

Análisis del proteoma hepático de ratones transgénicos de apo A-II humana: identificación de proteínas potencialmente implicadas en la regulación del metabolismo de triglicéridos y la respuesta a la insulina

Noemí Rotllan^a, Songül Süren-Castillo^a, Vicent Ribas^a, Xavier Palomer^a, Laura Calpe-Berdiel^a, Edgar Zapico^a, Núria Roglans^b, Josep Julve^a, Joan Carles Laguna^b, Francisco Blanco-Vaca^a y Joan Carles Escolà-Gil^a

^aServei de Bioquímica i Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

^bUnitat de Farmacología i Farmacognòsia. Facultat de Farmacia. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.

Introducción. La función de la apolipoproteína A-II (apo A-II) en el metabolismo lipoproteico y su relación con la arteriosclerosis es poco conocida. Los estudios realizados en humanos y ratones modificados genéticamente han demostrado un efecto directo de la apo A-II en el metabolismo de los triglicéridos y los ácidos grasos libres (AGL) y la sensibilidad a la insulina. El objetivo principal de este estudio es la identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el hígado de ratones transgénicos de apo A-II humana (h) y su potencial relación con el metabolismo de los triglicéridos y la glucosa.

Material y métodos. Se realizaron estudios metabólicos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, la betaoxidación hepática y la prueba de tolerancia a la glucosa en ratones transgénicos de apo A-IIh y en controles en situación de ayunas y tras una carga oral de aceite de oliva. Los cambios en el perfil de expresión proteica se analizaron mediante el análisis comparativo de geles bidimensionales y la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Resultados. Los ratones transgénicos de apo A-IIh presentaban un incremento del colesterol y los triglicéridos de las lipoproteínas que contienen apo B, hipertrigliceridemia aumentada tras la carga oral de ácido oleico, así como un aclaramiento acelerado de la glucosa tras la prueba de sobrecarga de glucosa. Estos cambios estaban asociados a una reducción en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y la tasa de betaoxidación hepática, pero sin cambios significativos en la actividad de la lipoproteína lipasa. De las más de 1.000 manchas resueltas en el rango pH 3 a 10, se identificaron 55 alteraciones significativas en los ratones transgénicos en comparación con los ratones controles, 16 de las cuales estaban relacionadas directamente con el metabolismo de los AGL y los carbohidratos.

Conclusiones. La sobreexpresión apo A-IIh en ratones transgénicos induce hipertrigliceridemia posprandial debido, al menos en parte, a un

Este estudio ha sido financiado gracias a las becas de la Sociedad/Fundación Española de Arteriosclerosis para Investigación Básica (2003) y al proyecto del FIS PI03/1058.

N. Rotllan es becaria predoctoral de formación de investigación del FIS (FI05/00221); el Dr. J.C. Escolà-Gil es un investigador del programa Ramón y Cajal, del Ministerio de Educación y Ciencia. Los dos primeros autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Este trabajo recibió una mención especial en el XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, realizado en Santander en 2006.

Correspondencia: Dr. J.C. Escolà-Gil o Dr. F. Blanco-Vaca. Servei de Bioquímica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: jescola@santpau.es; fblancova@santpau.es

Recibido el 13-3-2006 y aceptado el 26-6-2006.

defecto en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. La aproximación proteómica nos ha permitido detectar y caracterizar diferencias en el proteoma hepático de los ratones transgénicos de apo A-IIh y establecer proteínas potencialmente involucradas en el metabolismo de los AGL. Se requieren más estudios bioquímicos y moleculares para investigar el significado funcional de los cambios encontrados.

Palabras clave:

Apolipoproteína A-II. Arteriosclerosis. Lipoproteínas de alta densidad. Lipoproteínas de muy baja densidad. Proteómica. Ratones transgénicos.

ANALYSIS OF THE LIVER PROTEOME OF HUMAN APOLIPOPROTEIN A-II TRANSGENIC MICE: IDENTIFICATION OF PROTEINS POTENTIALLY INVOLVED IN THE REGULATION OF TRIGLYCERIDE METABOLISM AND INSULIN RESPONSE

Introduction. The role of apolipoprotein A-II (apo A-II) in lipoprotein metabolism and its relationship with atherosclerosis is poorly understood. Several studies both in humans and genetically modified mice have shown a direct effect of apo A-II on triglyceride and free fatty acid (FFA) metabolism and on insulin sensitivity. The aim of this study was to identify the proteins differentially expressed in the livers of human apo A-II transgenic mice and their potential relationship with triglyceride and glucose metabolism.

Material and methods. Metabolic studies of triglyceride-rich lipoproteins, liver beta-oxidation and the glucose tolerance test were conducted in C57BL/6 control mice and human apo A-II transgenic mice in both fasting and postprandial states. The changes in protein expression patterns were determined by analysis of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis while protein identification was performed by mass spectrometry (MALDI-TOF).

Results. Human apo A-II transgenic mice showed an increase in cholesterol and triglycerides from apo B-containing lipoproteins, a higher response after oral fat test with oleic acid and higher glucose clearance after the glucose test. These changes were associated with a reduction in the clearance of triglyceride-rich lipoproteins and in the rate of liver beta-oxidation, but there were no significant changes in lipoprotein lipase activity. Within the pH

3-10 range, 55 out of more than 1,000 spots were identified to be significantly altered in human apo A-II transgenic mice compared with control mice, and 16 of these spots were directly related with FFA and carbohydrate metabolism.

Conclusions. Overexpression of human apo A-II in transgenic mice induces postprandial hypertriglyceridemia. This finding is at least partly due to reduced catabolism of triglyceride-rich lipoproteins. We have been able to detect and characterize differences in the liver proteome of human apo A-II transgenic mice and to identify proteins potentially related to FFA metabolism. Further biochemical and molecular studies are required to investigate the functional significance of the changes found.

Key words:

Apolipoprotein A-II. Atherosclerosis. High density lipoproteins. Very low density lipoprotein. Proteomics. Transgenic mice.

