

## Genética del metabolismo de lípidos

JOSÉ M. ORDOVAS

*Metabolismo lipídico, Centro de Investigación en Nutrición Humana sobre el Envejecimiento Jean-Mayer-Usda en la Universidad Tufts. Boston, Ma, EE.UU.*

**E**l vínculo entre las concentraciones séricas de colesterol y el desarrollo de aterosclerosis ha sido bien establecido. La investigación animal, los estudios epidemiológicos y los ensayos clínicos han añadido a nuestro conocimiento la relación entre el colesterol sérico y la aterosclerosis.

Las concentraciones plasmáticas de lípidos se determinan mediante un gran número de factores modificables y no modificables. Se ha examinado la contribución genética a esta variabilidad en numerosos estudios. La incorporación de técnicas de biología molecular, que han permitido la detección selectiva muy eficaz de variantes genéticas, ha facilitado la identificación de loci específicos que intervienen en la variabilidad individual de los niveles plasmáticos de lípidos. Además, la posibilidad de crear modelos animales transgénicos y deficiarios ha aumentado de una manera notable las posibilidades para estudiar el efecto de los genes en el metabolismo normal y enfermo de lipoproteínas y la aterosclerosis.

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares de lípidos y proteínas que se originan fundamentalmente en el hígado y el intestino, y que intervienen en el transporte y redistribución de los lípidos en el organismo. Los componentes proteicos de las lipoproteínas se denominan apolipoproteínas y se han designado como ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB-100, ApoB-48, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD y ApoE. Además de las apolipoproteínas constituyentes de las partículas lipoproteicas, desempeñan un papel crucial en la homeostasis del metabolismo de los lípidos algunas otras proteínas transportadoras, como la proteína de transferencia del colesterol-éster (CETP), enzimas como la lipoproteína lipasa y la lecitina:colesteril-aciltransferasa (LCAT) y un número creciente de receptores celulares. Se ha demostrado variabilidad genética en seres humanos para la mayoría de estas proteínas. Algunas de estas variantes pueden ser la causa de los perfiles lipoproteicos anómalos que pueden contribuir a la patología de la aterosclerosis, mientras que otros podrían utilizarse como marcadores del riesgo de enfermedad hasta que se descubra la mutación causante.

Los estudios animales han representado un importante papel en la elucidación de los mecanismos básicos que regulan el metabolismo lipídico. Se han utilizado varios modelos animales con este fin; sin embargo, el ratón ha sido siempre el modelo preferido para examinar los aspectos genéticos. Los aspectos positivos de este modelo son su bajo coste, su fácil cría y su corto tiempo de generación. Los aspectos negativos se deben a sus principales diferencias en cuanto al metabolismo lipoproteico y su resistencia a la aterosclerosis. Incluso en aquellas cepas consideradas sensibles a la aterosclerosis, la expresión del fenotipo precisa el uso de dietas ricas en grasas y colesterol y ácido cólico, que tiene una considerable hepatotoxicidad, que puede ser un factor de confusión en el diseño experimental.

Con la incorporación de las técnicas transgénicas, ha sido posible diseñar modelos mejores del metabolismo lipídico humano o de la sensibilidad a la aterosclerosis, o de ambas cosas. En la actualidad, hay modelos transgénicos o deficiarios para prácticamente todos los genes candidatos que intervienen en el metabolismo de lipoproteínas. Estos modelos han permitido por primera vez un examen cuidadoso del efecto de la expresión de los genes específicos sobre el metabolismo de lipoproteínas, tanto para las variantes silvestres como para las mutadas. A la inversa, se ha examinado la ausencia de productos génicos en los modelos deficiarios que complementan la información obtenida a partir de los mutantes humanos o, en los casos en los que no se haya descrito déficit humano, revelan las consecuencias fisiológicas de su ausencia.

José M. Ordovas, M.D.

Lipid Metabolism

Jean Mayer-USDA-Human Nutrition Research Center

Tufts University

Boston, MA 02111

USA

TABLA I

## Resumen de los efectos de la transición ApoA-I G/A sobre los niveles plasmáticos

Estudio	Población	Efecto asociado con el alelo A
Jeenah <i>et al.</i> [15] Pagani <i>et al.</i> [244]	Varones ingleses sanos Varones y mujeres italianos	A-I y C-HDL más elevados Mayor frecuencia en el decir C-HDL más elevado Efecto observado sólo en mujeres
Paul-Hayase <i>et al.</i> [245] Siggurdsson <i>et al.</i> [11]	Varones y chicos belgas Varones y mujeres islandeses	A-I más elevado C-HDL y A-I más elevado. Efecto observado sólo en varones no fumadores
Saha <i>et al.</i> [246]	Chinos	ApoA-I más elevado. Efecto observado sólo en no fumadores
Xu <i>et al.</i> [247]	Chicos y chicas italianos	Sin efectos sobre el C-HDL; ApoA-I más elevado observado sólo en chicos
Civeira <i>et al.</i> [248]	Hombres y mujeres españoles	Sin diferencias en la frecuencia de alelos entre el percentil 25 y el 75 de la distribución de C-HDL. En este estudio no se controló el hábito de fumar
Barre <i>et al.</i> [249]	22 familias nucleares de raza blanca	Ligamiento no significativo con C-HDL

En esta revisión se abarcará nuestro actual conocimiento relativo al efecto de las mutaciones comunes y raras en loci génicos candidatos de proteínas que intervienen en el metabolismo lipídico, así como de la información obtenida a partir de modelos animales transgénicos y deficitarios.

#### Genes candidatos

**Apolipoproteína A-I.** La ApoA-I es la principal proteína de las HDL y desempeña un papel crucial en el metabolismo lipídico. La ApoA-I es el principal activador *in vivo* de la enzima LCAT [1], y constituye un componente clave del proceso de transporte de colesterol inverso [2]. El gen para la ApoA-I está agrupado con los genes de la ApoC-III y la ApoA-IV en el brazo largo del cromosoma 11 humano (11q23) [3, 4]. Esta región del ADN se ha analizado de una manera extensa, lo que se ha traducido en la identificación de muchos polimorfismos de restricción de longitud comunes (RFLP) y mutaciones raras.

Se han publicado dentro de este locus más de 20 anomalías genéticas raras diferentes. Algunas se han asociado con déficit intenso de HDL y aterosclerosis coronaria prematura [5-7]; sin embargo, una de esas mutaciones muestra un efecto protector pese a su asociación con un bajo nivel de HDL [8-10]. En la siguiente dirección de Internet: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html> puede encontrarse una lista de las mutaciones en éste y otros loci génicos candidatos y sus fenotipos asociados.

En este locus se han descrito 16 polimorfismos comunes con un valor de heterocigosidad que

oscila entre 0,499 y 0,095. Uno de los mejor estudiados es una variante común descrita 78 pb por encima del sitio de inicio de la transcripción del gen ApoA-I. Se debe a la transición de adenina (A) a guanina (G) (G/A). En varios estudios se ha publicado que individuos con el alelo A, que aparece a una frecuencia de 0,15-0,20 en las poblaciones blancas, tienen niveles más elevados de HDL-C que los sujetos homocigotos para el alelo G, más común. La magnitud y la distribución sexual de este efecto difiere de unos estudios a otros. Los datos se resumen en la Tabla 1 y muestran una notable variabilidad de los efectos publicados en las diferentes poblaciones. Las razones de estas discrepancias no se conocen del todo, pero sugieren con fuerza una interacción gen-ambiente, según demuestra el hábito de fumar y la grasa de la dieta [11, 12].

No está claro si el efecto de esta variante sobre los niveles de HDL-C, observado en algunos estudios, se debe a la sustitución de G por A per se o al desequilibrio de ligamiento entre el alelo A y una mutación efectora distinta, y todavía no identificada. El análisis *in vitro* de los efectos de este polimorfismo sobre la transcripción ha producido también resultados contradictorios. En los artículos de Tuteja y cols. [13] y Smith y cols. [14] se publicaba que la sustitución de G por A disminuía la transcripción aproximadamente en un 50% y en un 30%, respectivamente. Esto último es compatible con sus propios estudios de recambio realizados *in vivo*, en los que se demostró una disminución de la síntesis de ApoA-I en individuos con el alelo A, aunque las HDL-C plasmáticas no diferían entre

los individuos GG y GA. A la inversa, Jeenah y cols. [15] y Angotti y cols. [16] publicaron un aumento de entre 4 y 7 veces de la transcripción asociada con el alelo A, y demostraron que esto puede deberse a una reducción de la afinidad de unión de un factor nuclear del alelo A que tiene como consecuencia una mayor eficacia de la transcripción del promotor de ApoA-I.

*Apolipoproteína A-I transgénica.* La sobreexpresión de la ApoA-I humana en ratones transgénicos se ha asociado con aumentos del colesterol HDL, lo que sugiere que los tratamientos diseñados para incrementar la producción de ApoA-I tendrán como consecuencia un aumento paralelo de las HDL-C, mejorando así el perfil lipídico aterogénico [17]. Una observación interesante en estos ratones provenía del hecho de que en el ratón silvestre, las partículas HDL tienen un tamaño monodisperso, mientras que la adición de la ApoA-I humana inducía la formación de dos clases de tamaño principales similares en tamaño a las normalmente observadas en humanos [18, 19]. Desde el punto de vista metabólico, se publicó otro hallazgo interesante con respecto al metabolismo del éster de colesterol HDL. En el ratón silvestre, la velocidad de catabolismo fraccional (FCR) del éster de colesterol HDL y la ApoA-I son similares, mientras que en los ratones transgénicos este valor del éster de colesterol HDL era más rápido que el de la ApoA-I [20]. Sin embargo, en estudios recientes se sugiere que esto puede deberse a un mayor índice de captación renal de ApoA-I [21]. También se ha demostrado que los niveles elevados de ApoA-I humana atenúan la modificación por oxidación de las lipoproteínas de baja densidad en ratones transgénicos [22]. Además, la expresión de la ApoA-I humana evita la aterosclerosis asociada con apolipoproteína(A) en los ratones transgénicos [23]. También se ha demostrado en conejos transgénicos la protección de la ApoA-I contra la aterosclerosis inducida por la dieta [24]; sin embargo, parte de la protección puede ser eliminada cuando también se sobreexpone la ApoA-II, como se demuestra en ratones transgénicos para la ApoA-I y la ApoA-II [25].

*Déficit de ApoA-I.* Las principales alteraciones metabólicas consecutivas de la ausencia de ApoA-I fueron una reducción significativa de los niveles de HDL-C (alrededor de un 75%); una disminución del flujo de éster de colesterol HDL (alrededor de 8 veces) [26]; sin embargo, al contrario de lo que cabría esperar, la alimentación a largo plazo (20 semanas) con una dieta aterogénica (1,25% de colesterol, 15% de grasa, 0,5% de colato sódico)

no tuvo un efecto significativo sobre la inducción de aterosclerosis [27]. Esto indica que en este modelo animal el déficit de HDL por sí mismo no bastó para causar una aterosclerosis inducida por la dieta.

*Apolipoproteína A-II.* La apolipoproteína A-II es la segunda apolipoproteína más común presente en las HDL. El gen se ha cartografiado en el cromosoma 1 en la región 1q21-q23. Su función sigue siendo desconocida. Las partículas HDL que contienen ApoA-II (LpA-II/A-II) parecen invertir con menos eficacia el transporte de colesterol que las que contienen sólo ApoA-I (LpA-I). Dentro de este locus se ha detectado un polimorfismo común y, pese a las observaciones iniciales, un ligamiento entre este RFLP y niveles o la composición de partículas alteradas de HDL-C; sin embargo, en otros estudios no se demostró una asociación significativa [28-30].

Sólo se ha publicado un caso de déficit de ApoA-II, y se debe a una transición G a A en la posición 1 del intrón 3 del gen de la ApoA-II. Además de la ausencia de ApoA-II, no se ha asociado ningún otro fenotipo lipídico ni patológico con esta mutación. En esta región se han descrito diversas variantes comunes [30, 31].

*Ratones ApoA-II transgénicos.* En una de las líneas transgénicas ApoA-II, la sobreexpresión de la ApoA-II humana no tuvo como consecuencia niveles elevados de HDL-C, ni se vieron afectados los niveles de otras fracciones lipoproteicas. Sin embargo, se observó una alteración en el tamaño de las HDL, con la presencia de una población de partículas con un diámetro de 8,0 nm, compatible fundamentalmente con la ApoA-II humana [32]. Estas observaciones apoyan los estudios epidemiológicos y clínicos realizados en humanos según los cuales no hay asociación entre los niveles de ApoA-II y HDL-C. Se desarrolló un modelo diferente que expresaba en exceso la ApoA-II de ratón; en este caso, se duplicó tanto el colesterol HDL como el no-HDL [33]. Sin embargo, en esta línea transgénica, la presencia de la ApoA-II se asoció con un aumento de la aterosclerosis [34]. De nuevo, este modelo destaca la importancia de las diferencias específicas estructurales en las apolipoproteínas en el metabolismo de esas partículas.

