

El gen de la apolipoproteína A5 se expresa en el intestino humano

Montse Guardiola, Adriana Álvaro, Joan Carles Vallvé, Roser Rosales, Lluís Masana y Josep Ribalta

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi. Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona. España.

Introducción. La apolipoproteína (apo) A-V es clave en la regulación de los valores plasmáticos de los triglicéridos (TG) y se expresa en el hígado, donde se postula que dificulta el proceso de síntesis y/o ensamblaje de las lipoproteínas de muy baja densidad. Por esto, si participa en el proceso de formación de las lipoproteínas ricas en TG, también debería expresarse en el intestino delgado, porque en humanos es, junto al hígado, el otro órgano encargado de la biosíntesis de estas partículas.

Material y métodos. Hemos analizado la expresión génica mediante retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a tiempo real de *apo A5*, *apo B* y *MTP* (genes clave en el proceso de síntesis y secreción de partículas ricas en TG, tanto en el hígado como en el intestino), y de *apo C3* (otro gen importante en el metabolismo de los TG) en un modelo celular de intestino humano (células TC-7) y en muestras de hígado e intestino humanos.

Resultados. La apo A5 se expresa en los ámbitos génico y proteico en el modelo de células intestinales, y al confirmar el resultado en las muestras de intestino humano hemos visto que se expresa principalmente en el duodeno y en el colon, y, por el contrario, la apo B se expresa principalmente en el duodeno, el yeyuno y el ileoceco; la proteína MTP principalmente en el duodeno y en el yeyuno, y la apo C3, en el yeyuno.

Al analizar su relación con la expresión hepática, hemos visto que todos estos genes se expresan más en el hígado que en el intestino.

Conclusiones. La apo A5 se expresa a valores bajos en el intestino delgado humano y está correlacionado inversamente con la expresión de los genes clave en el proceso de síntesis de lipoproteínas.

Palabras clave:

Apo A5. Intestino delgado. Síntesis de lipoproteínas.

THE APOLIPOPROTEIN A5 GENE IS EXPRESSED IN THE HUMAN INTESTINE

Introduction. Apolipoprotein A-V is a key gene regulating plasmatic levels of TG, that is expressed in the liver where it has been postulated that affects the synthesis and/or assembly process of VLDL particles. Therefore, we hypothesise that if it is involved in TG rich lipoproteins' formation it should also be expressed in the small intestine, since in humans, together with the liver, is the other organ responsible on the biosynthesis of such particles.

Material and methods. We have analysed the gene expression, using real time RT-PCR, of *apo A5*, *apo B* and *MTP* (key genes in the synthesis and secretion of TG rich lipoproteins in the liver and intestine), and *apo C3* (another key gene regulating TG metabolism) in a cellular model of human intestine cells (TC-7) and in human liver and intestine samples.

Results. We have detected apo A5 gene expression and protein expression in the intestinal cellular model, and when confirming this result in human intestine samples we have found that is mainly expressed in duodenum and colon, and on the contrary, apo B is expressed mainly in duodenum, jejunum and ileocecum, MTP mainly in duodenum and jejunum, and apo C3 in jejunum.

Todos los autores han contribuido a la idea del diseño, interpretación de resultados y revisiones críticas del borrador hasta su versión final.

Correspondencia: Dr. J. Ribalta.
Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi.
Facultat de Medicina. Universitat Rovira i Virgili.
Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. Tarragona. España.
Correo electrónico: josep.ribalta@urv.cat

Recibido el 25 de marzo de 2008 y aceptado el 19 de mayo de 2008.

When analysing its relation with their hepatic expression levels, we have found that all these genes are more expressed in the liver than in the intestine.

Conclusions. Apo A5 is expressed at low levels in human small intestine and is inversely correlated with the expression of the key genes in the lipoproteins' synthesis and secretion process.

Key words:

Apo A5. Small intestine. Synthesis of lipoproteins.

Introducción

La síntesis y la secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG) es un proceso complejo que tiene lugar principalmente en el intestino delgado y en el hígado, y por ello, son órganos cruciales en el control de la homeostasis de los lípidos. En ambos tejidos, la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP) y la apolipoproteína (apo) B son proteínas esenciales en el proceso de ensamblaje y secreción de las lipoproteínas¹. El hígado expresa sólo apo B100, mientras que el intestino puede sintetizar apo B100 y apo B48². El proceso de síntesis de lipoproteínas se inicia con la traducción de la apo B, que es lipidada por la MTP y que resulta en una partícula lipoproteica. Además, ambos órganos son diana para los principales fármacos hipolipemiantes: inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa (hígado) e inhibidores de la absorción de colesterol (intestino)³.