Introducción

La función de la apolipoproteína (apo) A-II en el metabolismo lipoproteico y su relación con la arteriosclerosis es poco conocida, a pesar de ser la segunda proteína cuantitativamente más importante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)^{1,4}. La sobreexpresión de la apo A-II de ratón es proaterogénica⁵. La sobreexpresión de la apo A-II humana (h) en ratones transgénicos también induce un aumento en la susceptibilidad a la arteriosclerosis cuando estos ratones son alimentados con una dieta rica en grasas y colesterol o cuando son cruzados con ratones deficientes en apo E^{6,7}.

Es muy probable que la apo A-II tenga un papel en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos libres (AGL), ya que ratones deficientes en apo A-II presentan una disminución de AGL y triglicéridos, hipersensibilidad a la insulina y un catabolismo acelerado de partículas remanentes⁸. Además, la sobreexpresión de apo A-II de ratón se ha relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina⁹. Ratones transgénicos de la apo A-IIh y de ratón presentan, también, un incremento en las lipoproteínas que contienen apo B^{7,10-16} y un deterioro de una de las funciones antiaterogénicas principales de las HDL, la protección de la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)^{17,18}, lo que explicaría en parte su mayor susceptibilidad al desarrollo de arteriosclerosis^{5,7,13}.

La HDL es un ligando del receptor CD36¹⁹, lo que conlleva la posibilidad de una interacción apo

A-II-CD36 que altere el metabolismo de los AGL y la resistencia a la insulina. Sin embargo, en estudios con ratones transgénicos de apo A-II de ratón y deficientes del receptor CD36 se ha demostrado que el efecto de la apo A-II en los AGL es independiente del receptor CD36²⁰. Este mismo trabajo demostró que la disminución de la oxidación de los AGL de estos ratones transgénicos de apo A-II era explicada, en parte, por la disminución de la expresión de la enzima acil-CoA-deshidrogenasa muscular²⁰. Por tanto, en este estudio se ha identificado una potencial interacción entre apo A-II y la beta-oxidación de los ácidos grasos.

Estudios en humanos también han demostrado una relación entre apo A-II, la concentración de AGL y triglicéridos, y la obesidad visceral^{21,22}. Además, la región 1q21-24 (la apo A-II está localizada en 1q23) presenta ligamiento genético con la diabetes mellitus tipo 2 (DM2)²³⁻²⁷. Cabe destacar además que, en familias holandesas con hiperlipemia familiar combinada (HFC), las concentraciones plasmáticas de apo A-II estaban incrementadas en pacientes con respecto de los individuos normolípemicos²⁸. En este sentido, dos estudios recientes han identificado ligamiento genético entre el factor de transcripción USF1 y la HFC en familias finlandesas y asociación con la concentración de glucosa y parámetros lipídicos en un estudio multicéntrico con individuos sanos europeos^{29,30}. Debido a que el USF1 regula la expresión de apo A-II, estos datos sugieren un papel modulador, más que casual, de la apo A-II en la HFC y DM2¹.

El objetivo principal de este estudio es la identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el hígado de ratones transgénicos de apo A-IIh. Para ello, y mediante el análisis de geles bidimensionales, se determinaron los perfiles de expresión proteica en el hígado de ratones transgénicos de apo A-IIh, y se compararon con los de los ratones control de la cepa C57BL/6 en una situación de ayunas o tras una carga oral de aceite de oliva. Tras el análisis comparativo de los geles, se identificaron las proteínas expresadas diferencialmente mediante espectrometría de masas Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) y alternativamente por espectrometría MALDI-TOF/TOF o ESI-trampa iónica.

Material y métodos

Animales y dietas

Los procesos de experimentación en animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. Los

estudios se realizaron con ratones C57BL/6 (controles) y ratones transgénicos de apo A-IIh hembras de 6 meses de edad¹¹. Los ratones fueron alimentados con dieta estándar (A04 Rodent standard diet, Panlab) y mantenidos en condiciones óptimas de temperatura (21 °C) y humedad relativa (55%), con ciclos programados de luz-oscuridad de 12 h y con libre acceso a agua.

Respuesta posprandial de triglicéridos

Los ratones se subdividieron en 2 grupos experimentales según si la extracción de sangre de la vena de la cola era en situación de ayunas o posprandial. La situación de ayunas consistía en la privación de la comida a las 21 horas y obtención de las muestras a las 10 horas. Para la respuesta posprandial de triglicéridos, se privaba de la comida a las 21 horas y después de realizar una primera extracción de sangre de la vena de la cola ($t = 0$), se realizaba una carga oral de 150 µl de aceite de oliva a las 9 horas^{31,32}. Muestras adicionales de sangre fueron extraídas a diferentes intervalos después de la administración de aceite de oliva. Los valores de triglicéridos en plasma en los distintos puntos se determinaron mediante un método comercial de tipo enzimático y colorimétrico adaptado a un autoanalizador Hitachi 911 (Roche Diagnostics)⁷.

Perfil lipoproteico

Las fracciones lipoproteicas se aislaron de *pools* de plasma de ratón en situación de ayunas o 3 h después de la administración de aceite mediante ultracentrifugación secuencial^{7,11}. De cada fracción lipoproteica obtenida se determinaron las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y apo A-IIh a partir de métodos comerciales adaptados a un autoanalizador BM/HITACHI 911 (Roche y Kamiya Biomedical Company)⁷.

Catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos *in vivo*

La fracción de lipoproteínas de densidad inferior a 1,006 g/ml aislada por ultracentrifugación (lipoproteínas ricas en triglicéridos) en ratones en situación de ayuno o 3 h después de la administración de aceite fue marcada radiactivamente con [3H] trioleína^{33,34}. En todos los casos, se injectaron por vía intravenosa 500.000 cpm contenidas en la fracción de lipoproteínas ricas en triglicéridos en 100 µl de salino. La tasa catabólica fraccional (TCF) se calculó usando el recíproco del área bajo de la curva que formó la caída de la radiactividad plasmática a lo largo del tiempo^{33,34}.

Actividades de la lipoproteína lipasa (LPL)

Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 500 U/kg de heparina (Laboratorios Farmacéuticos Rovi, Madrid, España). La sangre se recogió 30 min después y el plasma se almacenó a -80 °C hasta la realización de los ensayos. La actividad LPL se midió usando una emulsión marcada radiactivamente^{13,33}. Por otro lado, una concentración equivalente a 0,3 mM de triglicéridos de VLDL de ratones control y transgénicos se utilizó también como sustrato en los experimentos de lipólisis *in vitro*, tal y como se ha descrito previamente³⁴. La tasa de AGL se expresó como µmol de AGL por min y por litro.