*Apolipoproteína A-IV.* En los seres humanos la ApoA-IV es sintetizada principalmente en el intestino como una glucoproteína de 46 kD [35]. La función precisa de la ApoA-IV sigue sin conocerse, su origen intestinal y las pruebas experimentales procedentes de un déficit familiar de apolipoproteína

TABLA II

## Resumen de los efectos de la variante ApoA-IV 360Gln/His sobre los niveles plasmáticos de lípidos y la coronariopatía

Estudio	Población	Efecto asociado con el alelo <sup>360</sup> His
Hanis <i>et al.</i> [250] von Eckardstein <i>et al.</i> [251]	Hombres y mujeres méxico-americanos Estudiantes de medicina jóvenes	A-I más elevada. Efecto mínimo C-LDL más elevado y Lp(a) menor No se observó efecto significativo sobre el C-HDL
Kamboh <i>et al.</i> [252]	Controles y NIDDM hispanos	Sin efecto sobre los sujetos NIDDM. Menor C-HDL en mujeres control
Ehnholm <i>et al.</i> [55]	Casos y controles de cinco regiones europeas	Sin efecto sobre el colesterol HDL. El gen ApoA-IV no fue un determinante principal del riesgo de IM o cardiopatía
Eichner <i>et al.</i> [253]	Mujeres de raza blanca	TG menores. Efecto marginal (p = 0053)
Zaiou <i>et al.</i> [254]	Hombres y mujeres franceses	Sin efecto en las variables lipídicas examinadas
Carrejo <i>et al.</i> [255]	Sujetos hiperlipidémicos mixtos	Sin relación con la hipertensión, la diabetes, la cardiopatía o los niveles plasmáticos
De Knijff <i>et al.</i> [256]	Raza blanca	Sin efecto sobre las variables lipídicas
Menzel <i>et al.</i> [42]	Sujetos islandeses	Mayor nivel de HDL y menor de triglicéridos
Menzel <i>et al.</i> [54]	Tiroleses	Mayor nivel de HDL y menor de triglicéridos
Visvikis <i>et al.</i> [257]	Familias nucleares francesas	Sin efecto sobre los lípidos. Efectos significativos sobre la glucosa
Kamboh <i>et al.</i> [50]	NIDDM y controles	LDL más elevadas en las mujeres control
Menzel <i>et al.</i> [258]	Donantes de sangre húngaros	Niveles más elevados de colesterol HDL
Rewers <i>et al.</i> [259]	NIDDM y controles hispanos	Sin efecto sobre los controles. Aumento del riesgo de cardiopatía en NIDDM. El efecto era especialmente notable en los sujetos obesos
Vergers <i>et al.</i> [260]	NIDDM y controles	Niveles más elevados de HDL en los controles, pero no en los sujetos NIDDM

A-I/C-III/A-IV, una mutación genética rara que hemos descrito [5, 6], sugiere que desempeña un papel en la absorción de las grasas de la dieta y en la síntesis de los quilomicrones. En los estudios *in vitro* se ha demostrado que la activación de la lipoproteína-lipasa por la ApoC-II está mediada por la ApoA-IV [36] y que la ApoA-IV puede servir como activador de la lecitín:colesterol aciltransferasa (LCAT) [37]. Las lipoproteínas que contienen ApoA-IV promueven la salida de colesterol de los fibroblastos cultivados y de las células adiposas *in vitro*. Esto se ha observado también en ratones transgénicos [38]. Hay pruebas de que la ApoA-IV pueda ser uno de los ligandos para el hipotético receptor de las HDL [39-41].

Se han detectado isoformas genéticamente determinadas de ApoA-IV en humanos y en otras especies de mamíferos. Utilizando inmunoblotting y enfoque isoelectrónico, se han detectado 8 formas (A-IV\*0-A-IV\*7). La variante más común detectada por IEF es la sustitución en la ApoA-IV (Gln<sup>360</sup>→His), con una frecuencia alélica de 0,05 a 0,12 en personas de raza blanca [42, 43]. Esta variante parece ser menos común en otras razas [43-45]. Otras variantes son raras y en algunos casos están restringidas a un grupo étnico particular [45-47]. Se

han detectado otras variantes utilizando PCR. Se ha documentado una mutación relativamente común (Thr<sup>347</sup>→Ser) dentro del alelo G de la variante (Gln<sup>360</sup>→His) de la ApoA-IV. Se ha estudiado en varias poblaciones el efecto de la variación genética de la ApoA-IV sobre los niveles lipídicos en plasma [43, 48-51], que se resumen en la Tabla 2.

Más recientemente [52, 53] hemos demostrado que el alelo ApoA-IV <sup>360</sup>(His) reduce los niveles de colesterol HDL y de ApoA-I cuando los portadores están expuestos a un ambiente urbano. Como se muestra en la Tabla 2, los resultados de los estudios de población anteriores en relación con el efecto del alelo ApoA-IV <sup>360</sup>(His) sobre los niveles de colesterol HDL. En dos estudios [42, 54] realizados en poblaciones europeas, se publicó que los portadores del alelo ApoA-IV <sup>360</sup>(His) tienen niveles de colesterol HDL significativamente mayores que los homocigotos ApoA-IV <sup>360</sup>(Gln), pero sus análisis no tuvieron en cuenta el efecto potencialmente inductor de confusión del índice de masa corporal y de otros factores ambientales sobre los niveles de colesterol HDL. En un estudio más exhaustivo, realizado por Ehnholm y cols. [55], se mezclaron los datos procedentes de cinco regiones diferentes de Europa y no se encontró corre-

TABLA III

Resumen de los efectos del polimorfismo ApoB sobre los niveles plasmáticos de lípidos y la cardiopatía			
Estudio	Población	Variante	Comentarios
Wu <i>et al.</i> [261]	Sujetos con cardiopatía y control chinos	3 VNTR	No asociación con lípidos
Kammerer <i>et al.</i> [262]	México-americanos	Péptido señal ins/dl	SP-24 asociada con un nivel más elevado de colesterol LDL y ApoB
Ye <i>et al.</i> [263]	Chinos	Xbal 3-VNTR Ins/Del	El alelo X+ más frecuente en los casos 3VNTR-L (>39) aumentado en los casos Ausencia de asociaciones con la ins/dl
Pan <i>et al.</i> [264] Gylling <i>et al.</i> [176]	Casos de cardiopatía y controles chinos Varones de raza blanca sanos	Xbal, EcoR-I, MspI Xbal	No asociaciones con cardiopatía Ausencia de asociación con el metabolismo de colesterol
Turner <i>et al.</i> [265]	Europeos	Xbal 3-VNTR Ins/Del	Asociado con el colesterol plasmático, el colesterol-LDL, los triglicéridos y la ApoB No se detectaron asociaciones Aumentos del colesterol plasmático, el colesterol-LDL y la ApoB
Wick <i>et al.</i> [266]	Controles y casos de raza blanca	MspI and EcoRI	No hubo asociaciones con los niveles lipídicos
Glisic <i>et al.</i> [267]	Población serbia sana	EcoRI y MspI	Sin efecto sobre los lípidos. Posible asociación gen-tabaquismo
Bohn <i>et al.</i> [84]	Supervivientes de infarto de miocardio y controles de raza blanca	Ins/Del	Colesterol más elevado I/I y colesterol-LDL. Ausencia de efecto sobre el riesgo de cardiopatía
Wu <i>et al.</i> [268]	Casos de cardiopatía y controles chinos	Ins/Del	Aumento de DD en la cardiopatía

lación general entre el alelo ApoA-IV<sup>360</sup>(His) y las concentraciones de colesterol HDL en sujetos jóvenes. Sin embargo, en este estudio se demostraron efectos regionales variables del alelo ApoA-IV<sup>360</sup>(His). Los portadores de este alelo que vivían en ciudades industrializadas de Finlandia y de Gran Bretaña, donde la mortalidad por CP es elevada, exhibían niveles de colesterol HDL un 11% menores que los portadores que vivían en las ciudades mediterráneas del sur de Europa donde la mortalidad por CP es baja. Por el contrario, no se encontró diferencia (1%) en los niveles de colesterol HDL entre los homocigotos ApoA-IV<sup>360</sup>(Gln) que vivían en esas áreas. Estas observaciones acentúan la importancia de los antecedentes genéticos y de los factores ambientales en cuanto a la determinación del efecto particular de la ApoA-IV y, en general, otros marcadores genéticos sobre el metabolismo lipoproteico y el riesgo de CP. Un

hallazgo único de nuestro artículo fue el efecto diferencial del polimorfismo ApoA-IV sobre el tamaño de partícula LDL. La prevalencia de sujetos con un predominio de partículas LDL pequeñas era del 60% en los portadores ApoA-IV<sup>360</sup>(His) urbanos, en comparación con el 29% de los portadores rurales. En contraste, la prevalencia de este rasgo entre los homocigotos ApoA-IV<sup>360</sup>(Gln) fue del 35% en el área urbana en comparación con el 46% en la rural. El predominio de LDL pequeñas está asociada con el riesgo de CP [56, 57] y está producido por la obesidad y por los hábitos sedentarios [58, 59]. Las pruebas preliminares sugieren el ligamiento del fenotipo LDL de pequeño tamaño con la región del grupo génico ApoA-I/C-III/A-IV sobre el cromosoma 11 [60].

Una explicación metabólica interesante es que la relación entre el alelo ApoA-IV<sup>360</sup>(His), bajos niveles de colesterol HDL, LDL pequeñas y CP se

TABLA IV

## Resumen de los modelos transgénicos para estudiar el metabolismo lipídico

Producto génico	Fenotipo transgénico	Fenotipo deficitario
apoA-I	Aumento de HDL Heterogeneidad del tamaño de HDL	Reducción de HDL sin aumento significativo de la aterosclerosis inducida por dieta
apoA-II	Sin efecto sobre los niveles de HDL Eliminación de la protección contra la cardiopatía resultante de la sobreexpresión de A-I	
apoA-IV	Protección contra la aterosclerosis inducida por dieta sin efecto sobre los niveles de HDL	
apoB	Aumento de LDL	Aumento de la letalidad fetal en homocigosis y con protección contra la hiperlipidemia inducida por dieta en heterocigosis
apoC-I	Hipertrigliceridemia	Hiperlipidemia combinada
apoC-II	Hipertrigliceridemia	
apoC-III	Hipertrigliceridemia	Hipotrigliceridemia
apoE	Disminución de los niveles de VLDL y LDL Resistencia a la hipercolesterolemia inducida por dieta	Reducción de la lipemia pos-prandial Hiperlipidemia y aterosclerosis masiva
apo(a)	Aumento de las ApoA. Aumento de la aterosclerosis cuando se combina con transgénicos ApoB	
LCAT	Hiperalfalipoproteinemia	
LPL	Disminución de los niveles de triglicéridos Aumento de la mortalidad perinatal	Aumento de la mortalidad perinatal, los heterocigotos expresan una ligera hipertrigliceridemia
CETP	Reducción del colesterol HDL Aumento de la aterosclerosis en presencia de hipertrigliceridemia	
LDLR	Disminución de los niveles de colesterol	Aumento de los niveles de colesterol

realiza a través de la LCAT, una enzima esencial que esterifica el colesterol HDL, y actúa pronto en el proceso aterogénico del transporte de colesterol inverso. La sustitución Gln<sup>360</sup>→His está localizada dentro de la hélice anfipática que puede intervenir en la unión a los lípidos y la activación de la LCAT. La isoforma ApoA-IV<sup>360</sup>(His) se une a las lipoproteínas con mayor afinidad que la isoforma ApoA-IV<sup>360</sup>(Gln), lo que puede traducirse en un retraso del aclaramiento hepático de los remanentes de quilomicrón como se demuestra en estudios metabólicos [61]. Esta diferencia estructural también podría ser responsable de la menor capacidad de la ApoA-IV 360 (His) para activar la LCAT, en comparación con la ApoA-IV<sup>360</sup>(Gln).

*Ratones transgénicos para la apolipoproteína A-IV.* En un artículo reciente, Duverger y cols. [38] demostraron que la sobreexpresión de la ApoA-IV humana en ratones deficitarios en ApoE propensos a aterosclerosis se traducía en un perfil aterogénico incluso mayor que en los ratones deficitarios para ApoE, sin efectos significativos sobre las

concentraciones de colesterol HDL. Pese a estos hallazgos, los ratones que expresaban la ApoA-IV humana eran más resistentes a la aterosclerosis. Esto era cierto también en el caso de los ratones que no eran deficitarios para el gen ApoE, pero que expresaban la ApoA-IV humana. Estos datos sugieren que la ApoA-IV puede proteger contra la aterosclerosis mediante mecanismos que no implican aumento de concentraciones de colesterol HDL, y puede explicar también la ausencia de aterosclerosis en los ratones ApoA-I-deficitarios [27].

*Apolipoproteína B.* La apolipoproteína B es el principal componente proteico de las LDL y es el ligando que media el reconocimiento de las LDL por su receptor. El gen ApoB tiene una longitud de 43 kD y contiene 29 exones; ha sido cartografiado en la región 2p24-p23 del cromosoma 2 [62, 63]. Puesto que la ApoB es la principal proteína de las LDL y un componente importante de las VLDL, cabría esperar que la variación genética en este locus influyera en los niveles plasmáticos de colesterol o de triglicéridos, o de ambos, así como en la

respuesta a la dieta. Algunos de los sitios polimórficos, como el sitio XbaI, el EcoRI, el MspI y los polimorfismos de inserción/delección (I/D) y 3'-VNTR se han utilizado como marcadores en estudios de población y en estudios de caso control en un intento de correlacionar alelos individuales o haplotipos con niveles lipídicos o con el riesgo de CP. En general el resultado de esos estudios no ha sido unánime (en la Tabla III pueden verse las publicaciones más recientes y en la referencia [64] las primeras que hubo).