Los lípidos y las vitaminas liposolubles de la dieta los absorbe el intestino delgado, donde se incorporan en las lipoproteínas para su transporte en circulación y posterior distribución a los tejidos. Las células intestinales sintetizan y secretan varios tipos de lipoproteínas que pueden clasificarse como quilomicrones (Q), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL)⁴, aunque principalmente secretan Q.

El hígado es el principal lugar de movilización de lípidos endógenos. Secreta VLDL que contienen lípidos provenientes de las partículas remanentes que el hígado capta, o lípidos que se sintetizan de novo.

No obstante, aún no están totalmente claros los mecanismos que regulan el ensamblaje y la secreción de lipoproteínas en hígado e intestino. En los últimos años, ha emergido un nuevo gen como candidato a participar en este proceso. El gen *apo A5* se descubrió cuando se compararon las secuencias de ADN genómico entre humanos y ratones⁵, y también en relación con el estudio de genes impli-

cados en el proceso de regeneración hepática en ratas⁶. Ambos trabajos describieron que la apo A5 se expresa exclusivamente en el hígado. Los resultados tanto en modelos animales como en estudios de asociación, indican que la apo A5 tiene una gran influencia en las concentraciones circulantes de TG⁶⁻¹². También se ha propuesto que regula la síntesis y/o la secreción de lipoproteínas requeridas durante el proceso de regeneración hepática⁶.

Aún no se conoce bien el mecanismo por el que la apo A5 ejerce esta influencia. Datos in vitro indican que puede participar en la síntesis y/o secreción de partículas VLDL en el hígado¹³, y también que puede estimular la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL)¹⁴⁻¹⁶, e indirectamente facilitar el aclaramiento de las lipoproteínas ricas en TG del compartimiento plasmático¹⁷⁻¹⁹. En circulación, apo A-V se encuentra en las lipoproteínas ricas en TG y en las partículas HDL a concentraciones muy bajas²⁰, y mientras en modelos animales la expresión de la apo A5 se correlaciona inversamente con las concentraciones de TG, la mayoría de estudios en humanos muestran que las concentraciones circulantes de apo A-V se correlacionan positivamente con las concentraciones de TG²⁰⁻²³.

Últimamente se debate si puede desempeñar un papel importante en circulación, teniendo en cuenta las concentraciones bajas. En vista de los resultados existentes, nuestra hipótesis es que la apo A-V desempeña un papel en la síntesis de las lipoproteínas. Si ello es así, puede estar presente no sólo en el hígado, sino también en el intestino. Para demostrarlo, hemos analizado la expresión de la apo A5 en muestras de intestino delgado humano, y la de otros genes clave en el proceso de síntesis y ensamblaje de lipoproteínas ricas en TG (apo B y MTP) y otro gen clave en la regulación de los valores circulantes de TG (apo C3).

Material y métodos

Muestras

Cultivo de células TC-7. Las células TC-7 de carcinoma de colon humano (subclones de las células Caco-2) se obtuvieron de Celltec (Barcelona). Las células se cultivaron en frascos de plástico de 75 cm², a una densidad de $1,25 \times 10^4$ células/cm² en medio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 20% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen [Carlsbad, Estados Unidos]), a 37 °C en una atmósfera húmeda de dióxido de carbono al 5%. Después de llegar a un 80% de confluencia (4-5 días después de sembrarlas), las células fueron tripsinizadas. Los experimentos de expresión de ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm) se llevaron a cabo con células cultivadas en placas de cultivo de 6 pocillos de Nunc (Wiesbaden, Alemania) y para los experimentos de expresión

de proteínas las células se cultivaron en placas de cultivo de 10 cm². En todos los experimentos, después de llegar a la confluencia (6-7 días después de sembrarlas), las células crecieron 21 días adicionales para alcanzar la diferenciación. En todos los casos el medio se cambiaba 3 veces por semana.

Poli A+ ARN. Las muestras de ARN poli A+ humano de hígado, intestino delgado, duodeno, yeyuno, íleo, ileoceco y colon se obtuvieron de BD Biosciences Clontech (Franklin Lakes, Estados Unidos).