Betaoxidación hepática

Los hígados de los ratones en situación de ayunas o a las 3 h de la administración de aceite se perfundieron y homoge-

nizaron en tampón compuesto de 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 30 mM EDTA y 50 mM KH₂PO₄. La betaoxidación hepática se determinó tal y como ha sido previamente descrita³⁵.

Prueba de tolerancia a la glucosa (PTOG)

La PTOG se realizó mediante el cálculo del área bajo la curva de las concentraciones de glucosa obtenidas en diferentes tiempos tras una inyección intraperitoneal de la misma (2 mg/g peso corporal)^{33,36}.

Electroforesis bidimensional (2D-DIGE)

y análisis de imagen

Se sacrificó a 2 grupos de ratones transgénicos y controles independientes en situación de ayunas o a las 3 h de la administración de aceite ($n = 6$ por genotipo y grupo). Se extrajeron los hígados previamente perfundidos con salino para eliminar los restos de hemoglobina y se congelaron con nitrógeno líquido para su posterior análisis. Cada muestra fue homogeneizada mecánicamente con un pistón de teflón en 0,5 ml de tampón de Lisis (30 mM Tris, 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS) al que se añadió (1/100 v/v) un cóctel de inhibidores de proteasas (GE Healthcare, Amersham). A continuación se sonó la muestra y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 °C; se sometió 100 µl de cada muestra a precipitación con ácido tricloroacético/acetona (2D Clean-Up Kit, GE Healthcare, Amersham). Los precipitados de proteína se resuspendieron en tampon de lisis y se ajustó el pH a 8,0. La concentración proteica se determinó por el método Bradford (RC/DC Kit BioRad)³⁷. La concentración de proteína de las muestras se ajustó a 2 mg/ml y las muestras se marcaron con 400 pmol fluorocromos Cy (Cy3 o Cy5)/50 µg de proteína durante 30 min de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante (GE Healthcare, Amersham). El estándar interno se preparó mezclando una concentración equivalente de cada una de las 24 muestras y se marcó de forma análoga las muestras con Cy2. En todos los casos, se añadió 1 µl de una solución 10 mM de lisina durante 10 min, para neutralizar el exceso de Cy. A continuación, las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 se mezclaron con el estándar interno a una concentración de 50 µg de proteína por Cy y por gel y se añadió a cada muestra un volumen equivalente de tampón 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 2% DTT, 2% anfolitos pH 3-10 NL (GE Healthcare, Amersham) y 0,002% de azul de bromofenol. Se analizó las 24 muestras simultáneamente en un diseño de 12 geles, junto con la muestra estándar. Para evitar una posible desviación de los datos, se marcó la mitad de las muestras de cada grupo con Cy3 y la otra mitad con Cy5. La muestra estándar se marcó con Cy2. Así, 2 muestras y el estándar fueron separados en cada uno de los geles. La separación de las proteínas en una primera dimensión se realizó en tiras de acrilamida con gradiente de pH inmovilizado (Immobiline DryStrips, GE Healthcare, Amersham) de 24 cm y pH 3-10. El isoelectrofoqueo (IEF) se llevó a cabo con un equipo IPGphor (GE Healthcare, Amersham). Las condiciones de focalización fueron: 3 h a 300 V, 6 h a 1.000 V, 3 h a 8.000 V y 4 h 40 min a 8.000 V. Para obtener la separación de las proteínas en una segunda dimensión, se realizó una segunda electroforesis en una cubeta Ettan DALT Six (GE Healthcare, Amersham) aplicando las tiras equilibradas del IEF sobre los geles (26 x 22 cm) de acrilamida (12,5%) un voltaje de 3 V/gel durante 30 min y a continuación 17 V/gel durante 5 h y 40 min. Los geles bidimensionales se escanearon con las apropiadas longitudes de onda de emisión y excitación y se obtuvieron las imágenes de fluorescencia para cada uno de los tres

fluorocromos con una resolución de 100 µm mediante el escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare, Amersham). Para el análisis de las imágenes de fluorescencia generadas se utilizó el software DeCyder v.5.0 (GE Healthcare, Amersham). Se seleccionaron las manchas para las que se observaron variaciones superiores a 1,1 veces significativas con un valor de $p < 0,001$ en las comparaciones entre los diferentes grupos.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Se tiñeron geles preparativos con plata, siguiendo un protocolo compatible con espectrometría de masas³⁸. Las proteínas seleccionadas se recortaron de los geles y se sometieron a digestión con tripsina (Promega Gold) en el gel, utilizando un robot SpotPicker (GE Healthcare, Amersham) y un digestor Proteineer DP (Bruker Ultraflex). La identificación se llevó a cabo mediante la técnica de "huella dactilar peptídica". En la preparación de la muestra para espectrometría de masas MALDI-TOF se utilizó como matriz de ionización ácido α-ciano hidroxicinámico y soportes de muestra AnchorChip (Bruker Ultraflex). Se analizaron los digeridos trípticos por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Ultraflex), y se identificaron en las bases de datos por comparación del mapa peptídico observado con los deducidos teóricamente a partir de las secuencias, utilizando el algoritmo de búsqueda MASCOT (Matrix Science). En los casos en que no se obtuvo una identificación clara mediante esta técnica, la identificación se corroboró mediante datos de secuencia, a partir de espectros MS/MS obtenidos por espectrometría MALDI-TOF/TOF o ESI-trampa iónica. La búsqueda en la base de datos se realizó en este caso mediante el programa MASCOT (Matrix Science).

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis estadístico de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre los grupos experimentales. Se utilizó el programa GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software). Se consideró estadísticamente significativo los valores de $p < 0,05$. Todos los valores se presentan como la media ± error estándar.