El RFLP XbaI es una mutación silenciosa que afecta a la tercera base del codón de la treonina 2488 (ACC→ACT) en el exón 26 [62] y no puede tener un efecto funcional directo. Por consiguiente, cualquier efecto asociado con esta mutación tiene que ser el resultado de un desequilibrio de ligamiento con una mutación funcional hipotética. Este RFLP se ha asociado con la variabilidad en los niveles lipídicos del plasma [65-71]. El alelo que carece del sitio de reconocimiento XbaI (X-) reduce variablemente el colesterol total, el colesterol LDL y los triglicéridos [65-68]. Paradójicamente, se ha encontrado que este mismo alelo X- es más común entre los casos de coronariopatía que en los controles [72-74]. Se ha sugerido que la hipotética mutación causal asociada con el polimorfismo XbaI puede tener como consecuencia un cambio estructural en la ApoB que afecta a la egrésión de las LDL procedentes de la pared arterial [75].

En términos de la respuesta de los lípidos plasmáticos a los cambios en la grasa de la dieta, se ha publicado que los sujetos portadores de los genotipos X+X+ o X+X- respondían a una dieta baja en grasa y en colesterol con reducciones mayores del colesterol plasmático total, el colesterol LDL, los niveles de ApoB [76, 77] y, sorprendentemente, los niveles de colesterol HDL [78] que los sujetos con el genotipo X-X-. Como se ha indicado antes, esta mutación específica no tiene como consecuencia un cambio de aminoácidos en el codón afectado.

Se ha encontrado que el polimorfismo I/D de tres codones (Leu-Ala-Leu) dentro del péptido señal de la ApoB [79] está asociado con variación en los niveles de colesterol total y LDL o de triglicéridos, o de las tres cosas, [78, 80-82], así como con el riesgo de cardiopatía [83]; sin embargo, otros investigadores [68, 84] no han confirmado estos efectos. Xu y cols. [85] publicaron que los sujetos con el genotipo I/I tenían los niveles de triglicéridos más elevados y que los sujetos D/D tenían los más bajos, mientras consumían una dieta rica en grasa y en colesterol. Este efecto desapareció cuando los efectos consumían una dieta baja en grasa y en colesterol. Estos resultados no

fueron confirmados por Boerwinkle y cols. [86] en un estudio en el que los sujetos recibieron dos niveles de colesterol alimentario sin modificar la grasa de la dieta. En un estudio más reciente, se encontró que el alelo D está asociado con una reducción de la respuesta lipídica pos-prandial en comparación con los individuos homocigotos para el alelo I, lo que sugiere que esta mutación en el péptido señal puede afectar a la secreción de ApoB durante el estado pos-prandial.

El polimorfismo MspI (CGGG CAGC) en el exón 26 tiene como consecuencia un cambio de aminoácido (Arg<sup>3611</sup>→Gln) [87]. Previamente encontramos una asociación significativa entre el alelo menos común (M2) y la presencia de coronariopatía prematura [64], apareciendo este alelo con una frecuencia casi del doble en la población con coronariopatía (0,105) que en la población control (0,057). Sin embargo, no se observaron asociaciones de este alelo con alteraciones en los niveles de colesterol LDL o ApoB plasmáticos en sujetos con coronariopatía [64]. No se han publicado asociaciones entre este RFLP y variabilidad en la respuesta a la dieta.

El RFLP EcoRI descrito en el axón 29, consiste en una mutación de un par de bases (GAA→AAA), que tiene como consecuencia un cambio de aminoácido de Gln<sup>4514</sup>→Lis. Este RFLP es un desequilibrio de ligamiento con el MspI descrito antes y tiene asociaciones de fenotipo similares.

Una región 3'-VNTR aproximadamente 300 pb distales al extremo 3' del gen ApoB [88-90] se traduce en aproximadamente 16 alelos diferentes. En algunos artículos iniciales se sugería que había una asociación entre un número mayor de repeticiones y un mayor riesgo de cardiopatía [64, 72, 91]. Sin embargo, en otros estudios no se observó dicha asociación [90, 92].

Se ha demostrado que el déficit familiar de ApoB-100 es consecuencia de una mutación Arg<sup>3500</sup> a Gln debido a una transición G-a-A al nucleótido 10.708 en el exón 26 del gen de la ApoB. Los pacientes con esta mutación tienen reducida la capacidad de aclaramiento de la LDL, no porque la actividad de los receptores LDL esté reducida, sino por la estructura defectuosa de la ApoB [93, 94], y su fenotipo es similar a lo observado en la HF. La frecuencia de esta mutación varía de acuerdo con el origen étnico de la población estudiada. En las poblaciones de raza blanca de Norteamérica y de Europa central, la mutación se ha encontrado en 1/500 a 1/700 [95]. Estudios realizados en Europa del sur y del norte, así como en Israel, no demostraron la presencia de esta mutación. Esto es cierto también para las poblaciones no blancas [96, 99].

Además de estas mutaciones en el gen de la ApoB generalmente asociadas con un aumento de los niveles de la ApoB y LDL-C, se han publicado varias mutaciones que se traducen en hipobetalipoproteinemia. Estas mutaciones producen formas truncadas de ApoB que están asociadas con varios trastornos metabólicos diferentes [100-104] y bajos niveles de ApoB-100 y LDL-C en plasma.

*Ratones transgénicos ApoB.* Se han publicado diversos ratones transgénicos ApoB; en algunos de ellos la cantidad de ApoB humana circulante es similar a la encontrada en seres humanos normolipidémicos, y esta ApoB tiende a estar dentro de la región LDL [105-108]. Además, los ARNm de las ApoB-100 humanas son editados con una eficacia similar a la de los ARNm ApoB-100 endógenos de ratón [106]. Se ha publicado que los transgenes dobles que expresan en exceso tanto la ApoB como la CETP muestran distribuciones de colesterol de lipoproteínas similares a las encontradas en humanos normolipidémicos [107].

*Ratones deficientes en ApoB.* El déficit del gen ApoB de ratón produce letalidad embrionaria en homocigosis, pero ofrece protección contra la hipercolesterolemia inducida por la dieta en estado heterocigoto.

Se ha descrito otro modelo en el cual ratones modificados genéticamente expresan la ApoB en hígado, pero no en el intestino. Como cabía esperar, los enterocitos de estos ratones carecían de quilomicrones nacientes y los enterocitos vellosos intestinales estaban llenos de grasa, como parte de gotitas lipídicas citosólicas. Este es un modelo interesante para estudiar los efectos de la ausencia de la formación de quilomicrones y la absorción defectuosa de grasas o de vitaminas liposolubles [109].

**Apolipoproteína C-I.** El gen de la ApoC-I se encuentra en la región q13.2 del cromosoma 19, en un grupo con los genes de la ApoE, C-II y C-IV y el pseudogén C-I. El papel de la ApoC-I no está claro todavía. Se ha publicado un RFLP detectado utilizando HpaI 317 pb arriba de su sitio de iniciación de la transcripción. Este RFLP se ha asociado con disbetalipoproteinemia familiar [110].

*Ratones transgénicos ApoC-I.* La sobreexpresión de la ApoC-I humana se ha asociado con una hiperlipidemia combinada. No pudo detectarse otra anomalía bioquímica lipídica asociada con la expresión de la ApoC-I humana en este modelo animal [111, 112].

*Déficit de ApoC-I.* Los ratones deficientes para la ApoC-I tienen una mayor respuesta hipercolesterolemica a la alimentación con colesterol [113]. Las inactivaciones de la ApoE y la ApoC-I mediante dos rondas consecutivas con orientación génica se tradujeron en ratones que eran también muy hipercolesterolemicos [114] y descubrieron aspectos interesantes de la regulación coordinada de la expresión génica para esos dos genes.

**Apolipoproteína C-II.** La apolipoproteína C-II consiste en una cadena sencilla de 79 aminoácidos. El gen se ha localizado en la misma región cromosómica que la ApoC-I y la ApoE (19q13.2). La ApoC-II es un cofactor para la activación de la lipoproteína-lipasa. La importancia de esta proteína en el metabolismo proteico se demostró en varios linajes carentes de la ApoC-II. El primer caso de déficit de esta apolipoproteína fue publicado por Breckenridge y cols. [115]. Se trataba de un hombre de 59 años que tenía los triglicéridos muy elevados y un dolor epigástrico crónico. Desde entonces, se han publicado al menos 11 diferentes casos en todo el mundo, que han sido revisados previamente en esta revista [116]. Los fenotipos clínicos y bioquímicos asociados con la ausencia de ApoC-II son similares a los observados para el déficit de LPL. La reducción drástica de grasa hasta menos del 15% suele normalizar los niveles de triglicéridos. Los heterocigotos no tienen alterados los perfiles de lipoproteínas, pese a la reducción de los niveles de ApoC-II.

Se ha publicado en este locus un RFLP común detectado con la TaqI, pero no se ha observado asociación con alteración de los niveles lipídicos. Además, también se han cartografiado en este locus génico varias repeticiones de dinucleótidos o VNTR [117-119].

*Ratones transgénicos ApoC-II.* La ApoC-II es un activador de las LPL y, por consiguiente, cabría esperar que su expresión excesiva estuviera asociada con una disminución de los niveles de triglicéridos. Paradójicamente, esos animales desarrollaron una hipertrigliceridemia similar a la observada para los transgénicos ApoC-III [120]. Las VLDL de esos animales eran también pobres en ApoE y tenían un retraso de su aclaramiento, lo que sugiere un deterioro de la interacción con las lipasas y los receptores de superficie celular. Estos datos sugieren que tanto el déficit como la sobreexpresión de esta apolipoproteína están asociados con un fenotipo hipertrigliceridémico.

**Apolipoproteína C-III.** La ApoC-III plasmática es un componente de los quilomicrones, las VLDL y las HDL. *In vitro*, la ApoC-III inhibe la LPL [121],

y también la unión de las lipoproteínas que contienen ApoE al receptor de las LDL, pero no al receptor LRP [122, 123]. De acuerdo con la observación *in vitro*, la sobreexpresión del gen de la ApoC-III humana en ratones transgénicos tuvo como consecuencia una intensa hipertrigliceridemia [124]. El gen de la ApoC-III abarca 3,2 kb y está estrechamente ligado a los genes de la ApoA-I y la ApoA-IV en el brazo largo del cromosoma 11 (región 11q13) [4]. Se han descrito dos mutaciones raras con déficit intensa de ApoC-III [5-7]. Se ha descrito una rara mutación puntual (Lys<sup>58</sup>→Glu) asociada con una reducción de la expresión de la ApoC-III y un aumento de los niveles de colesterol HDL y de apolipoproteína A-I [125]. También se han descrito en este locus varios RFLP. En alelo S2 del RFLP SstI 3' al gen de la ApoC-III se ha asociado en algunos estudios con hipertrigliceridemia y aumento del riesgo de coronariopatía [126-128]. También se ha asociado un RFLP PvuII localizado en el primer intrón del gen de la ApoC-III con una variación en los niveles de colesterol HDL. Estudios recientes han demostrado que la presencia de cinco polimorfismos ADN (C<sup>-641</sup>→A, G<sup>-630</sup>→A, T<sup>-625</sup>→delección, C<sup>-482</sup>→T y T<sup>-455</sup>→C) en la región promotora de este gen en un sujeto con hiperlipidemia de tipo III [129]. Esas mutaciones estaban en fuerte desequilibrio del ligamiento con el sitio Sst I en la región 3' no traducida [129, 130]. Estudios preliminares en los que se cartografió un elemento de respuesta a la insulina en un fragmento largo de 42 nucleótidos localizado entre -490 y -449 en relación con el punto de inicio de la transcripción y estudios *in vitro* demostraron que la actividad transcripcional del gen de la ApoC-III estaba sometido a una regulación descendente por la insulina sólo en los casos en que se portaba el promotor de tipo silvestre, pero no en los que contenían las variantes C<sup>-482</sup>→T y T<sup>-455</sup>→C [130, 131]. Estos resultados pueden proporcionar la base molecular para comprender el aumento de los niveles de ApoC-III que se encuentra en sujetos portadores del alelo S2 y su asociación con la hipertrigliceridemia. En nuestros propios estudios hemos demostrado que después de un aumento de ácidos grasos monoinsaturados en la dieta, los sujetos S1S1 respondían con aumento no significativo de los niveles de colesterol LDL, mientras que los sujetos S1S2 experimentaban una disminución significativa [132]. Otros investigadores [133] han publicado una asociación significativa entre el grado de respuesta del colesterol LDL y los cambios en la grasa de la dieta, y este locus. Estos datos sugieren que el locus de la ApoC-III interviene en la capacidad de respuesta del colesterol LDL a la grasa de la dieta.

*Ratones transgénicos para la ApoC-III.* La expresión excesiva de ApoC-III humana en ratones se tradujo en niveles elevados de triglicéridos, compatibles con el papel inhibitorio de la LPL asociado con esta apolipoproteína [134-136]. La correlación inversa observada en humanos entre niveles elevados de triglicéridos y niveles bajos de colesterol HDL también se reprodujo en este modelo animal, y se debió a una disminución del éster de colesterol HDL y la producción de ApoA-I. En relación con el efecto hipertrigliceridémico, estos animales tenían VLDL grandes ricas en triglicéridos con un enriquecimiento del componente ApoC-III y una disminución de la ApoE. Las consecuencias metabólicas de la sobreexpresión de la ApoC-III parece consistir en una disminución FCR VLDL y un aumento de producción de triglicéridos VLDL sin un incremento paralelo de la producción de ApoB. Esto es compatible con la disminución esperada de la lipólisis *in vivo*, que es consecuencia de la alteración de la composición de la apolipoproteína.