Extracción del ARN y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real semicuantitativa

La extracción de ARN total de las células cultivadas se llevó a cabo utilizando el equipo de extracción ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation de Applied Biosystems (Foster City, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y la concentración del ARN se han estimado mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm. Se retrotranscribió 1 µg de ARN a ADNc utilizando *random hexamers* con la transcriptasa inversa SuperScript II siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y utilizando el termociclador PE Biosystems 2400 (Foster City, Estados Unidos).

La expresión del ARNm de los genes a estudio se cuantificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real utilizando el equipo ABI Prism 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), combinado con la utilización de oligonucleótidos y sondas Taqman[®] obtenidos de Applied Biosystems como productos Assays-on-Demand validados y prediseñados. El gen *GAPDH* se utilizó como control endógeno y los valores de expresión se calcularon de acuerdo con el método de $\Delta\Delta Ct$ (ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User bulletin n.º 2. Revisión A. Foster city [CA]: Applied Biosystems, 1997).

Extracción de proteínas y Western blot de apo A5

Los lisados totales de las células TC-7 se obtuvieron mediante repetidas congelaciones y descongelaciones en un tampón de homogeneización que contenía PBS a pH 7,4 e inhibidores de la proteasa Complete-Mini Protease (Roche, Mannheim, Alemania). Las muestras se dejaron a -80 °C hasta su posterior utilización. La proteína total se determinó utilizando el método Bradford²⁴. La electroforesis y el *blotting* se llevaron a cabo utilizando el sistema de análisis de proteínas NUPAGE[®] de Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos). La membrana de *blotting* se bloqueó con un 4% de reactivo ECL Advance Blocking Reagent de Amersham Biosciences (Bucks, Reino Unido) y después se incubó con anticuerpo anti-apo A5 a una dilución de 1:2.500 de Novus Biologicals (Littleton, Estados Unidos). Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron incubando la membrana con inmunoglobulinas policlonales de cabra anti-ratón/HRP a una dilución de 1:20.000 de Dako (Glostrup, Dinamarca). Las señales se detectaron con una mezcla de ECL Advanced Reagent y las bandas se visualizaron con un film de autorradiografía.

Resultados

Expresión génica de apo A5 en células TC-7 y en intestino humano

Utilizando retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a tiempo real semicuantitativa con el gen *GAPDH* como control en-

dógeno detectamos la expresión de apo A5 en células intestinales en cultivo TC-7 en los últimos ciclos de amplificación, lo cual indica que se expresa a valores bajos.

El resultado positivo obtenido de las células TC-7 se confirmó en muestras de ARN de intestino delgado humano obtenidas de BD Biosciences Clontech (Franklin Lakes, Estados Unidos). Analizamos la expresión génica de apo A5, apo B, MTP y apo C3 en las muestras de ARN poli A+ humano de duodeno, yeyuno, íleo, ileoceco y colon. Utilizando RT-PCR a tiempo real semicuantitativa y cogiendo como valor de referencia la expresión obtenida en el segmento intestinal con los mayores valores de expresión para cada gen, confirmamos la presencia de expresión de apo A5 y encontramos que está principalmente expresada en duodeno y colon, y por contra, apo B y MTP están principalmente expresadas en el duodeno, el yeyuno y el ileoceco y en el duodeno y el yeyuno, respectivamente; por su parte, apo C3 se expresa principalmente en yeyuno. A excepción del duodeno, la expresión de apo A5 se correlaciona inversamente con la expresión de apo B (fig. 1).

Comparación con la expresión en el hígado

Analizamos los valores bajos de expresión del gen *apo A5* respecto a una muestra de ARN poli A+ de hígado humano también obtenida de BD Biosciences Clontech (Franklin Lakes, Estados Unidos). A su vez, también determinamos la expresión de los otros genes implicados en la regulación del proceso de síntesis y ensamblaje de lipoproteínas ricas en TG y de los valores de TG circulantes (*MTP*, *apo B* y *apo C3*, respectivamente) tanto en muestras de intestino delgado completo como de hígado.

Todos los genes estudiados presentan valores mayores de expresión en hígado que en intestino, donde destaca el gen *apo A5* que se expresa 32.000 veces más en el hígado que en el intestino delgado, y 3,5 veces más en el caso de *MTP*; 41 veces más en el caso de *apo B*, y 160 en el caso de *apo C3* (fig. 2).