Resultados

Perfil lipoproteico y respuesta posprandial de triglicéridos en ratones transgénicos de apo A-IIh

Los datos obtenidos en ratones transgénicos de apo A-IIh confirmaron la deficiencia de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y el incremento de colesterol y triglicéridos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que presentan estos ratones en ayunas (tabla 1)¹¹⁻¹³. Tras la carga oral de aceite de oliva, se observó un aumento de triglicéridos en plasma en los ratones transgénicos de apo A-IIh, alcanzando un máximo entre las 2 y las 3 h (fig. 1). Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y apo A-IIh fueron también determinadas en las distintas fracciones lipoproteicas (tabla 1). Los ratones transgénicos presentaban altas concentraciones de colesterol de las lipoproteínas que contienen apo B, así como un

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y apo A-IIh en las lipoproteínas de los ratones estudiados. Los valores se expresan como media ± error estándar (n = 5 por grupo)

Grupo	Fracción lipoproteica	Colesterol (mM)	Triglicéridos (mM)	Apo A-IIh (mg/dl)
Control ayunas	VLDL	0,03 ± 0,01	0,21 ± 0,04	
	IDL + LDL	0,27 ± 0,03	0,17 ± 0,03	
	HDL	1,48 ± 0,04	0,03 ± 0,02	
Transgénicos de la apo AIIh en ayunas	VLDL	0,15 ± 0,04 ^a	0,50 ± 0,08 ^a	0,59 ± 0,27
	IDL + LDL	0,65 ± 0,17 ^a	0,19 ± 0,1	2,43 ± 1,59
	HDL	0,46 ± 0,07 ^b	0,02 ± 0,004	69,07 ± 4,74
Control posprandial	QM	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,08	
	VLDL	0,06 ± 0,02	0,39 ± 0,11	
	IDL + LDL	0,37 ± 0,02	0,17 ± 0,03	
Transgénicos de apo A-IIh posprandial	HDL	1,73 ± 0,25	0,02 ± 0,004	
	QM	0,23 ± 0,05 ^b	4,91 ± 0,45 ^b	3,13 ± 0,47
	VLDL	0,18 ± 0,05 ^c	2,10 ± 0,76 ^a	0,44 ± 0,14
	IDL + LDL	0,65 ± 0,05 ^b	0,16 ± 0,05	0,54 ± 0,32
	HDL	0,56 ± 0,08 ^b	0,03 ± 0,01	77,8 ± 5,51

HDL: lipoproteínas de alta densidad; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

^aDiferencias estadísticamente significativas respecto a control, p < 0,03. ^bDiferencias estadísticamente significativas respecto a control, p < 0,01.

^cDiferencias estadísticamente significativas respecto a control, p < 0,05.

Las fracciones lipoproteicas se obtuvieron por ultracentrifugación secuencial a partir de *pools* de plasma de ratón en situación de ayunas o 3 h después de la administración de aceite de oliva (posprandial). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

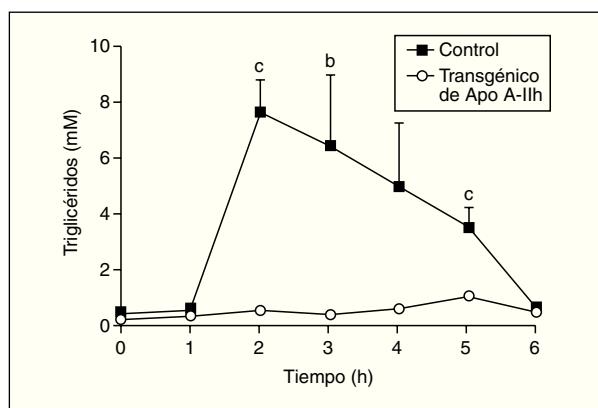


Figura 1. Respuesta a la carga oral de aceite de oliva en ratones controles y transgénicos de apo A-IIh. Los triglicéridos se determinaron antes y después de la carga oral de aceite. Los valores se expresan como media ± error estándar (n = 5 ratones por grupo). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Mann-Whitney. ^ap < 0,03. ^bp < 0,01.

aumento de los triglicéridos asociados a quilomicrones y VLDL (tabla 1). Estos cambios estaban asociados a una deficiencia de chDL similar a la que presentaban los ratones transgénicos en ayunas (tabla 1).

Actividad LPL, metabolismo de las VLDL y betaoxidación

La tasa catabólica fraccional en plasma de las lipoproteínas ricas en triglicéridos estaba muy disminuida en situación posprandial (tabla 2). La actividad LPL postheparínica y la hidrólisis in vitro de

triglicéridos de las VLDL aumentaron en los ratones tras ser sometidos a una carga oral de aceite de oliva. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en estas magnitudes cuando se comparaban los ratones transgénicos y los controles en la situación de ayunas o posprandial, respectivamente (tabla 2). Tres horas después de la carga oral de aceite de oliva, los hígados de los ratones transgénicos presentaban una reducción significativa en la betaoxidación hepática. El área bajo la curva de la prueba de sobrecarga de glucosa estaba reducida en los ratones transgénicos de la apo A-II (tabla 2).

Perfil de expresión proteica

Para los experimentos 2D-DIGE se utilizaron 100 mg del hígado de 12 ratones transgénicos y 12 controles. La mitad de los hígados de cada genotipo se había obtenido en ayunas y la otra mitad 3 h después de la carga oral de aceite de oliva. Se consiguió detectar aproximadamente 1.000 manchas presentes en todos los geles y se realizó el análisis estadístico tal y como se ha descrito con anterioridad. Comparando el perfil de expresión proteica en situación de ayunas y posprandial, se identificaron 55 proteínas alteradas en los ratones transgénicos de apo A-IIh en comparación con los ratones controles (fig. 2). Concretamente, en situación de ayunas se encontraron 38 proteínas diferencialmente expresadas en ratones transgénicos de apo A-II y 31 en situación posprandial. Catorce de estas proteínas estaban diferencialmente expresadas en ambas si-

Tabla 2. Parámetros determinantes de la concentración de triglicéridos. Los valores se expresan como media ± error estándar (n = 5 por grupo)