*Déficit de ApoC-III.* Los animales mutantes homocigotos para el déficit del gen de la ApoC-III mostraban una expresión normal de los genes vecinos ApoA-I y ApoA-IV en el hígado, pero su expresión estaba reducida en el intestino, lo que sugiere que estos genes comparten un elemento tisular específico para su expresión intestinal [137]. Los niveles plasmáticos en ayunas de TG se redujeron en un 70%. Los niveles plasmáticos del colesterol total y de HDL-C eran ligeramente inferiores a los de los ratones normales. Después de una comida rica en grasas, los animales deficitarios no mostraron la lipemia pos-prandial típica debido a una aceleración del aclaramiento de quilomicrones. Este modelo animal confirma los experimentos *in vitro* previos que demostraron la importancia de la ApoC-II en la modulación del catabolismo de los TRL.

**Apolipoproteína E.** La ApoE en suero está asociada con los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sirve como ligando para el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la proteína relacionada con el receptor de las LDL (LRP) [138, 139]. El déficit de ApoE en humanos está asociado con la acumulación de lipoproteínas ricas en colesterol de densidad <1,006 g/ml que contienen ApoB-48 y ApoA-IV, así como ApoB-100 [140], pero esos efectos son mucho menos notables que los observados en los ratones deficitarios para ApoE [141-143]. Estos datos apoyan el concepto de que la ApoE es importante para el aclaramiento de estas partículas lipoproteicas. La variación genética en el locus

ApoE se produce a partir de tres alelos comunes en la población, E\*4, E\*3 y E\*2, con frecuencias en las poblaciones de raza blanca de aproximadamente 0,150, 0,769 y 0,08, respectivamente [144]. Además de esos alelos comunes, se han publicado un gran número de variantes menos comunes y algunos de ellos se han asociado con disbetalipoproteinemia familiar [145, 146]. En los estudios de población se ha demostrado que el colesterol plasmático, el colesterol LDL y los niveles de ApoB son los más altos en sujetos portadores de la isoforma ApoE-4, intermedia en los que tienen la isoforma ApoE-3 y la menor en los que tienen la isoforma ApoE-II [147-153]. Esta relación entre los niveles de colesterol LDL y la variación genética en la ApoE no es independiente de factores ambientales y étnicos. La asociación de la isoforma ApoE-4 con niveles elevados de colesterol sérico parece ser una interacción sérica [5, 62, 86, 154-168]. En algunos estudios se han publicado respuestas de lípidos plasmáticos mayores en sujetos portadores del alelo ApoE-4 [154, 155, 157, 159-162, 164], mientras que en otros no se consiguió demostrar dicha respuesta [86, 155, 156, 158, 163, 165-169]. Nosotros hemos publicado previamente un metaanálisis de los datos obtenibles. Nuestros análisis demuestran que el alelo ApoE-4 estaba asociado con una hiperrespuesta en los estudios en los que se incluyeron fases alimenticias con diferentes cantidades de grasa en la dieta, pero esta asociación no se puso de manifiesto en los estudios en los que el colesterol alimenticio era diferente entre las fases. Se han llevado a cabo pocos estudios en los que se examine el efecto del gen de la ApoE sobre los cambios en la saturación de las grasas de la dieta; sin embargo, esos estudios no demuestran efecto alguno o demuestran un efecto inverso (es decir, una hiperrespuesta asociada con el alelo E-4). Debe observarse que sólo 5 de los 16 estudios examinados en nuestro metaanálisis pueden tener potencia estadística suficiente para demostrar un efecto significativo relacionado con la ApoE. Además, hay importantes diferencias entre estos estudios que podrían explicar algunas de las discrepancias observadas. Por tanto, los estudios dependientes de diferente mecanismo pueden ser específicos para partículas LDL grandes. Por consiguiente, la distribución basal de las partículas LDL desempeñará también un papel significativo en el resultado de los diferentes estudios, y esta variable debe controlarse en los estudios futuros. Además, Lehtimaki y cols. [170] han demostrado que la asociación entre los lípidos séricos y el fenotipo de la apolipoproteína E se ve influido por la dieta en una muestra de población de niños y adultos jóvenes. En otros estudios se ha

examinado el efecto de los fenotipos ApoE en relación con la respuesta LDL-C interindividual a varios tipos o cantidad de fibra en la dieta [171-174]. En general, dichos estudios demuestran que la respuesta hipocolesterolemica asociada con la ingestión de fibra es menos significativa en los portadores de ApoE-4 que en otros sujetos. Se han propuesto varios mecanismos para explicar estas diferencias relacionadas con la ApoE en la respuesta individual al tratamiento alimentario. En algunos estudios se ha demostrado que la absorción de colesterol intestinal está relacionada con el fenotipo de apolipoproteína E [159, 172, 175, 176], absorbiendo más colesterol los portadores de ApoE-4 que los no portadores. También pueden intervenir otros mecanismos como la producción de ApoB LDL, la síntesis de ácidos biliares y colesterol, y el aclaramiento pos-prandial de lipoproteínas [177, 178].

*Ratones transgénicos para la ApoE.* Se observó que los ratones transgénicos para la ApoE tienen expresión de la ApoE en el riñón pero no en el hígado, su principal órgano de síntesis. Estas observaciones indujeron hallazgos muy interesantes sobre sus elementos reguladores específicos de tejido [179]. Por tanto, una región de control específica del hepatocito dirige la expresión tanto de la ApoE como de la ApoC-I [180]. Además de la ApoE normal, se han desarrollado varias cepas que contienen otras variantes genéticas de la ApoE. Los ratones transgénicos portadores del gen de la ApoE-3 (Leiden) desarrollan una hiperlipoproteinemia similar a la observada en portadores humanos y una aceleración de la aterosclerosis inducida por la dieta [111, 181]. Se publicaron resultados similares con relación a la ApoE (Arg-112, Cys-142) [182]. Se ha demostrado que la expresión de la ApoE humana en ratones diabéticos previene el desarrollo de hiperlipidemia [183]. El efecto de la sobreexpresión de la ApoE sobre la aterosclerosis podría ser tejido-dependiente y esto se está investigando todavía.

*Déficit de ApoE.* El déficit de la apolipoproteína E se traduce en un fenotipo notable en ratones y ha proporcionado un modelo animal interesante de la aterosclerosis. A diferencia de las cepas de ratón sensibles a la aterosclerosis, los ratones deficitarios en ApoE desarrollan aterosclerosis aun cuando se alimenten con una dieta sana. El perfil lipídico es muy aterogénico con valores de 400-500 mg/dL después de una dieta normal y de 1.800 mg/dL después de una dieta rica en grasas (la mayoría de ella en las VLDL y las IDL) [141, 142, 184]. Estos efectos pueden corregirse en parte cruzando los ratones deficitarios en ApoE con transgénicos ApoA-I [185].

**Lipoproteína (a).** La lipoproteína (a), descrita en un principio por Berg, es una partícula parecida a la LDL con una proteína adicional conocida como Apo(a) fijada a la mitad ApoB mediante uno o varios puentes disulfuro. La Apo(a) es una molécula grande que contiene duplicaciones de kringles como los encontrados en el plasminógeno. El tamaño de la apolipoproteína (a) varía a lo largo de un intervalo de unos 500 kD debido a diferencias interalélicas en el número de repeticiones en tandem de kringle 4. En varios estudios se han demostrado hasta 34 isoformas diferentes [186]. El gen está en ligamiento estrecho con el locus del plasminógeno en 6q27. Hay una amplia abanico de concentraciones Lp(a), tanto entre poblaciones como dentro de ellas. Se ha calculado que el gen de la Apo(a) es responsable de alrededor del 91% de la variación de las concentraciones plasmáticas de Lp(a). El número de repeticiones de kringle 4 explica el 69% de la varianza, mientras que otros factores (como las secuencias cis-actuantes) pueden explicar el otro 22% de la variabilidad. En varios estudios se ha demostrado ya una asociación positiva entre las concentraciones plasmáticas de Lp(a) y el riesgo de cardiopatía [187, 188]. Además de la variabilidad genética debida al número variable de repeticiones kringle 4, se han detectado otras variantes dentro de este locus, entre ellas una mutación puntual simple (Trp72→Arg) en el kringle 4-37 asociado con un defecto de unión de la lisina en la Lp(a) [189].

*Ratones transgénicos para la Lp(a).* Se ha publicado una línea de ratón que expresa la Apo(a) humana que contiene 17 repeticiones en tandem. A diferencia de la expresión de la Apo(a) en humanos que tiene lugar predominantemente en el hígado, en esos animales hay pruebas de expresión de la Apo(a) en todos los tejidos analizados. La Apo(a) no se une a la LDL de ratón y la mayoría de ella se recupera en el plasma libre de lipoproteínas [190]. Para desarrollar un modelo más fisiológico, se desarrolló un ratón que expresaba la ApoB-100 humana. El cruce de transgenes Apo(a) y ApoB produjo ratones transgénicos Apo(a)/ApoB [191, 192]. Se ha estudiado la influencia de la expresión de la Apo(a) sobre el desarrollo de bandas grasas. Los resultados son contradictorios y quizá haya diferencias sexuales en la respuesta [193, 194].

**Lipoproteína-lipasa.** La LPL es una enzima liberable por la heparina, ligada a los componentes glucosaminoglucanos del endotelio capilar. Desempeña un papel clave en el metabolismo de las lipoproteínas, catalizando la hidrólisis de los enlaces éster 1,3 de los triglicéridos en los quilo-

micrones y las VLDL. La forma activa de la LPL está constituida por dos subunidades idénticas, cada una de aproximadamente 60.000 Daltons y requiere como cofactor a la ApoC-II, mientras que la ApoC-III actúa como un inhibidor. La LPL se sintetiza en el tejido adiposo y muscular, así como en los macrófagos. El gen para la LPL se ha localizado en el brazo corto del cromosoma 8. Abarca unas 30 kb y contiene 10 exones. Se han publicado unas 50 mutaciones diferentes dentro del gen LPL en sujetos con déficit familiar de LPL. La frecuencia de este fenotipo es de aproximadamente uno en un millón, pero varía de manera considerable de unas poblaciones a otras. Se calcula que la frecuencia de portadores de mutaciones LPL asociadas con déficit familiar de LPL es de alrededor de 1 por cada 500 sujetos. Se han publicado varios RFLP comunes en este locus, entre ellos el PvuII en el intrón comprendido entre los exones 6 y 7, un HindIII localizado en el intrón comprendido entre los exones 8 y 9 y una transversión C-a-G en el nucleótido 1595 de la secuencia ADNC. A diferencia de los RFLP PvuII y HindIII, la última mutación altera la estructura de la proteína y se traduce en la producción de una proteína truncada (Ser447-parada) [195]. En estudios de población, se ha encontrado que estas variantes están asociadas con variabilidad en los niveles de lípidos plasmáticos y también con la intensidad de la aterosclerosis coronaria. También se ha publicado una fuerte asociación entre el RFLP HindIII y la variabilidad de la respuesta lipídica al cambiar de una dieta rica en grasas saturadas a una dieta pobre en grasas saturadas [133]. Recientemente se ha publicado que otras mutaciones relativamente comunes en este locus están asociadas con trastornos ligeros de los perfiles lipídicos. Por tanto, se ha encontrado que una mutación de cambio de sentido (Asn291 Ser) en el exón 6 está enriquecida en poblaciones con hiperlipidemia combinada familiar [196, 197] y bajos niveles de C-HDL [198], así como con la alteración pos-prandial de los triglicéridos de quilomicrones y de la respuesta retinil-palmitato en portadores normolipídicos [199]. Otra variante (Asp9 Asn) se ha asociado con niveles elevados de TG y con una mayor progresión de la aterosclerosis coronaria [200-202].

*Ratones transgénicos lipoproteína-lipasa.* La expresión excesiva específica del músculo del gen humano de la LPL en ratones se tradujo en una disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos, de la resistencia a la elevación lipídica inducida por la dieta [203], a un aumento de la captación de ácidos grasos libres por el tejido muscular,

de la pérdida de peso y de las muertes prematuras. Además, los animales desarrollaron una miopatía intensa [204]. Otras cepas tuvieron una mortalidad perinatal elevada que pudo ser invertida alimentando a las madres con dietas ricas en grasa [205], lo que sugiere que la elevada mortalidad puede deberse al agotamiento de los nutrientes lipídicos esenciales. Estas observaciones destacan la importancia de la expresión perfectamente regulada de la LPL.

*Déficit de lipoproteína-lipasa.* Los homocigotos deficitarios para la LPL tienen al nacer concentraciones de TG triples que los controles y de C-VLDL siete veces mayores que los controles. Cuando se les permite mamar, estos ratones se vuelven cianóticos y mueren al cabo de 18 horas de nacer. Los ratones heterocigotos sobreviven hasta la vida adulta y expresan una ligera hiperlipidemia [206].

*Proteína colesterol-éster transferasa.* La proteína colesterol-éster transferasa (CETP) media el intercambio de los constituyentes nucleares lipídicos neutros (ésteres de colesterol en triglicéridos) entre las lipoproteínas plasmáticas. La facilitación de la transferencia del éster de colesterol desde las HDL hasta las lipoproteínas ricas en triglicéridos tiene como consecuencia una reducción de los niveles de colesterol HDL, pero la CETP también puede promover el transporte de colesterol inverso. Por esta razón, el efecto general de la expresión de la CETP en la aterogénesis es incierto. El gen se ha localizado en el cromosoma 16 adyacente al gen de la LCAT. Se ha demostrado variabilidad genética en el locus de la CETP utilizando las enzimas TaqI y StuI. Se han identificado dos RFLP diferentes, denominados A y B, utilizando la primera enzima. Las frecuencias de los alelos menos comunes son 0,06 para los RFLP TaqI(A) y de 0,46 para los de la TaqI(B). La enzima StuI identifica un RFLP con una frecuencia de 0,09. El más interesante entre estos polimorfismos parece ser el de la TaqI B. En un estudio llevado a cabo con sujetos normales y sanos, la homocigosidad para la ausencia del punto de corte (TaqI B) se asoció con niveles de C-HDL un 18% mayores que en la homocigosidad para el alelo TaqI B+. No se observó efecto genotípico significativo para otras variables lipídicas, entre ellas los niveles de TG. Se publicó una asociación similar en familias de sujetos con cardiopatía utilizando análisis de pares de hermanos. Sin embargo, utilizando un enfoque similar otros autores no han conseguido demostrar una contribución significativa de locus CETP a los niveles de C-HDL [207].