Al comparar la expresión de los genes entre ellos en los 2 órganos, vemos que, en el hígado, *apo C3* se expresa 35 veces más que *apo A5*; *apo B* se expresa casi al mismo nivel que *apo A5* (0,7 frente a $1,2^{-\Delta\Delta Ct}$), y *apo B* se expresa la mitad en relación con *apo A5*. En el intestino delgado, encontramos que *apo C3* se expresa 7.000 veces más que *apo A5*, el gen *MTP* se expresa 5.000 veces más, y *MTP* lo hace 550 veces más que *apo A5* (fig. 2).

Expresión proteica de apo A-V en células TC-7

El Western blot se mejoró para detectar apo A-V en lisados totales obtenidos de células TC-7, y tam-

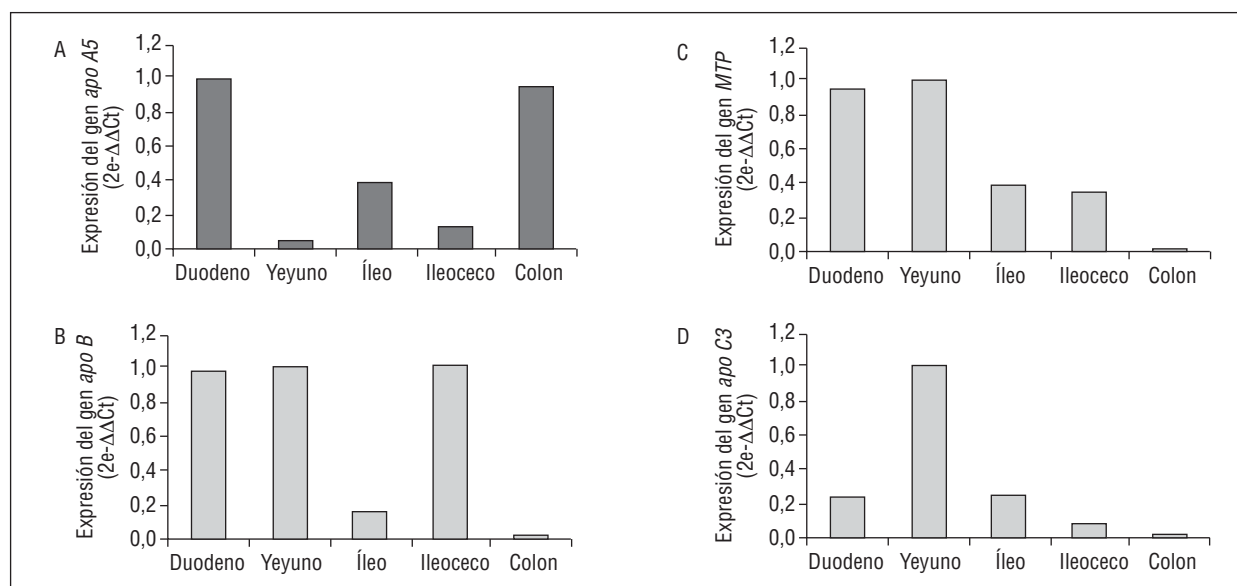


Figura 1. Niveles de expresión de los genes *apo A5* (A), *apo B* (B), *MTP* (C) y *apo C3* (D) determinados mediante retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, utilizando el gen GAPDH como control endógeno de expresión, en muestras de ácido ribonucleico poli A+ humano de diferentes secciones de intestino delgado, que se obtuvieron de BD Biosciences Clontech.

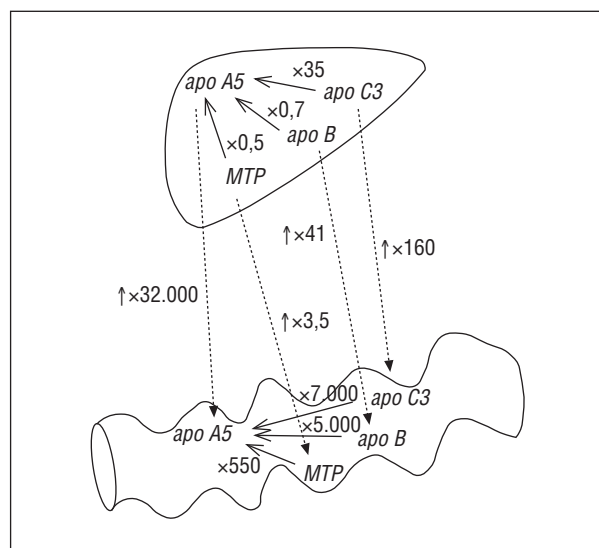


Figura 2. Representación de las relaciones de expresión entre los genes *apo A5*, *apo B*, *MTP* y *apo C3*, en el órgano (hígado o intestino) y entre órganos (en relación con el valor en el hígado).

