. Biol Chem*. 2001;276:44512-20.
52. Van der Vliet HN, Schaap FG. **Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295:1156-9.
53. Jakel HM, Nowak A, Fruchart- Najib and Fruchart JC. **Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride rich lipoproteins?** *Ann Med*. 2006;38:2-10.
54. Dorfmeister BW, Zeng A, Dichlberger SK. **Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding.** *ArteriosclerThromb Vas Biol*. 2008;28:1866-71.
55. Paterniti JR, brown WV, Ginsberg HN and Artzt K. **Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse.** *Science*. 1983;221:167-9.
56. Doolittle MH, NeherSb, Ben- Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM et al. **Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem*. 2009;284:33623-33.
57. Yin F, Doolittle MH, Peterfy M. **A quantitative assay measuring the function of lipase maturation factor 1.** *J Lipid Res*. 2009;50:2265-69.

58. Cefalu AB, Noto D, Arpi ML, Yin F. **Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hipertrigliceridemia.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4584-90.
59. Paterniti JR, brown WV, Ginsberg HN and Artzt K. **Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation intronic variant.** *Hum Mol Genet.* 2005;14:2595-605.
60. Ikeda Y, Goji K, Takagi A. **A compound heterozygote for a novel missense mutation (G105R) in exón 3 and a missense mutation (D204E) in exón 5 of lipoprotein lipase gene in Japanese infant with hyperchylomicraemia.** *Clin Sci.* 2000;99:569-78.
61. Nakamura T, Suehiro T, Yasuoka N, Yamamoto M, Ito H, Yamano T, Hashimoto K. **A novel nonsense mutation in exon 1 and a transition in intron 3 of the lipoprotein lipase gene** *J AtherosclerThromb.* 1996;3:17-24.
62. Yang WS, Nevin D, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD and Deeb S. **Regulatory mutations in the human lipoproteinlipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease.** *J Lipid Res.* 1996;37:2627-37.
63. Yuanhong MA, Henderson HE, VenMurhy MR, Roderer GH, Monsalve MV, Clarke LA, Normand T, Julien P, Gagné IC, Lambert M, Dasignon J, Lupien PJ, Brunzell J, Hayden MR. **A mutation in the human Lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians.** *N Engl J Med.* 1991;324:1761-6.
64. Doolittle MH, Ehrhardt N, Peterfy M. **Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly.** *Curr Opinion Lipidol.* 2012;21:198-203.
65. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, et al. **Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association.** *Circulation.* 2011;123:2292-333.
66. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nature Method.* 2010;7:248–249.
67. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** *Nature Protocols.* 2009;4: 1073–81.
68. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. **MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.** *Nature Methods.* 2010;7:575–6.
69. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. **Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence.** *J Mol Biol.* 1991;220:49–65.

70. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. **Improved splice site detection inGenie.** *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology.* **1997;4:311–323.**
71. De Castro-Orós I, Pueyo M, Mateo- Gallego R, Bolado-Carrancio A, Alvarez- Sala L, Fabiani F, Cofán M et al. **Mutations in candidate loci in severe hypertriglyceridemia.** **En revision.**
72. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, Yusuf S et al. **Resequencing Genomic DNA of patients with severe Hypertriglyceridemia.** *ArteriosclerThromb Vasc Biol.* **2007;27:2450-5.**
73. Emi M, Hata A, Robertson M, Iverius PH, Hegele R, Lalouel JM.. **Lipoprotein lipase deficiency resulting from a nonsense mutation in exon 3 of the lipoprotein lipase gene.** *Am J Human Genet.* 1990;47:107–111.
74. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, KuivenhovenJA, Hosseini M, Péterfy M, Kastelein JJP, Johansen CT, Hegele RA, et al..**Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia.** *J Intern Med.* 2012;272:185–196.
75. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, Guido V, PrioreOliva C, Calandra S, Bertolini S. **Two novel rare variants of APOA5 gene found in subjects with severe hypertriglyceridemia.** *Clin ChimActa; international journal of clinical chemistry.*2011;412:2194–2198.
76. Mendoza-Barberá E, Julve J, Nilsson SK, Lookene A, Martín-Campos JM, Roig R,Lechuga-Sancho AM, Sloan JH, Fuentes-Prior P, Blanco-Vaca F.**Structural andfunctional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severehypertriglyceridemia.** *Research Lipid Res.* 2013;54:649–661.