*Ratones transgénicos para la CETP.* En estudios iniciales en los que se utilizaban ratones transgénicos que expresaban la CETP de simio se demostró una aterosclerosis acelerada en comparación con los que no expresaban esta enzima [208]. En los ratones transgénicos que expresaban el gen de la CETP humana se observó una reducción del colesterol de lipoproteínas de alta densidad [209-212]. La introducción de los genes humanos de la ApoA-I, la ApoC-III y la CETP en ratones transgénicos se tradujo en un fenotipo rico en triglicéridos y bajo en HDL. En todos los animales transgénicos que expresan la CETP se ha demostrado una remodelación de las partículas lipoproteicas. En estudios más recientes se ha demostrado que la presencia de ApoA-I, C-III y CETP humanas en ratones inhibe la aterosclerosis precoz, pero sólo en presencia de hipertrigliceridemia [213].

*Lecitina: colesterol aciltransferasa.* La LCAT desempeña un papel importante en el transporte inverso de colesterol. Esta enzima se sintetiza en el hígado y circula en el plasma unida a las HDL. El colesterol de las células periféricas es transferido a las HDL y esterificado por la acción de las LCAT. Este éster de colesterol se incorpora en el núcleo de la partícula y es eliminado de la circulación por interacción directa de las HDL con el hígado o intercambio con las TRL por acción de la CETP. Cabe esperar que la ausencia de LCAT se traduzca en una disminución de los niveles plasmáticos del éster de colesterol y la acumulación de colesterol libre en los tejidos. Se han publicado más de 18 mutaciones diferentes asociadas con déficit de LCAT. En general, las principales características bioquímicas asociadas con la homocigosidad para el déficit de LCAT son: proteinuria, baja concentración plasmática de ApoA-I y ApoA-II, un nivel elevado de colesterol sérico total, de triglicéridos y de fosfolípidos, bajos niveles de colesterol sérico esterificado y de lisolecitina sérica. Uno de los fenotipos más obvios son los depósitos de lípidos en la córnea y las opacidades corneanas difusas.

*Animales transgénicos para la LCAT.* La expresión excesiva de LCAT en ratones transgénicos induce hiperalfalipoproteinemia, debido a una acumulación del colesterol-éster en las HDL compatible con una intensificación de la esterificación del colesterol libre en las HDL de ratón a través de la LCAT humana [214]. Se han publicado hallazgos similares en conejos transgénicos, y esos animales parecen estar protegidos contra la aterosclerosis inducida por dieta. En este modelo, el catabolismo de las apolipoproteínas *in vivo* está retrasado de una manera dependiente de la dosis génica [215, 216].

**Receptor LDL.** El gen que codifica para el receptor LDL se ha localizado en la región 19p13.1. Se ha encontrado que las mutaciones en este locus son responsables de la hipercolesterolemia familiar y de un trastorno autosómico dominante caracterizado por elevación del C-LDL y la coronariopatía prematura. La frecuencia de homocigosidad se calcula en uno de cada millón, y la frecuencia de heterocigotos en aproximadamente uno de cada quinientos. Se han descrito ya varios centenares de mutaciones diferentes en el gen del receptor LDL y muchas de ellas han sido revisadas con detalle [217, 218]. Además de esas mutaciones asociadas con la HF, se han descrito en este locus varias deleciones muy informativas (heterocigosidad máxima que oscila entre 0,1 y 0,5) [219], mutaciones puntuales [220], repeticiones de dinucleótidos [221] y RFLP [222-230].

*Ratones transgénicos para el receptor LDL.* Se han generado dos líneas de ratones transgénicos para el receptor LDL. En una de ellas, las concentraciones plasmáticas de ApoB y ApoE disminuyeron en más del 90% [231]. En la otra línea, la expresión del gen para el receptor humano LDL en el hígado de ratón fue capaz de impedir por completo la hipercolesterolemia inducida por la dieta en esos ratones [232].

*Ratones con déficit de receptor LDL.* La alteración dirigida del gen del receptor LDL se tradujo en hipercolesterolemia debido fundamentalmente a un aumento de las IDL y las LDL sin cambios en los niveles de LDL [233]. Estos ratones deficitarios para el receptor de las LDL constituyen un buen modelo para la HF humana y se han utilizado ampliamente para generar modelos transgénicos adicionales y para ensayar la terapia de sustitución génica.

### Otros LOCI de genes candidatos

Se han propuesto otros loci de genes candidatos para la regulación del metabolismo lipídico; sin embargo, limitaciones de espacio impiden un tratamiento más detallado de ellos. Enzimas como la lipasa hepática [234], la acil-CoA:colesteril aciltransferasa, la proteína de transferencia triacilglicerol microsómica [235] y varios receptores celulares, como los de la familia de las proteínas relacionadas con el receptor de las LDL (LRP), el receptor de las VLDL [138, 236-239] y SRBI [240, 241] tiene papeles muy importantes en el metabolismo de las lipoproteínas y contribuyen al riesgo genético de aterosclerosis.

### Resumen

La coronariopatía es un trastorno multifactorial en el cual el metabolismo de lipoproteínas desempeña un importante papel, aunque no exclusivo. En esta revisión se han presentado algunas de las bases genéticas de los fenotipos intermedios asociados con los niveles plasmáticos de lípidos. Es obvia la complejidad del estudio de susceptibilidad genética a la aterosclerosis considerando las múltiples interacciones gen-gen y gen-ambiente que son posibles con rasgos tan poligénicos. Conforme se identifiquen más loci génicos y mutaciones seremos capaces de comprender mejor la regulación del metabolismo de lipoproteínas y además podremos identificar en etapas precoces de la vida a los sujetos que están en situación de alto riesgo de desarrollar coronariopatía prematura. Esto facilitará la puesta a punto de estrategias terapéuticas satisfactorias, entre ellas el tratamiento con dieta, con fármacos y, en algunos casos, la terapia génica [242, 243].

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por una subvención (HL 54776) de los Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Mv.

### Bibliografía

1. Fielding C J, Shore V G and Fielding P E . A protein co-factor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Comm* 1972; 46: 1493-1498.
2. Reichl D and Miller N E . Pathophysiology of reverse cholesterol transport: Insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 785-797.
3. Karathanasis S K. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and A-

IV genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6374-6378.

4. Bruns G A, Karathanasis S K and Breslow J L . Human apolipoprotein AI-CIII gene complex is located in chromosome 11. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 97-104.
5. Schaefer E J, Ordovas J M, Law S , et al. Familial apolipoprotein A-I and C-III deficiency, variant II. *J Lipid Res* 1985; 26: 1089-1101.

6. Ordovas J M, Cassidy D K, Civeira F, Bisgaier C L and Schaefer E J . Familial apolipoprotein A-I, C-III and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem* 1989; 264: 16339-16342.
7. Karathanasis S K, Ferris E and Haddad I A . DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV -encoding gene

cluster of certain patients with premature atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7198-7202.

8. Weisgraber K H, Bersot T P, Mahley R W, Francheschini G and Sirtori C R . A-I Milano apoprotein: Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J Clin Invest* 1980; 66: 901-909.
9. Franceschini G, Sirtori C R, Capurso A, Weisgraber K H and Mahley R W . A-I(Milano)

- apoprotein: decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980; 66: 892-900.
10. Weisgraber K H, Rall S C, Jr., Bersot T P, Mahley R W, Franceschini G and Sirtori C R. Apolipoprotein A-I (Milano): detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine to arginine substitution in the variant A-I. *J Biol Chem* 1983; 258: 2508-2513.
11. Sigurdsson G, Jr., Gudnason V, Sigurdsson G and Humphries S E. Interaction between a polymorphism of the Apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and Apo A-I. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1017-1022.
12. López-Miranda J, Ordovas J M, Espino A, et al. Influence of mutation in human apolipoprotein A-I gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Lancet* 1994; 343: 1246-1249.
13. Tuteja R, Tuteja N, Melo C, Casari G and Baralle F E. Transcription efficiency of human apolipoprotein A-I promoter varies with naturally occurring A to G transition. *FEBS Lett* 1992; 304: 98-101.
14. Smith J D, Brinton E A and Breslow J L. Polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate *in vivo* and promoter activity *in vitro*. *J Clin Invest* 1992; 89: 1796-1800.
15. Jeenah M, Kessling A, Miller N and Humphries S E. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. *Mol Biol Med* 1990; 7: 233-241.
16. Angotti E, Mele E, Costanzo F and Avvedimento E V. A polymorphism (G→A transition) in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency. *J Biol Chem* 1994; 269: 17371-17374.
17. Hayek T, Ito Y, Azrolan N, et al. Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) A-I. Presentation of a new animal model and mechanistic studies in human Apo A-I transgenic and control mice. *J Clin Invest* 1993; 91: 1665-1671.
18. Walsh A, Ito Y and Breslow J L. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 6488-6494.
19. Rubin E M, Krauss R M, Spangler E A, Verstuyft J G and Clift S M. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353: 265-267.
20. Chajek-Shaul T, Hayek T, Walsh A and Breslow J L. Expression of the human apolipoprotein A-I gene in transgenic mice alters high density lipoprotein (HDL) particle size distribution and diminishes selective uptake of HDL cholesteryl esters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6731-6735.
21. Khoo J C, Pittman R C and Rubin E M. Selective uptake of HDL cholesteryl esters is active in transgenic mice expressing human apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 1995; 36: 593-600.
22. Hayek T, Oiknine J, Dankner G, Brook J G and Aviram M. HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 721-725.
23. Liu A C, Lawn R M, Verstuyft J G and Rubin E M. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice. *J Lipid Res* 1994; 35: 2263-2267.
24. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996; 94: 713-717.
25. Schultz J R, Verstuyft J G, Gong E L, Nichols A V and Rubin E M. Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature* 1993; 365: 762-764.
26. Williams R R, Hunt S C, Barlow G K, et al. Prevention of familial cardiovascular disease by screening for family history and lipids in youths. *Clin Chem* 1992; 38: 1555-1560.
27. Li H, Reddick R L and Maeda N. Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1814-1821.
28. Scott J, Knott T J, Priestley L M, Robertson M E and Mann D V. High density lipoprotein composition is altered by a common DNA polymorphism adjacent to apoprotein A-II gene in man. *Lancet* 1985; 1: 771-773.
29. Schulte H, Funke H, Frossard P, Coleman R and Assmann G. The MspI RFLP 3' to the human apolipoprotein AII gene is neutral with respect to atherosclerosis in Germans. *Am J Hum Genet* 1986; 39 (Sup): 293.
30. Civeira F, Genest J, Pocioli M, et al. The MspI restriction fragment length polymorphism 3' to the apolipoprotein A-II gene: Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992; 92: 165-176.
31. Weber J L and May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388-396.
32. Schultz J R, Gong E L, McCall M R, Nichols A V, Clift S M and Rubin E M. Expression of human apolipoprotein A-II and its effect on high density lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem* 1992; 267: 21630-21636.
33. Hedrick C C, Castellani L W, Warden C H, Puppione D L and Lusis A J. Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem* 1993; 268: 20676-20682.
34. Warden C H, Hedrick C C, Qiao J -H, Castellani L W and Lusis A J. Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science* 1993; 261: 469-472.
35. Green P H, Glickman R M, Riley J W and Quinet E. Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. *Journal of Clinical Investigation* 1980; 65: 911-919.
36. Goldberg I J, Scherardi C A, Yacoub L K, Saxena U and Bisgaier C L. Lipoprotein apoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1990; 265: 4266-4272.
37. Steinmetz A and Utermann G. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1985; 260: 2258-2264.
38. Duverger N, Treppe G, Cailaud J M, et al. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science* 1996; 273: 966-968.
39. Stein O, Stein Y, Lefevre M and Roheim P S. The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1986; 878: 7-13.
40. Steinmetz A, Barbaras R, Ghalim N, Clavey V, Fruchart J C and Allaud G. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 7859-7863.
41. Weinberg R B and Patton C S. Binding of human apolipoprotein A-IV to human hepatocellular plasma membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1990; 1044: 255-261.
42. Menzel H J, Sigurdsson G, Boerwinkle E, Schrangl-Will S, Dieplinger H and Utermann G. Frequency and effect of human apolipoprotein A-IV polymorphism on lipid and lipoprotein levels in an Icelandic population. *Hum Genet* 1990; 84: 344-346.
43. de Knijff P, Johansen L G, Rosseneu M, Frants R R, Jespersen J and Havekes L M. Lipoprotein profile of a Greenland Inuit population. Influence of anthropometric variables, Apo E and A4 polymorphism, and lifestyle. *Arteriosclerosis & Thrombosis* 1992; 12: 1371-1379.
44. Saha N. Apolipoprotein A-IV polymorphism in Singapore ethnic groups. *Hum Hered* 1991; 41: 47-52.
45. Akiyama K. Population study of apolipoprotein A-IV polymorphism and report of a new variant in Japanese. *Hum Hered* 1989; 39: 302-304.