bién de células hepáticas HepG2, como control positivo, y de monocitos THP-1, como control negativo. Esto confirmó los resultados obtenidos con la expresión génica, es decir, la existencia de apo A-V en células intestinales TC-7 a menor concentración que la encontrada en las células hepáticas (fig. 3).

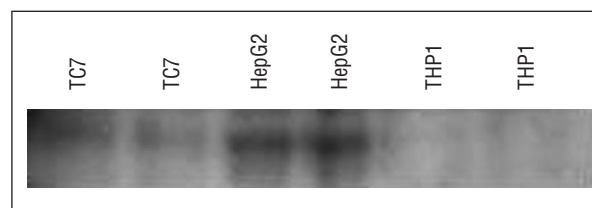


Figura 3. Valores de la apolipoproteína A-V determinados mediante Western blot en lisados totales de células intestinales TC-7, y también de células hepáticas HepG2 (utilizadas como control positivo) y de monocitos THP-1 (utilizados como control negativo), por duplicado.

Discusión

Siguiendo nuestra hipótesis, que la apo A-V participa en el proceso de síntesis y secreción de partículas ricas en TG (Q y VLDL), además de en el hígado, también debería expresarse en el intestino delgado (que es el otro tejido en humanos implicado en la síntesis de lipoproteínas ricas en TG). Los resultados presentados en este artículo muestran que el gen *apo A5* se expresa en células intestinales TC-7 y en intestino delgado humano, aunque sus valores de expresión son significativamente más bajos que en hígado.

Estos resultados se han obtenido en células TC-7 (subclones de las células Caco-2), que son uno de los modelos celulares más utilizados para estudiar los procesos de absorción, transporte y metabolis-

mo de lípidos y lipoproteínas²⁴, y también, en muestras de intestino delgado humano. Aunque hemos detectado expresión del gen y proteína de apo A5 en las células intestinales, con estos resultados no podemos afirmar si esta proteína es funcional, ni cuál podría ser su papel en el intestino, pero resultados preliminares (datos no presentados), nos muestran que la expresión de apo A5 en el modelo de células intestinales responde a estímulos ambientales. La expresión de apo A5 se ve modificada por la incubación de las células TC-7 con diferentes tipos de ácidos grasos (de cadena larga y de cadena corta), y por la incubación con un compuesto agonista del receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa (PPAR α), que es el receptor nuclear que se activa durante el tratamiento hipolipemiente con fibratos en humanos. Una vez activado, el PPAR α regula la expresión de genes clave en el metabolismo de los lípidos, como la expresión de apo A5 en hepatocitos humanos^{25,26}.

Aún sin poder afirmar cuál es la función de la apo A-V intestinal, a partir de los resultados publicados^{13,15,20}, podemos plantear 2 posibilidades: la primera, que en el intestino la proteína se secrete junto con las HDL, para posteriormente transferirse a las partículas ricas en TG, o la segunda, que participe en el proceso de formación de partículas ricas en TG de la dieta, para luego ser secretada junto con estas partículas, y así facilitar la hidrólisis de los TG que contienen. Nuestros datos indican un vínculo con esta última opción. Por un lado, la apo A-V, en intestino delgado humano, se expresa principalmente en el duodeno, donde tiene lugar la absorción intestinal de lípidos de la dieta, que serán empaquetados en las lipoproteínas que pasarán a la circulación, para distribuirse por el organismo, y además, la secuencia génica de apo A5, tanto humana como de roedores, es altamente homóloga a la de la apo A4^{5,6}, que participa en el proceso de absorción de lípidos en intestino. Nuestros resultados también muestran que, globalmente, hay una correlación inversa entre la expresión del gen *apo A5*, y la de los genes *apo B* y *MTP* (implicados en la síntesis y la secreción de partículas ricas en TG). Ello indica que una expresión relativamente alta de apo A5 puede estar acompañada de una baja actividad relativa de la maquinaria de síntesis de lipoproteínas.