	Control ayunas de apo A-IIh en ayunas	Transgénicos posprandial	Control de apo A-IIh posprandial	Transgénicos
TCF de [3H]triglicéridos de las VLDL	1,87 ± 0,13	2,22 ± 0,20	1,74 ± 0,07	1,19 ± 0,13 ^a
Actividad LPL postheparínica (mU/ml)	111 ± 23	107 ± 23	196 ± 21	203 ± 36
Hidrólisis in vitro de triglicéridos de las VLDL (μ mol AGL/min/l)	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	4,9 ± 0,5	5,1 ± 0,5
AGL (mM)	1,48 ± 0,33	1,04 ± 0,15	1,66 ± 0,21	1,83 ± 0,25
Actividad de betaoxidación hepática (nmol/min/mg proteína)	0,73 ± 0,32	0,50 ± 0,39	0,96 ± 0,07	0,76 ± 0,08 ^a
Prueba de tolerancia a la glucosa (mg/dl/h)	87 ± 40	31 ± 12 ^a	131 ± 38	68 ± 33 ^b

AGL: ácidos grasos libres; LPL: lipoproteína lipasa; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

^aDiferencias estadísticamente significativas respecto a control, p < 0,01. ^bDiferencias estadísticamente significativas respecto a control, p < 0,05. La tasa catabólica fraccional (TCF) de [3H]triglicéridos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se calculó usando el recíproco del área bajo de la curva que formó la caída de la radioactividad a lo largo del tiempo de 500.000 cpm de [3H]trioleína asociada a VLDL en ratones controles y transgénicos en situación de ayunas o 3 h después de la administración de aceite. La actividad LPL de plasma postheparínico se determinó usando un ensayo con una emulsión artificial radiactiva. La hidrólisis in vitro de TG de las VLDL se determinó a partir de un ensayo con una concentración de 0,3 mM de TG de las VLDL endógenas de dichos ratones y 0,2 U de LPL durante 10 min a 37 °C. La reacción se paró mediante la adición de tritón X-100 y se determinaron los AGL formados. La betaoxidación hepática se determinó como nmol de palmitoil-CoA producida por min y por mg de proteína de hígado. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

tuaciones, 13 de ellas en el mismo sentido. La relación de la expresión proteica y su categorización según la vía metabólica se presentan en la tabla 3.

Discusión

Uno de los resultados más novedosos de este estudio es que los ratones transgénicos de apo A-IIh presentan una reducción sustancial en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos tras una sobrecarga oral de aceite de oliva. Estos resultados contrastan con resultados previos de nuestro grupo en los que se demostraba que los ratones transgénicos en situación de ayunas presentaban una sobreproducción hepática de triglicéridos de VLDL^{13,33}. Sin embargo, una línea independiente de ratones transgénicos de apo A-IIh también presentaba una severa hipertrigliceridemia en situación posprandial, concomitante con un enriquecimiento de apo A-II de las VLDL y una severa reducción del contenido de apo A-II y colesterol de las HDL^{10,39}. Esta hipertriglyceridemia tenía a normalizarse cuando los ratones transgénicos eran sometidos a un ayuno prolongado junto con un incremento del contenido de apo A-II de HDL¹⁰. Estos resultados podrían deberse a un efecto directo de la apo A-IIh en la actividad LPL in vivo de forma que los triglicéridos de los quilomicrones y las VLDL se acumulan en el plasma durante horas después de una carga oral de ácidos grasos, aunque son finalmente hidrolizados tras un ayuno prolongado¹⁰. Sin embargo, nuestros ratones transgénicos de apo A-IIh no presentaban cambios significativos en la actividad LPL postheparínica ni en la hidrólisis in vitro de los triglicéridos.

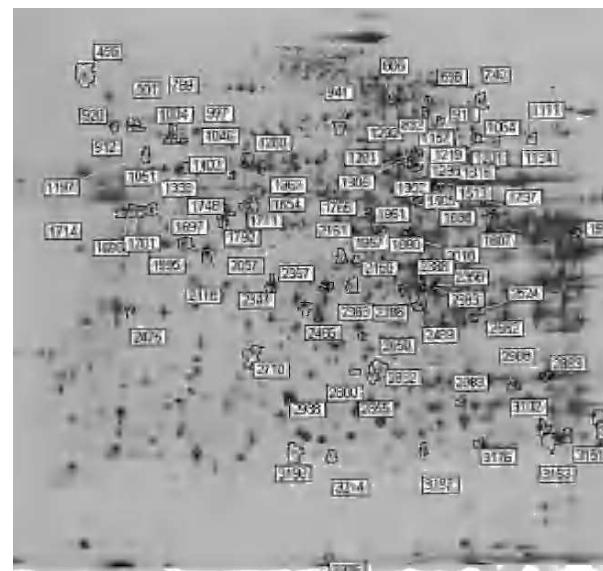


Figura 2. Ejemplo representativo de electroforesis bidimensional con tinción de plata de proteínas de hígado de ratón: primera dimensión, pH 3-10; segunda dimensión, SDS-PAGE al 12,5%. Los números de las manchas se corresponden con los de la tabla 3.

dos de sus VLDL endógenas cuando se comparaban con las respectivas magnitudes de los ratones control (tabla 2). Además, los ratones transgénicos tampoco presentaron una relación recíproca entre las HDL y las VLDL en la transición del estado posprandial a ayunas (tabla 1), en contraste con lo que habían descrito previamente Boisfer et al¹⁰. Así, es más probable que la formación de partículas de HDL pequeñas (pre-β) que contienen apo A-

Tabla 3. Expresión diferencial de proteínas involucradas en el metabolismo de ratones transgénicos de apo A-IIh