46. Kamboh M I, Williams E R, Law J C , et al. Molecular basis of a unique African variant (A-IV 5) of human apolipoprotein A-IV and its significance in lipid metabolism. *Genet Epidemiol* 1992; 9: 379-388.
47. Bai H, Saku K, Liu R, Funke H, Von Eckardstein A and Arakawa K . Polymorphic site study at codon 347 of apolipoprotein A-IV in a Japanese population. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expression* 1993; 1174: 279-281.
48. Von Eckardstein A, Funke H, Schulte M, Erren M, Schulte H and Assmann G . Nonsynonymous polymorphic sites in the apolipoprotein (apo) A-IV gene are associated with changes in the concentration of apo B- and apo A-I-containing lipoproteins in a normal population. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1115-1128.
49. Kaprio J, Ferrell R E, Kottke B A, Kamboh M I and Sing C F. Effects of polymorphisms in apolipoproteins E, A-IV, and H on quantitative traits related to risk for cardiovascular disease. *Arteriosclerosis & Thrombosis* 1991; 11: 1330-1348.
50. Kamboh M I, Hamman R F, Iyengar S, Aston C E and Ferrell R E . Apolipoprotein A-IV polymorphism, and its role in determining variation in lipoprotein-lipid, glucose and insulin levels in normal and non-insulin-dependent diabetic individuals. *Atherosclerosis* 1991; 91: 25-34.
51. Eichner J E, Kuller L H, Ferrell R E and Kamboh M I . Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles: II. Apolipoprotein A-IV and quantitative lipid measures in the healthy women study. *Genet Epidemiol* 1989; 6: 493-499.
52. Campos H, López-Miranda J, Rodríguez C, Albajar M, Schaefer E J and Ordovas J M. Reduced HDL cholesterol and small LDL particle size in subjects with the apolipoprotein A-IV-2 phenotype living in an urban as compared to a rural area. *Circulation* 1995; 92: 1743.
53. Campos H, López-Miranda J, Rodríguez C, Albajar M, Schaefer E J and Ordovas J M. Urbanization elicits a more atherogenic lipoprotein profile in carriers of the apolipoprotein A-IV-2 allele compared to A-IV-1 homozygotes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 (in press).
54. Menzel H J, Boerwinkle E, Schrangl-Will S and Utermann G . Human apolipoprotein A-IV polymorphism: frequency and effect on lipid and lipoprotein levels. *Hum Genet* 1988; 79: 368-372.
55. Ehnholm C, Tenkanen H, de Knijff P , et al. Genetic polymorphism of apolipoprotein A-IV in five different regions of Europe. Relations to plasma lipoproteins and to history of myocardial infarction: The EARS study. *Atherosclerosis* 1994; 107: 229-238.
56. Jeserich M, Münzel T, Just H and Drexler H . Reduced plasma L-arginine in hypercholesterolaemia. *Lancet* 1992; 339: 561.
57. Krauss R M. Dense low density lipoproteins and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 75: 53B-57B.
58. Campos H, Willett W C, Peterson R M , et al. Nutrient intake comparisons between Framingham and rural and urban Puriscal, Costa Rica: Associations with lipoproteins, apolipoproteins, and low density lipoprotein particle size. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1089-1099.
59. Campos H, Dreon D M and Krauss R M . Associations of hepatic and lipoprotein lipase activities with changes in dietary composition and low density lipoprotein subclasses. *J Lipid Res* 1995; 36: 462-472.
60. Rotter J I, Bu X, Cantor R M, et al. Multiple genes determine LDL particle size phenotype in coronary artery disease families. *Circulation* 1994; 90: I-509 (Abstract).
61. Rader D J, Schäfer J, Lohse P , et al. Rapid in vivo transport and catabolism of human apolipoprotein A-IV-1 and slower catabolism of the ApoA-IV-2 isoprotein. *J Clin Invest* 1993; 92: 1009-1017.
62. Blackhart B D, Ludwig E M, Pierotti V R , et al. Structure of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem* 1986; 261: 15364-15367.
63. Law S, Lackner K J, Hospattanakar A V , et al. Human apolipoprotein B-100: cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8340-8344.
64. Genest J J, Ordovas J M, McNamara J R , et al. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1990; 82: 7-17.
65. Law A, Wallis S C, Powell L M , et al. Common DNA polymorphism within coding sequence of apolipoprotein B gene associated with altered lipid levels. *Lancet* 1986; 1: 1301-1302.
66. Berg K. DNA polymorphism at the apolipoprotein B locus is associated with lipoprotein level. *Clin Genet* 1986; 30: 515-520.
67. Paulweber B, Friedl W, Krempler F, Humphries S E and Sandhofer F . Association of DNA polymorphism at the apolipoprotein B gene locus with coronary heart disease and serum very low density lipoprotein levels. *Arteriosclerosis*, 1990; 10: 17-24.
68. Peacock R, Dunning A, Hamsten A, Tornvall P, Humphries S and Talmud P . Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: A study of young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. *Atherosclerosis* 1992; 92: 151-164.
69. Hansen P S, Klausen I C, Lemming L, Gerdes L U, Gregersen N and Faergeman O . Apolipoprotein B gene polymorphisms in ischemic heart disease and hypercholesterolemia: effects of age and sex. *Clin Genet* 1994; 45: 78-83.
70. Porkka K V K, Taimela S, Kontula K , et al. Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apoB, apoA-I/CIII and apo E loci on serum lipids: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Genet* 1994; 45: 113-121.
71. Peacock R E, Hamsten A, Johansson J, Nilsson-Ehle P and Humphries S E . Associations of genotypes at the apolipoprotein AI-CIII-AIV, apolipoprotein B and lipoprotein lipase gene loci with coronary atherosclerosis and high density lipoprotein subclasses. *Clin Genet* 1994; 46: 273-282.
72. Hegele R A, Huang L S and Herbert P N . Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *N Engl J Med* 1986; 315: 1509-1515.
73. Monsalve M V, Young R, Jobsis J , et al. DNA polymorphism of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1988; 70: 123-129.
74. Myant N B, Gallagher J, Barbir M, Thompson G R, Wile D B and Humphries S E . Restriction fragment length polymorphism in the apo B gene in relation to coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1989; 71: 193-201.
75. Bohn M and Berg K . The XbaI polymorphism at the apolipoprotein B locus and risk of atherosclerotic disease. *Clin Genet* 1994; 46: 77-79.
76. Tikkanen M J, Xu C -F, Hamalainen T , et al. XbaI Polymorphism of the apolipoprotein B gene influences plasma lipid response to diet intervention. *Clin Genet* 1990; 37: 327-334.
77. Talmud P J, Boerwinkle E, Xu C , et al. Dietary intake and gene variation influence the response of plasma lipids to dietary intervention. *Genet Epidemiol*, 1992; 9: 249-260.
78. Xu C -F, Tikkanen M J, Butler R , et al. Apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is associated with Ag epitopes and involved in the determination of serum triglyceride levels. *J Lipid Res*, 1990; 31: 1255-1261.
79. Boerwinkle E and Chan L . A three codon insertion/deletion polymorphism in the signal peptide region of the human apolipoprotein B gene directly typed by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17: 4003.
80. Renges H -H, Wile D B, McKeigue P M, Marmot M G and Humphries S E . Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. *Atherosclerosis* 1991; 91: 267-275.
81. Visvikis S, Cambou J P, Arveiler D , et al. Apolipoprotein B signal peptide polymorphism in patients with myocardial infarction and controls. "The ECTIM study". *Hum Genet* 1993; 90: 561-565.
82. Saha N, Tay J S H and Chew L S . Influence of apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism on serum lipids and apoli-

- poproteins in a Chinese population. *Clin Genet* 1992; 41: 152-156.
83. Hixson J E, McMahan C A, McGill H C, Jr., Strong J P and PDAY Research Group. Apo B insertion/deletion polymorphisms are associated with atherosclerosis in young black but not young white males. *Arterioscler Thromb*, 1992; 12: 1023-1029.
84. Bohn M, Bakken A, Eriksen J and Berg K. The apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is not associated with myocardial infarction in Norway. *Clin Genet* 1994; 45: 255-259.
85. Xu C -F, Boerwinkle E, Tikkanen M J, Huttunen J K and Humphries S E. Genetic variation at the apolipoprotein gene loci contribute to response of plasma lipids to dietary change. *Genet Epidemiol*, 1990; 7: 261-275.
86. Boerwinkle E, Brown S A, Rohrbach K, Gotto A M, Jr. and Patsch W. Role of apolipoprotein E and B gene variation in determining response of lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels to increased dietary cholesterol. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 1145-1154.
87. Huang L S, de Graaf J and Breslow J L. Apo B gene RFLP in exon 26 changes amino acid 3611 from Arg to Gln. *J Lipid Res*, 1988; 29: 63.
88. Knott T J, Pease R, Powell L, et al. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature*, 1986; 323: 734-738.
89. Huang L S and Breslow J L. A unique AT-rich hypervariable minisatellite 3' to the apo B gene defines a high information restriction fragment length polymorphism. *J Biol Chem* 1987; 262: 8952-8955.
90. Lathrop G M, Ott J, Lalouel J M and Julien C. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3443-3446.
91. Friedl W, Ludwig E H, Paulweber B, Sandhofer F and McCarthy B. Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls. *J Lipid Res*, 1990; 31: 659-665.
92. Heliö T, Ludwig E H, Palotie A, et al. Apolipoprotein B gene 3' hypervariable region polymorphism and myocardial infarction in dyslipidemic Finnish men participating in a primary prevention trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 1991; 1: 178-182.
93. Innerarity T L, Weisgraber K H, Arnold K S, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987; 84: 6919-6923.
94. Vega G L and Grundy S M. Occurrence of species of low-density lipoprotein with defective clearance in patients with primary moderate hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 1992; 232: 405-413.
95. Rauh G, Keller C, Korman b, et al. Familial defective apolipoprotein B100: Clinical characteristics of 54 cases. *Atherosclerosis* 1992; 92: 233-241.
96. Friedlander Y, Dann E J and Leitersdorf E. Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Israeli patients with dominantly inherited hypercholesterolemia and in offspring with parental history of myocardial infarction. *Hum Genet* 1993; 91: 299-300.
97. Tybjærg-Hansen A. Rare and common mutations in hyperlipidemia and atherosclerosis—With special reference to familial defective apolipoprotein B-100. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55 Suppl. 220: 57-76.
98. Tybjærg-Hansen A and Humphries S E. Familial defective apolipoprotein B-100: A single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1992; 96: 91-107.
99. Tybjærg-Hansen A, Gallagher J, Vincent J, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: detection in the United Kingdom and Scandinavia, and clinical characteristics of ten cases. *Atherosclerosis* 1990; 80: 235-242.
100. Welty F K, Ordovas J, Schaefer E J, Wilson P W F and Young S G. Identification and molecular analysis of two ApoB gene mutations causing low plasma cholesterol levels. *Circulation* 1995; 92: 2036-2040.
101. Aguilar-Salinas C A, Barrett P H R, Parhofer K G, et al. Apolipoprotein B-100 production is decreased in subjects heterozygous for truncations of apolipoprotein B. *Arterioscler Thromb*, 1995; 15: 71-80.
102. Young S G, Pullinger C R, Zysow B R, et al. Four new mutations in the apolipoprotein B gene causing hypobetalipoproteinemia, including two different frameshift mutations that yield truncated apolipoprotein B proteins of identical length. *J Lipid Res*, 1993; 34: 501-507.
103. Linton M F, Farese R V, Jr. and Young S G. Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*, 1993; 34: 521-542.
104. Srivastava N, Noto D, Aversa M, et al. A new apolipoprotein B truncation (apo B-43.7) in familial hypobetalipoproteinemia: Genetic and metabolic studies. *Metabolism*, 1996; 45: 1296-1304.
105. Xiong W, Zsigmond E, Gotto A M, Jr., Reneker L W and Chan L. Transgenic mice expressing full-length human apolipoprotein B-100. Full-length human apolipoprotein B mRNA is essentially not edited in mouse intestine or liver. *J Biol Chem* 1992; 267: 21412-21420.
106. Chiesa G, Johnson D F, Yao Z, et al. Expression of human apolipoprotein B100 in transgenic mice. Editing of human apolipoprotein B100 mRNA. *J Biol Chem* 1993; 268: 23747-23750.
107. Grass D S, Saini U, Felkner R H, et al. Transgenic mice expressing both human apolipoprotein B and human CETP have a lipoprotein cholesterol distribution similar to that of normolipidemic humans. *J Lipid Res*, 1995; 36: 1082-1091.
108. McCormick S P A, Ng J K, Véniant M, et al. Transgenic mice that overexpress mouse apolipoprotein B - Evidence that the DNA sequences controlling intestinal expression of the apolipoprotein B gene are distant from the structural gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 11963-11970.
109. Farese R V, Jr., Ruland S L, Flynn L M, Stokowski R P and Young S G. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1774-1778.
110. Smit M, de Knijff P, Sijts A, Klases E C, Frants R R and Havekes L M. Rare apolipoprotein E variant cosegregating with a unique apoE-C1-C2 haplotype. *Hum Hered*, 1988; 38: 277-282.
111. Jong M C, Dahlmans V E H, Van Gorp P J J, et al. Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E\*3Leiden and human apolipoprotein C1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996; 16: 934-940.
112. Shachter N S, Ebara T, Ramakrishnan R, et al. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest* 1996; 98: 846-855.
113. Van Ree J H, Hofker M H, Van den Broek W J A A, et al. Increased response to cholesterol feeding in apolipoprotein C1-deficient mice. *Biochem J*, 1995; 305: 905-911.
114. Van Ree J H, Van den Broek W J A, Van der Zee A, et al. Inactivation of ApoE and Apoc1 by two consecutive rounds of gene targeting: Effects on mRNA expression levels of gene cluster members. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1403-1409.
115. Breckenridge W C, Little J A, Steeiner G, Chow A and Poapst M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. *N Engl J Med* 1978; 298: 1265-1273.
116. Ordovas J M. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins: Genetic mutations associated with its pathology. *Cardiovasc Risk Factors*, 1993; 3: 1-8.
117. Hegele R A and Tu L. Variation within intron 3 of the apolipoprotein CII gene. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 3162.
118. Humphries S E, Jowett N I, Williams L, et al. A DNA polymorphism adjacent to the human apolipoprotein C-II gene. *Mol Biol Med* 1983; 1: 463-471.
119. Weber J L, Wang Z, Hansen K, et al. Evidence for human meiotic recombination interference obtained through construction of a short tandem repeat-polymorphism linkage map of chromosome 19. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1079-1095.