Vía metabólica/Identidad proteica	Cambios en ayunas ^a	Cambios en posprandial ^a	Número de acceso de Swiss-prot ^b	Punto isoeléctrico teórico/masa molecular (D) ^c	Número de mancha ^d
Metabolismo de ácidos grasos					
Enoyl coenzyme A Hydratase	+1,31	+1,19	Q8BH95	8,76/31853	2.908
Bifunctional coenzyme A synthase	+1,39	NC	AK004878	6,61/62213	1.292
Carnitine o-palmitoyltransferase II precursor, mitochondrial	+1,35	NC	A49362	8,46/74508	1.111
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase	+1,34	NC	BC026559	8,91/71230	1.134
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	NC	+1,21	Q7TMY2	8/48303	2.158
Metabolismo de carbohidratos					
Aldo-keto reductase family 1 member A4 (aldehyde reductase)	+1,87	+2,00	AK009462	6,9/36792	2.358
Transaldolase	+1,40	+1,27	U67611	6,57/37534	2.388
Propionyl CoA-carboxylase alpha-subunit	+1,25	NC	Q91ZA3	7,02/80237	941
Fructose-1, 6-bisphosphatase	NC	-1,17	Q9QXD6	6,18/37157	2.357
2810435D12Rik protein	NC	-1,2	Q9CYW4	6,31/28237	2.832
Pyruvate kinase	NC	-1,3	S79731	6,63/62612	1.350
Ciclo ATC, cadena respiratoria y síntesis de ATP					
Similar to mitochondrial aconitase	+1,35	NC	Q99kI0	8,08/8651	740
Hypothetical protein (succinate-coenzyme A ligase)	+1,31	NC	Q7TMY3	5,15/40429	2.057
Electron transfer flavoprotein beta-subunit	+1,17	NC	AK002407	8,57/27293	2.883
Fumarate hydratase 1	NC	-1,34	BC006048	9,12/54564	1.807
Malate dehydrogenase	NC	-1,52	A26683	7,16/64585	1.201
Metabolismo de la urea					
Weakly similar to carbamoyl-phosphate synthase (fragment)	+1,47	NC	Q8C196	6,27/83966	696
Methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	+1,35	NC	AK007782	7,7/79693	916
Similar to ornithine transcarbamylase	NC	+1,5	Q8R1A8	8,77/39511	2.383
Metabolismo de aminoácidos y de nucleótidos					
Thioether S-methyltransferase, mitocondrial precursor	-1,75	-1,88	S52102	6/30068	2.938
Glutathione S-transferase P 2	+1,56	NC	P19157	8,13/23634	3.102
Glutamate dehydrogenase [NAD (P)]	+1,44	NC	S16239	8,05/61640	1.513
Similar to cystathionine beta synthase	+1,3	NC	Q91WU3	6,18/60896	1.291
Sulfite oxidase	+1,25	NC	BC027197	5,69/54413	1.402
Kynurenine aminotransferase/glutamine transaminase K homolog	-1,43	NC	Q8BTY1	6,46/47932	1.951
Betaine homocysteine methyl transferase	NC	+1,96	AF033381	8,01/45448	2.524
Glutamate dehydrogenase	NC	+1,37	Q8C273	8,31/61582	1.505
Phenylalanine 4-monoxygenase	NC	+1,23	S15758	6,01/52410	1.654
Methionine adenosyltransferase	NC	-1,28	A47151	5,51/44079	1.792
Similar to methionine adenosyltransferase I, alpha	NC	-1,33	Q9IX83	5,51/44051	1.748

(Continúa)

IIh en los ratones transgénicos³⁹⁻⁴¹ inhibían la LPL in vivo¹⁰ y provoquen una hipertrigliceridemia grave tras la carga oral de ácidos grasos. Por otro lado, una reducción de la actividad de los receptores como el receptor de LDL, LRP, el receptor *scavenger* tipo B1 y el CD36, también puede influir en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en situación posprandial^{32,42-44}. Sin embargo, nuestro análisis proteómico de las muestras hepáticas no reveló cambios en la concentración de estas proteínas. En cambio, los ratones

transgénicos en ayunas presentaban aumentos significativos de varias enzimas implicadas en la beta-oxidación (enoil-CoA-hidratasa, precursora de la carnitinepalmitoiltransferasa II, acil-CoA-deshidrogenasa), así como en la sintasa CoA bifuncional y en la cantidad de varias enzimas clave en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC). La mayoría de estos cambios no se detectó en situación de poscarga oral de ácidos grasos y el ratón transgénico presentó una reducción significativa en dos de las enzimas clave del ciclo ATC (malato-deshidrogena-

Tabla 3. (Continuación)

Vía metabólica/Identidad proteica	Cambios en ayunas ^a	Cambios en posprandial ^a	Número de acceso de Swiss-prot ^b	Punto isoeléctrico teórico/masa molecular (D) ^c	Número de mancha ^d
Síntesis de proteínas transportadoras y de anclaje					
Protein disulfide-isomerase(ERp72)	+4,44	+4,05	B34930	5,13/72271	912
Similar to protein disulfide isomerase-related protein	+1,32	+1,25	Q922R8	5/48469	1.714
Protein transport protein SEC23A	+1,54	NC	Q8C1E4	7,23/86946	832
heat shock protein 1 (chaperonin)	+1,41	NC	BC016400	5,91/61088	1.336
endoplasmatic reticulum protein 99	+1,27	NC	A29317	4,74/92703	456
DNA K - type molecular chaperone grp78	+1,26	NC	A37048	5,12/72491	920
Elongation factor TU	+1,26	NC	Q8BFR5	7,23/49876	1.890
1200014D15 Rik protein	+1,25	NC	Q9DBT9	7,69/97422	686
heat shock 70kD protein 5	-1,48	-2,02	Q9DC41	5,01/72492	901
Proteólisis					
Similar to N-acylaminoacyl-peptide hydrolase	-3,25	-4,26	Q8R146	5,28/80767	789
Vía redox					
Similar to thiosulfate sulfurtransferase	+5,19	+8,42	Q99J99	6,11/33231	2.650
0610025I19Rik protein (Class kappa glutathione S-transferase)	+2,15	+2,15	Q9DCM2	8,97/25801	3.056
Superoxide dismutase (Mn)	+1,21	-1,15	I57023	8,8/24816	3.176
senescence marker protein 30	-1,47	NC	S72173	5,15/33899	2.475
Peroxiredoxin 1	NC	-1,26	Q9CWI2	8,26/22222	3.151
Citosqueleto					
Cytokeratin endoB	+1,43	+1,42	M22832	5,22/47509	1.696
Otras					
Sulfotransferase-related protein (hormone and xenobiotic metabolism)	+3,37	+4,00	O35403	6,09/35216	2.466
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kD, V1 subunit A isoform A	-2,59	-2,42	Q8CHX2	5,42/68625	1.046
Similar to hypothetical protein FLJ20920	+1,62	NC	Q8VCW8	8,44/68591	1.298
Similar to carboxylesterase precursor	-1,49	NC	Q8BM97	5,81/62664	1.362
Similar to carboxylesterase 2 (intestine, liver)	-1,5	NC	Q8QZR3	5,74/62356	1.260
Similar to hypothetical protein HT036	NC	+1,53	Q8R1F5	6/30544	2.800
0610011F06Rik protein	NC	-1,25	Q9DCS2	6,1/22673	3.196
purine-nucleoside phosphorylase	NC	-1,29	I57010	5,78/32541	2.710
Selenophosphate synthetase 2	NC	-1,29	P97364	5,75/48212	1.711