120. Shachter N S, Hayek T, Leff T, et al. Overexpression of apolipoprotein CII causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *J Clin Invest* 1994; 93: 1683-1690.
121. Wang C S, McConathy W J, Kloer H U and Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by lipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 1985; 75: 384-390.
122. Weisgraber K H, Mahley R W, Kowal R C, Herz J, Goldstein J L and Brown M S. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 22453-22459.
123. Kowal R C, Herz J, Weisgraber K H, Mahley R W, Brown M S and Goldstein J L. Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor related protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 10771-10779.
124. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A and Breslow J L. Hypertriglyceridemia as a result of human apoCIII gene expression in transgenic mice. *Science*, 1990; 249: 790-793.
125. Von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H and Assmann G. Apolipoprotein C-III(Lys58—Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest* 1991; 87: 1724-1731.
126. Ferns G A A, Ritchie C, Stocks J and Galton D J. Genetic Polymorphisms of apolipoprotein C-III and Insulin in survivors of myocardial infarction. *Lancet*, 1985; 2: 300-303.
127. Ordovas J M, Civeira F, Genest J J, et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus: Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991; 87: 75-86.
128. Ordovas, J.M., Civeira, F., Garces, C. and Pocovi, M. Genetic variation at the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene complex. In: *DNA Polymorphisms as Disease Markers*, edited by Galton, D.J. Plenum Press, 1991, p. 91-105.
129. Dammerman M, Sandkuijl L A, Halaas J L, Chung W and Breslow J L. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4562-4566.
130. Li W W and Leff T. Regulation of apolipoprotein CIII gene transcription by insulin: characterization of an insulin response element in the CIII promoter. *Circulation* 1994; 90: I-401 (Abstract).
131. Li W W, Dammerman M, Smith J D, et al. A common variant of the apo CIII promoter associated with hypertriglyceridemia is defective in its transcriptional response to insulin. *Circulation* 1994; 90: I-401 (Abstract).
132. Lopez-Miranda J, Ordovas J M, Marin C, et al. The SstI polymorphic site at the apolipoprotein C-III gene predicts plasma low density lipoprotein response to changes in dietary fat in young men. *Circulation* 1994; 90: I-74 (Abstract).
133. Humphries, S.E., Fisher, R., Maily, F., et al. Gene-environment interaction in determining plasma lipids and dietary response: The effect of common mutations in the gene for lipoprotein lipase (D9N and N291S). In: *Nutrition, Genetics and Heart Disease*, edited by Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge: LSU Press, 1996, p. 279-295.
134. Reaven G M, Mondon C E, Chen Y-D I and Breslow J L. Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic. *J Lipid Res*, 1994; 35: 820-824.
135. Aalto-Setälä K, Weinstock P H, Bisgaier C L, Wu L, Smith J D and Breslow J L. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. *J Lipid Res*, 1996; 37: 1802-1811.
136. Aalto-Setälä K, Fisher E A, Chen X, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (Apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased Apo CIII and reduced Apo E on the particles. *J Clin Invest* 1992; 90: 1889-1900.
137. Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt S H and Osada J. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 1994; 269: 23610-23616.
138. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J and Stanley K K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*, 1989; 341: 162-164.
139. Mahley R W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988; 240: 622-630.
140. Schaefer E J, Gregg R E, Ghiselli G, et al. Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest* 1986; 78: 1206-1219.
141. Zhang S H, Reddick R L, Burkey B and Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 1994; 94: 937-945.
142. Zhang S H, Reddick R L, Piedrahita J A and Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 1992; 258: 468-471.
143. Plump A S, Smith J D, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992; 71: 343-353.
144. Davignon J, Gregg R E and Sing C F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1988; 8: 1-21.
145. Zannis V I, Kardassis D and Economou Zanni E. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. *Adv Hum Genet* 1993; 21: 145-319.
146. Pocovi M, Cenarro A, Civeira F, et al. Incomplete dominance of type III Hyperlipoproteinemia is associated with the rare apolipoprotein E2 (Arg136—>Ser) variant in multi-generational pedigree studies. *Atherosclerosis* 1996; 122: 33-46.
147. Sing C F and Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 268-285.
148. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkila E and Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res*, 1986; 27: 227-235.
149. Boerwinkle E and Sing C F. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. *Ann Hum Genet* 1987; 51: 211-226.
150. Kamboh M I, Aston C E, Ferrell R E and Hamman R F. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis* 1993; 98: 201-211.
151. Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Sing C F, Kessling A M and Davignon J. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1100-1110.
152. Ordovas J M, Litwack-Klein L, Wilson P W F, Schaefer M M and Schaefer E J. Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apoE1 and apoE5 isoforms. *J Lipid Res* 1987; 28: 371-380.
153. Schaefer E J, Lamon-Fava S, Johnson S, et al. Apolipoprotein E phenotype affects plasma lipoprotein levels in a gender- and menopausal status-dependent manner. *J Lipid Res* 1994;
154. Fisher E A, Blum C B, Zannis V I and Breslow J L. Independent effects of dietary saturated fat and cholesterol on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research*, 1983; 24: 1039-1048.
155. Tikkanen M J, Huttunen J K, Ehnholm C and Pietinen P. Apolipoprotein E4 homozygosity predisposes to serum cholesterol elevation during high fat diet. *Arteriosclerosis*, 1990; 10: 285-288.

156. Savolainen M J, Rantala M, Kervinen K, et al. Magnitude of dietary effects on plasma cholesterol concentration: role of sex and apolipoprotein E phenotype. *Atherosclerosis* 1991; 86: 145-152.
157. Manttari M, Kosninen P, Enholm C, Huttunen J K and Manninen V. Apolipoprotein E polymorphism influences the serum cholesterol response to dietary intervention. *Metabolism* 1991; 40: 217-221.
158. Cobb M M, Teillebaum H, Risch N, Jekel J and Ostfeld A. Influence of dietary fat, apolipoprotein E phenotype, and sex on plasma lipoprotein levels. *Circulation* 1992; 86: 849-857.
159. Miettinen T A, Gylling H, Vanhanen H and Ollus A. Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1044-1052.
160. Miettinen T A, Gylling H and Vanhanen H. Serum cholesterol response to dietary cholesterol and apoprotein E phenotype. *Lancet* 1988; 2: 1261.
161. Lehtimäki T, Moilanen T, Solakivi T, Laippala P and Ehnholm C. Cholesterol-rich diet induced changes in plasma lipids in relation to apolipoprotein E phenotype in healthy students. *Annals of Medicine* 1992; 24: 61-66.
162. López-Miranda J, Ordoñas J M, Mata P, et al. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1994; 35: 1965-1975.
163. Martin L J, Connelly P W, Nancoo D, et al. Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: Relationship to apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res* 1993; 34: 437-446.
164. Dreon D M, Fernstrom H A, Miller B and Krauss R M. Apolipoprotein E isoform phenotype and LDL subclass response to a reduced-fat diet. *Arterioscler Thromb* 1995; 15: 105-111.
165. Friedlander Y, Berry E M, Eisenberg S, Stein Y and Leitersdorf E. Plasma lipids and lipoproteins in response to a dietary challenge: analysis of four candidate genes. *Clin Genet* 1995; 47: 1-12.
166. Sarkkinen E S, Uusitupa M I J, Pietinen P, et al. Long-term effects of three fat-modified diets in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* 1994; 105: 9-23.
167. Zambon D, Ros E, Casals E, Sanllehy C, Bertomeu A and Campero I. Effect of apolipoprotein E polymorphism on the serum lipid response to a hypolipidemic diet rich in monounsaturated fatty acids in patients with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 141-148.
168. Ginsberg H N, Karmally W, Siddiqui M, et al. A dose-response study of the effects of dietary cholesterol on fasting and postprandial lipid and lipoprotein metabolism in healthy young men. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 576-586.
169. Glatz J F C, Demacker P N M, Turner P R and Katan M B. Response of serum cholesterol to dietary cholesterol in relation to apolipoprotein E phenotype. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1991; 1: 13-17.
170. Lehtimäki T, Moilanen T, Porkka K, et al. Association between serum lipids and apolipoprotein E phenotype is influenced by diet in a population-based sample of free-living children and young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J Lipid Res* 1995; 36: 653-661.
171. Vanhanen H T, Blomqvist S, Ehnholm C, et al. Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanol ester treatment. *J Lipid Res* 1993; 34: 1535-1544.
172. Miettinen T A and Vanhanen H. Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis* 1994; 105: 217-226.
173. Uusitupa M I J, Ruuskanen E, Mäkinen E, et al. A controlled study on the effect of beta-glucan-rich oat bran on serum lipids in hypercholesterolemic subjects: Relation to apolipoprotein E phenotype. *J Am Coll Nutr* 1992; 11: 651-659.
174. Jenkins D J A, Hegele R A, Jenkins A L, et al. The apolipoprotein E gene and the serum low-density lipoprotein cholesterol response to dietary fiber. *Metabolism* 1993; 42: 585-593.
175. Kesaniemi Y A, Ehnholm C and Miettinen T A. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apolipoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 578-581.
176. Gylling H, Kontula K and Miettinen T A. Cholesterol absorption and metabolism and LDL kinetics in healthy men with different apoprotein E phenotypes and apoprotein B Xba I and LDL receptor Pvu II genotypes. *Arterioscler Thromb* 1995; 15: 208-213.
177. Weintraub M S, Eisenberg S and Breslow J L. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987; 80: 1571-1577.
178. Nikkilä M, Solakivi T, Lehtimäki T, Koivula T, Laippala P and Astrom B. Postprandial plasma lipoprotein changes in relation to apolipoprotein E phenotypes and low density lipoprotein size in men with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1994; 106: 149-157.
179. Simonet W S, Bucay N, Lauer S J, et al. In the absence of a downstream element, the apolipoprotein E gene is expressed at high levels in kidneys of transgenic mice. *J Biol Chem* 1990; 265: 10809-10812.
180. Simonet W S, Bucay N, Lauer S J and Taylor J M. A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem* 1993; 268: 8221-8229.
181. van den Maagdenberg A M J M, Hofker M H, Krimpenfort P J A, et al. Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem* 1993; 268: 10540-10545.
182. Fazio S, Lee Y -L, Ji Z -S and Rall S C, Jr.. Type III hyperlipoproteinemic phenotype in transgenic mice expressing dysfunctional apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1993; 92: 1497-1503.
183. Yamamoto K, Shimano H, Shimada M, et al. Overexpression of apolipoprotein E pre-
- vents development of diabetic hyperlipidemia in transgenic mice. *Diabetes* 1995; 44: 580-585.
184. Reddick R L, Zhang S H and Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E: Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 141-147.
185. Pászty C, Maeda N, Verschuylt J and Rubin E M. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 899-903.
186. Marcovina S M, Zhang Z H, Gaur V P and Albers J J. Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: Differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American Blacks and Whites. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 1192-1196.
187. Bostom A G, Cupples L A, Jenner J L, et al. Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger - A prospective study. *JAMA* 1996; 276: 544-548.
188. Bostom A G, Gagnon D R, Cupples L A, et al. A prospective investigation of elevated lipoprotein(a) detected by electrophoresis and cardiovascular disease in women: The Framingham Heart Study. *Circulation* 1994; 90.
189. Scanu A M, Pfaffinger D, Lee J C and Hinman J. A single point mutation (Trp72→Arg) in human apo(a) kringle 4-37 associated with a lysine binding defect in Lp(a). *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1994; 1227: 41-45.
190. Chiesa G, Hobbs H H, Koschinsky M L, Lawn R M, Maika S D and Hammer R E. Reconstitution of lipoprotein(a) by infusion of human low density lipoprotein into transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 1992; 267: 24369-24374.
191. Linton M F, Farese R V, Jr., Chiesa G, et al. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *J Clin Invest* 1993; 92: 3029-3037.
192. Callow M J, Stoltzfus L J, Lawn R M and Rubin E M. Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipo-

- protein(a) in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2130-2134.
193. Hobbs H H, Chiesa G, Gaw A, et al. Apo(a) expression in transgenic mice. *Ann NY Acad Sci* 1994; 714: 231-236.
194. Callow M J, Verstuyft J, Tangirala R, Palinski W and Rubin E M. Atherogenesis in transgenic mice with human apolipoprotein B and lipoprotein (a). *J Clin Invest* 1995; 96: 1639-1646.
195. Stocks J, Thorn J A and Galton D J. Lipoprotein lipase genotypes for a common premature termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. *J Lipid Res* 1992; 33: 853-857.
196. Reymer P W A, Groenemeyer B E, Gagne E, et al. A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1543-1549.
197. Hoffer M J V, Bredie S J H, Boomsma D I, et al. The lipoprotein lipase (Asn291 → Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* 1996; 119: 159-167.
198. Pimstone S N, Gagné S E, Gagné C, et al. Mutations in the gene for lipoprotein lipase - A cause for low HDL cholesterol levels in individuals heterozygous for familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1704-1712.
199. Pimstone S N, Clee S M, Gagné S E, et al. A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) results in altered postprandial chylomicron triglyceride and retinyl palmitate response in normolipidemic carriers. *J Lipid Res* 1996; 37: 1675-1684.
200. Jukema J W, Van Boven A J, Groenemeyer B, et al. The Asp99 Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 1913-1918.
201. De Bruin T W A, Mailly F, Van Barlingen H H J J, et al. Lipoprotein lipase gene mutations D9N and N291S in four pedigrees with familial combined hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 631-639.
202. Mailly F, Fisher R M, Nicaud V, et al. Association between the LPL-D9N mutation in the lipoprotein lipase gene and plasma lipid traits in myocardial infarction survivors from the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996; 122: 21-28.
203. Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, et al. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7242-7246.
204. Levak-Frank S, Radner H, Walsh A, et al. Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J Clin Invest* 1995; 96: 976-986.
205. Zsigmond E, Scheffler E, Forte T M, Potenz R, Wu W and Chan L. Transgenic mice expressing human lipoprotein lipase driven by the mouse metallothionein promoter. A phenotype associated with increased perinatal mortality and reduced plasma very low density lipoprotein of normal size. *J Biol Chem* 1994; 269: 18757-18766.
206. Weinstock P H, Bisgaier C L, Aalto-Setälä K, et al. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice - Knockout mice mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2555-2568.
207. Packard C J, Freeman D J, Shepherd J. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and high-density lipoprotein cholesterol. In: *Nutrition, Genetics and Heart Disease*. Pennington Center Nutrition Series. Vol. 6. G.A. Bray and D.H. Rian Editors. LSU Press. Baton Rouge, 1996; pp. 212-223.
208. Marotti K R, Castle C K, Murray R W, Rehberg E F, Polites H G and Melchior G W. The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein A-I metabolism: Insights from studies with transgenic mice. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 736-744.
209. Gellon L B, Walsh A, Hayek T, et al. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem* 1991; 266: 10796-10801.
210. Hayek T, Chajek-Shaul T, Walsh A, et al. An interaction between the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and apolipoprotein A-I genes in transgenic mice results in a profound CETP-mediated depression of high density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Invest* 1992; 90: 505-510.
211. Dinchuk J, Hart J, Gonzalez G, Karmann G, Schmidt D and Wirak D O. Remodelling of lipoproteins in transgenic mice expressing human cholesteryl ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1995; 1255: 301-310.
212. Hayek T, Azrolan N, Verdery R B, et al. Hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particle sizes, and metabolism. Studies in transgenic mice. *J Clin Invest* 1993; 92: 1143-1152.
213. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest* 1995; 96: 2071-2074.
214. Mehlum A, Staels B, Duverger N, et al. Tissue-specific expression of the human gene for lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic mice alters blood lipids, lipoproteins and lipases towards a less atherogenic profile. *Eur J Biochem* 1995; 230: 567-575.
215. Hoeg J M, Vaisman B L, Demosky S J, Jr., et al. Lecithin:cholesterol acyltransferase overexpression generates hyperalpha-lipoproteinemia and a nonatherogenic lipoprotein pattern in transgenic rabbits. *J Biol Chem* 1996; 271: 4396-4402.
216. Brousseau M E, Santamarina-Fojo S, Zech L A, et al. Hyperalphalipoproteinemia in human lecithin cholesterol acyltransferase transgenic rabbits - In vivo apolipoprotein A-I catabolism is delayed in a gene dose-dependent manner. *J Clin Invest* 1996; 97: 1844-1851.
217. Hobbs H H, Russell D W, Brown M S and Goldstein J L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Ann Rev Genet* 1990; 24: 133-170.
218. Hobbs H H, Brown M S and Goldstein J L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation* 1992; 1: 445-466.
219. Kass D H, Batzer M A and Deininger P L. A new restriction-site polymorphism in exon 18 of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene. *Hum Genet* 1995; 95: 363-364.
220. Warnich L, Kotze M J, Langenhoven E and Retief A E. Detection of a frequent polymorphism in exon 10 of the low density lipoprotein receptor gene. *Hum Genet* 1992; 89: 362.
221. Zuliani G and Hobbs H H. Dinucleotide repeat polymorphism at the 3' end of the LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4300.
222. Leitersdorf E, Chakavarti A and Hobbs H H. Polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 409-421.
223. Taylor R, Jeenah M, Seed M and Humphries S. Four DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: their genetic relationship and use in the study of variation at the LDL receptor locus. *J Med Genet* 1988; 25: 653-659.
224. Leitersdorf E and Hobbs H H. Human LDL receptor gene: two ApaI RFLPs. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 2782.
225. Kotze M J, Langenhoven E, Dietzsch E and Retief A E. A RFLP associated with low density lipoprotein receptor. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 376.
226. Kotze M J, Langenhoven E, Retief A E, et al. Haplotype associations of three DNA polymorphisms at the human low density lipoprotein receptor gene locus in familial hypercholesterolemia. *J Med Genet* 1987; 24: 750-755.
227. Funke H, Klug J, Frossard P, Coleman R and Assmann G. PstI RFLP close to the LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 7820.

228. Hobbs H H, Esser V and Russell D W . Avall polymorphism in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 379.
229. Humphries S E, Kessling A M, Horsthemke B , et al. A common DNA polymorphism of the low density lipoprotein receptor gene and its use in diagnosis. *Lancet* 1985; 1: 1003-1005.
230. Henderson H E, Kotze M J and Berger G M . Multiple mutations underlying familial hypercholesterolemia in the South African population. *Hum Genet* 1989; 83: 67-70.
231. Hofmann S L, Russell D W, Brown M S and Goldstein J L. Overexpression of low density lipoprotein receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science* 1988; 239: 1277-81.
232. Yokode M, Hammer R E, Ishibashi S, Brown M S and Goldstein J L . Diet-induced hypercholesterolemia in mice: prevention by overexpression of LDL receptors. *Science* 1990; 250: 1273-1275.
233. Ishibashi S, Brown M S, Goldstein J L, Gerard R D, Hammer R E and Herz J . Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 92: 883-893.
234. Beisiegel U. New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996; 124: 1-8.
235. Benoist F, Nicodeme E and Grand-Perret T . Microsomal triacylglycerol transfer protein prevents presecretory degradation of apolipoprotein B-100 - A dithiothreitol-sensitive protease is involved. *Eur J Bio Chem* 1996; 240: 713-720.
236. Niemeier A, Gáfvéls M, Heeren J, Meyer N, Angelin B and Beisiegel U . VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res* 1996; 37: 1733-1742.
237. Howard G C, Yamaguchi Y, Misra U K, et al. Selective mutations in cloned and expressed  $\alpha$ -macroglobulin receptor binding fragment alter binding to either the  $\alpha$ 2-macroglobulin signaling receptor or the low density lipoprotein receptor-related protein/ $\alpha$ 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 14105-14111.
238. Watanabe Y, Inaba T, Shimano H , et al. Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages: Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1000-1006.
239. Krieger M and Herz J . Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Bio Chem* 1994; 63: 601-637.
240. Landschulz K T, Pathak R K, Rigotti A, Krieger M and Hobbs H H . Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 1996; 98: 984-995.
241. cton S, Rigotti A, Landschulz K T, Xu S Z, Hobbs H H and Krieger M . Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518-520.
242. Grossman M, Raper S E, Kozarsky K , et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet* 1994; 6: 335-341.
243. Nabel E G. Gene therapy for vascular diseases. *Atherosclerosis* 1995; 118 Suppl.: S51-S56.
244. Pagani F, Sidoli A, Giudici G A, Barengli L, Vergani C and Baralle F E . Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: Association with hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990; 31: 1371-1377.
245. Paul-Hayase H, Rosse-neu M, Van Bervliet J P, Deslypère J P and Humphries S E . Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. *Hum Genet* 1992; 88: 439-446.
246. Saha N, Tay J S H, Low P S and Humphries S E . Guanidine to adenine (G/A) substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI levels in Chinese non-smokers. *Genet Epidemiol* 1994; 11: 255-264.
247. Xu C -F, Angelico F, Del Ben M and Humphries S . Role of genetic variation at the apo AI-CIII-AIV gene cluster in determining plasma apo AI levels in boys and girls. *Genet Epidemiol* 1993; 10: 113-122.
248. Civeira F, Pocovi M, Cenarro A, Garces C and Ordoñas J M . Adenine for guanine substitution -78 base pairs to the apolipoprotein(APO) A-I gene: relation with high density lipoprotein cholesterol and apoA-I concentrations. *Clin Genet* 1993; 44: 307-312.
249. Barre D E, Guerra R, Verstraete R, Wang Z, Grundy S M and Cohen J C . Genetic analysis of a polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter: effect on plasma HDL-cholesterol levels. *J Lipid Res* 1994; 35: 1292-1296.
250. Hanis C L, Douglas T C and Hewett-Emmett D . Apolipoprotein A-IV protein polymorphism: frequency and effects on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Hum Genet* 1991; 86: 323-325.
251. Von Eckardstein A, Funke H, Schulte M, Erren M, Schulte H and Assmann G. Nonsynonymous polymorphic sites in the apolipoprotein (apo) A-IV gene are associated with changes in the concentration of apo B-and apo A-I-containing lipoproteins in a normal population. *American Journal of Human Genetics* 1992; 50: 1115-1128.
252. Kamboh M I, Iyengar S, Aston C E, Hamman R F and Ferrell R E . Apolipoprotein A-IV genetic polymorphism and its impact on quantitative traits in normoglycemic and non-insulin-dependent diabetic Hispanics from the San Luis Valley, Colorado. *Human Biology* 1992; 64: 605-616.
253. Eichner J E, Kuller L H, Ferrel R E, Meilahn E N and Kamboh M I . Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles. III. Contribution of apolipoprotein E phenotype to prediction of total cholesterol, apolipoprotein B, and Low density lipoprotein cholesterol in the Healthy Women Study. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 379-385.
254. Zaiou M, Visvikis S, Gueguen R, Parra H -J, Fruchart J C and Siest G . DNA polymorphisms of human apolipoprotein A-IV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in a French population. *Clin Genet* 1994; 46: 248-254.
255. Carrejo M H, Sharrett A R, Patsch W and Boerwinkle E. No association of apolipoprotein A-IV codon 347 and 360 variation with atherosclerosis and lipid transport in a sample of mixed hyperlipidemics. *Genet Epidemiol* 1995; 12: 371-380.
256. de Knijff P, Johansen L G, Rosseneu M, Frants R R, Jespersen J and Havekes L M . Lipoprotein profile of a Greenland Inuit population: Influence of anthropometric variables, Apo E and A4 polymorphism, and lifestyle. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1371-1379.
257. Visvikis S, Steinmetz J, Boerwinkle E, Gueguen R, Galteau M and Siest G . Frequency and effects of the apolipoprotein A-IV polymorphism. *Clin Genet* 1990; 36: 435-441.
258. Menzel H J, Dieplinger H, Sandholzer C, Karadi I, Utermann G and Császár A . Apolipoprotein A-IV polymorphism in the Hungarian population: gene frequencies, effect on lipid levels, and sequence of two new variants. *Human Mutation* 1995; 5: 58-65.
259. Rewers M, Kamboh M I, Hoag S, Shetterly S M, Ferrel R E and Hamman R F . ApoA-IV polymorphism associated with myocardial infarction in obese NIDDM patients. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes* 1994; 43: 1485-1489.
260. Verges B L, Vaillant G, Goux A, Lagrost L, Brun J M and Gambert P . Apolipoprotein A-IV levels and phenotype distribution in NIDDM. *Diabetes Care* 1994; 17: 810-817.
261. Wu J H, Chern M S, Lo S K, Wen M S and Kao J T . Apolipoprotein B 3' hypervariable repeat genotype: Association with plasma lipid concentration, coronary artery disease, and other restriction fragment polymorphisms. *Clin Chem* 1996; 42: 927-932.
262. Kammerer C M, Vandenberg J L, Haffner S M and Hixson J E . Apolipoprotein B (apo B) signal peptide length polymorphisms are associated with apo B, low density lipoprotein cholesterol, and glucose levels

- in Mexican Americans. *Atherosclerosis* 1996; 120: 37-45.
263. Ye P, Chen B and Wang S. Association of polymorphisms of the apolipoprotein B gene with coronary heart disease in Han Chinese. *Atherosclerosis* 1995; 117: 43-50.
264. Pan J -P, Chiang A -N, Tai J J, Wang S -P and Chang M -S. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. *Clin Chem* 1995; 41: 424-429.
265. Turner P R, Talmud P J, Visvikis S and Ehnholm C. DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 221-234.
266. Wick U, Witt E and Engel W K. Restriction fragment length polymorphisms at the apoprotein genes AI, CIII and B-100 and in the 5' flanking region of the insulin gene as possible markers of coronary heart disease. *Clin Genet* 1995; 47: 184-190.
267. Glisic S, Savic I and Alavantic D. Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms (EcoRI and MspI) and serum lipid levels in the Serbian healthy population: Interaction of rare alleles and smoking and cholesterol levels. *Genet Epidemiol* 1995; 12: 499-508.
268. Wu J H, Wen M S, Lo S K and Chern M S. Increased frequency of apolipoprotein B signal peptide sp24/24 in patients with coronary artery disease. General allele survey in the population of Taiwan and comparison with Caucasians. *Clin Genet* 1994; 45: 250-254.