^aIndica diferencias estadísticamente significativas respecto a control, p < 0,05. ^bNúmero de acceso a la base de datos de SWISS-PROT. ^cNúmero teórico de punto isoeléctrico y la masa molecular. ^dLos números de las manchas coinciden con los números de la figura 2.
NC: no cambia.

sa y fumarato-hidratasa 1). De forma consistente, los perfiles de expresión génica hepática de los ratones transgénicos de apo A-IIh, obtenidos mediante *microarrays* de Affymetrix, han demostrado que 12 y 8 genes implicados en la betaoxidación y el ciclo ATC, respectivamente, están reprimidos en los ratones transgénicos en situación de poscarga oral de ácidos grasos (Ribas et al, datos no publicados). Estos cambios sugieren que existe una reducción de la betaoxidación hepática en los ratones transgénicos, especialmente en la situación posprandial, y ello puede favorecer la acumulación, el empaquetamiento y la secreción de triglicéridos³³. Una explicación de los cambios observados en nuestros ratones transgénicos sería la relación existente entre la lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y la generación de ligan-

dos del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR)⁴⁵, que pueden influir en la expresión de genes implicados en la betaoxidación. Así, los cambios observados podrían ser consecuencia de la inhibición de la actividad LPL *in vivo* y, por tanto, secundarios a la acción de apo A-II sobre el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que nuestros ratones transgénicos de apo A-IIh presentan una respuesta incompleta a fenofibrato por parte de varios genes regulados por PPAR- α ³⁴.

Nuestros ratones transgénicos presentaban una marcada aceleración en la PTG, lo que es consistente con estudios previos de nuestro grupo³³. Estos cambios podrían ser consecuencia, al menos en parte, de la deplección del colesterol adrenal que

presentan estos ratones transgénicos⁴⁶, junto con un fenotipo de hipocortisolismo que podría influir sobre la gluconeogénesis hepática⁴⁷. Una reducción en la actividad de las enzimas malato-deshidrogenasa y fructosa-1,6-bisfosfato podría influir sobre la tasa de gluconeogénesis en los ratones transgénicos, aunque estos dos cambios no fueron consistentes en las dos situaciones de alimentación estudiadas en nuestros ratones transgénicos. También es posible la existencia de un cambio entre los AGL y la glucosa como sustrato energético mayoritario en nuestros ratones transgénicos, tal y como ocurre en los ratones deficientes de PPAR- α que presentan severa hipoglucemia concomitante con una disfunción de la betaoxidación hepática⁴⁸.

Varias enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos, incluido el metabolismo de la homocisteína, estaban alteradas en los ratones transgénicos. La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo cardiovascular, pero no nos consta que se haya descrito alguna relación entre la expresión de apo A-II y el metabolismo de la homocisteína. Una explicación más probable es la relación recíproca que se ha observado entre betaoxidación de AGL y el metabolismo de los aminoácidos, tal y como se ha descrito para las enzimas ornitín-carbamoil-transferasa y betaina-homocisteína metil transferasa⁴⁹. También es posible que los cambios en la beta-oxidación y el ciclo ATC estén asociados a la formación de especies reactivas del oxígeno y la expresión de genes implicados en las vías redox⁵⁰. Algunas de estas enzimas estaban reducidas en la situación posprandial, como en el caso de superóxido-dismutasa y peroxiredoxina-1. Por otro lado, uno de los cambios más acentuados fue la regulación al alza de la proteína disulfido isomerasa (*Erp72*) en los ratones transgénicos. Esta proteína es parte de la maquinaria del retículo endoplasmático de los hepatocitos y constituye una de las subunidades de la proteína microsomal transferidora de triglicéridos, por lo que podría contribuir a un incremento en la maduración de las VLDL y su posterior secreción hepática⁵¹.

En conclusión, nuestros ratones transgénicos de apo A-IIh presentan una hipertrigliceridemia posprandial acentuada y potencialmente proaterogénica. Estos cambios se deben, en parte, a un defecto en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. A través de una aproximación proteómica fuimos capaces de detectar cambios en el proteoma del hígado de los ratones transgénicos de apo A-IIh. Algunas de estas proteínas podrían estar implicadas en el proceso por el que la apo A-II regula el metabolismo de los AGL y los triglicéridos, o al

contrario, ser simplemente el reflejo hepático de éstos. Distinguir entre estas dos posibilidades requerirá de nuevos estudios.

Bibliografía

- Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC, Martin-Campos JM, Julve J. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res.* 2001;42:1727-39.
- Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, Clavey V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2002;164:1-13.
- Kalopissis AD, Pastier D, Chambaz J. Apolipoprotein A-II: beyond genetic associations with lipid disorders and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:165-72.
- Martin-Campos JM, Escola-Gil JC, Ribas V, Blanco-Vaca F. Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:247-53.
- Warden CH, Hedrick CC, Qiao JH, Castellani LW, Lusis AJ. Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science.* 1993;261:469-72.
- Escola-Gil JC, Marzial-Casacuberta A, Julve-Gil J, Ishida BY, Ordonez-Llanos J, Chan L, et al. Human apolipoprotein A-II is a pro-atherogenic molecule when it is expressed in transgenic mice at a level similar to that in humans: evidence of a potentially relevant species-specific interaction with diet. *J Lipid Res.* 1998;39:457-62.
- Escola-Gil JC, Julve J, Marzial-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2000;41:1328-38.
- Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:14788-94.
- Castellani LW, Goto AM, Lusis AJ. Studies with apolipoprotein A-II transgenic mice indicate a role for HDLs in adiposity and insulin resistance. *Diabetes.* 2001;50:643-51.
- Boisfer E, Lambert G, Atger V, Tran NQ, Pastier D, Benetollo C, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-II in mice induces hypertriglyceridemia due to defective very low density lipoprotein hydrolysis. *J Biol Chem.* 1999;274:11564-72.
- Marzial-Casacuberta A, Blanco-Vaca F, Ishida BY, Julve-Gil J, Shen J, Calvet-Marquez S, et al. Functional lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Biol Chem.* 1996;271:6720-8.
- Julve-Gil J, Ruiz-Perez E, Casaroli-Marano RP, Marzial-Casacuberta A, Escola-Gil JC, Gonzalez-Sastre F, et al. Free cholesterol deposition in the cornea of human apolipoprotein A-II transgenic mice with functional lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Metabolism.* 1999;48:415-21.
- Escola-Gil JC, Julve J, Marzial-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *J Lipid Res.* 2001;42:241-8.
- Zhong S, Goldberg IJ, Bruce C, Rubin E, Breslow JL, Tall A. Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1994;94:2457-67.
- Hedrick CC, Castellani LW, Warden CH, Puppione DL, Lusis AJ. Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1993;268:20676-82.
- Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusis AJ. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J Lipid Res.* 2001;42:563-70.
- Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, Goto AM, et al. Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic

- mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest.* 1997;100:464-74.
18. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, et al. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res.* 2004;95:789-97.
 19. De Beer MC, Castellani LW, Cai L, Stromberg AJ, De Beer FC, Van der Westhuyzen DR. ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36. *J Lipid Res.* 2004;45:706-15.
 20. Castellani LW, Gargalovic P, Febbraio M, Charugundla S, Jien ML, Lusis AJ. Mechanisms mediating insulin resistance in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-II. *J Lipid Res.* 2004;45:2377-87.
 21. Warden CH, Daluiski A, Bu X, Purcell-Huynh DA, De Meester C, Shieh BH, et al. Evidence for linkage of the apolipoprotein A-II locus to plasma apolipoprotein A-II and free fatty acid levels in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:10886-90.
 22. Van't Hooft FM, Ruotolo G, Boquist S, De Faire U, Eggertsen G, Hamsten A. Human evidence that the apolipoprotein a-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Circulation.* 2001;104:1223-8.
 23. Hanson RL, Ehm MG, Pettitt DJ, Prochazka M, Thompson DB, Timberlake D, et al. An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1130-8.
 24. Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hassstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes.* 1999;48:1175-82.
 25. Vionnet N, Hani El H, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1470-80.
 26. Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, et al. A genomewide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a UK population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 2001;69:553-69.
 27. Hsueh WC, St Jean PL, Mitchell BD, Pollin TI, Knowler WC, Ehm MG, et al. Genome-wide and fine-mapping linkage studies of type 2 diabetes and glucose traits in the Old Order Amish: evidence for a new diabetes locus on chromosome 14q11 and confirmation of a locus on chromosome 1q21-q24. *Diabetes.* 2003;52:550-7.
 28. Allayee H, Castellani LW, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res.* 2003;92:1262-7.
 29. Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet.* 2004;36:371-6.
 30. Putt W, Palmen J, Nicaud V, Tregouet DA, Tahri-Daizadeh N, Flavell DM, et al. Variation in USF1 shows haplotype effects, gene: gene and gene: environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1587-97.
 31. Julve J, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. On the mechanisms by which human apolipoprotein A-II gene variability relates to hypertriglyceridemia. *Circulation.* 2002;105:e129.
 32. Goudriaan JR, Den Boer MA, Rensen PC, Febbraio M, Kuipers F, Romijn JA, et al. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *J Lipid Res.* 2005;46:2175-81.
 33. Julve J, Escola-Gil JC, Marzal-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. Increased production of very-low-density lipoproteins in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II and fed with a high-fat diet. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1488:233-44.
 34. Ribas V, Palmer X, Roglans N, Rotllan N, Fievret C, Tailleux A, et al. Paradoxical exacerbation of combined hyperlipidemia in human apolipoprotein A-II transgenic mice treated with fenofibrate. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1737:130-7.
 35. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vazquez M, Adzet T, et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:232-9.
 36. Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F, Julve J. Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not increase their susceptibility to insulin resistance and obesity. *Diabetologia.* 2002;45:600-1.
 37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
 38. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68:850-8.
 39. Pastier D, Dugue S, Boisfer E, Atger V, Tran NQ, Van Tol A, et al. Apolipoprotein A-II/A-I ratio is a key determinant in vivo of HDL concentration and formation of pre-beta HDL containing apolipoprotein A-II. *Biochemistry.* 2001;40:12243-53.
 40. Fournier N, Cogny A, Atger V, Pastier D, Goudouneche D, Nicoletti A, et al. Opposite effects of plasma from human apolipoprotein A-II transgenic mice on cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:638-43.
 41. Rotllan N, Ribas V, Calpe-Berdiel L, Martin-Campos JM, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:e128-32.
 42. Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science.* 1994;264:1471-4.
 43. Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J, Shimada M, Ohashi K, et al. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem.* 1996;271:22422-7.
 44. Out R, Kruyt JK, Rensen PC, Hildebrand RB, De Vos P, Van Eck M, et al. Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism. *J Biol Chem.* 2004;279:18401-6.
 45. Ziouzenkova O, Perrey S, Asatryan L, Hwang J, MacNaul KL, Moller DE, et al. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:2730-5.
 46. Julve J, Escola-Gil JC, Ribas V, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J, Sanchez-Quesada JL, et al. Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II. *J Lipid Res.* 2002;43:1734-42.
 47. Ng DS, Xie C, Maguire GF, Zhu X, Ugwu F, Lam E, et al. Hypertriglyceridemia in lecithin-cholesterol acyltransferase-deficient mice is associated with hepatic overproduction of triglycerides, increased lipogenesis, and improved glucose tolerance. *J Biol Chem.* 2004;279:7636-42.
 48. Xu J, Xiao G, Trujillo C, Chang V, Blanco L, Joseph SB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) influences substrate utilization for hepatic glucose production. *J Biol Chem.* 2002;277:50237-44.
 49. Edvardsson U, Von Lowenhelm HB, Panfilov O, Nystrom AC, Nilsson F, Dahllof B. Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics.* 2003;3:468-78.
 50. Liang CP, Tall AR. Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver. *J Biol Chem.* 2001;276:49066-76.
 51. Zhang J, Herscovitz H. Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B. *J Biol Chem.* 2003;278:7459-68.