Al detectar que los valores de expresión intestinal eran bajos, los comparamos con la expresión del gen en hígado, hasta la fecha el único órgano de expresión de apo A5 en humanos. Hemos visto que el valor de expresión del gen *apo A5* entre ambos órganos es muy distinto, aunque los análisis de

Western blot han indicado que, a pesar de las grandes diferencias en el grado de expresión, las concentraciones finales de proteína en las células intestinales pueden no ser tan bajas, ya que calculamos que representan aproximadamente un tercio en relación con los valores de proteína en las células hepáticas. Además, creemos que una cierta diferencia entre los valores de apo A5 entre intestino delgado e hígado, a favor del hígado, es esperable, si tenemos en cuenta que el hígado es el principal órgano de movilización de lípidos endógenos, y que a su vez controla la homeostasis lipídica del organismo. El hígado secreta las VLDL que contienen lípidos derivados de las partículas remanentes que ha captado de la circulación, o que contienen lípidos sintetizados de novo.

Por tanto, los resultados de este estudio parecen ampliar el campo de acción de la apo A-V dentro del metabolismo lipídico. Esta proteína ganó mucho interés con su descubrimiento en 2001, debido a la contundencia y la fuerza de los resultados de los primeros trabajos en modelos animales y en estudios de asociación, y se planteó como el principal modulador genético de los valores de TG. Últimamente se pone en entredicho su papel. Ello se debe a que los resultados de los primeros estudios, que han determinado los valores de proteína circulante, no muestran la misma fuerte relación con los valores de TG. Por ello, creemos que serán necesarios futuros estudios que profundicen sobre el papel de la proteína intestinal, para ayudar a esclarecer si el gen es clave en la regulación de los valores de TG, tal como se afirmó en un principio.

Agradecimientos

Este estudio se ha llevado a cabo gracias al apoyo del CIBERDEM.

Bibliografía

1. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* 2003;44:22-32.
2. Hoeg JM, Sviridov DD, Tennyson GE, Demosky SJ Jr, Meng Ms, Bojanovski D, et al. Both apolipoproteins B-48 and B-100 are synthesized and secreted by human intestine. *J Lipid Res.* 1990;31:1761-9.
3. Schmitz G, Schmitz-Madry A, Ugocsai P. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:164-73.
4. Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis.* 2000;148:1-15.
5. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science.* 2001;294:169-73.

6. Van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Borres W, et al. Apolipoprotein A-V. A novel protein associated with early phase of liver regeneration. *J Biol Chem.* 2001; 276:44512-20.
7. Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JHM, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295:1156-9.
8. Ribalta J, Figuera L, Fernández-Ballart J, Vilella E, Castro Cabezas M, Masana L, et al. New apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem.* 2002;48:1597-600.
9. Masana L, Ribalta J, Salazar J, Fernández-Ballart J, Joven J, Castro Cabezas M. The apolipoprotein AV and diurnal triglyceridemia in normolipidaemic subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:517-21.
10. Guardiola M, Ferré R, Salazar J, Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Protease inhibitor-associated dyslipidemia in HIV-infected patients is strongly influenced by the APOA5 -1131T>C gene variation. *Clin Chem.* 2006;52:1914-9.
11. Sundl I, Guardiola M, Khoschsorur G, Solà R, Vallvé JC, Godàs G, et al. Increased concentrations of circulating vitamin E in carriers of the apolipoprotein A5 gene -1131T>C variant and associations with plasma lipids and lipid peroxidation. *J Lipid Res.* 2007;48: 2506-13.
12. Hubacek JA. Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43: 897-902.
13. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem.* 2003;278:34438-44.
14. Schaap FG, Rensen PCN, Voshol PJ, Vriens C, Van der Vliet HN, Chamuleau RA, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-TG (VLDL-TG) production and stimulating Lipoprotein Lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem.* 2004;279:27941-7.
15. Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319:397-404.
16. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabio N, Geppert G, Pennacchio LA, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 2005;280:21553-60.
17. Grosskopf I, Baroukh N, Lee SJ, Kamari Y, Hartas D, Rubin EM, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2573-9.
18. Nilsson SK, Lookene A, Beckstead JA, Gliemann J, Ryan RO, Olivercrona G. Apolipoprotein A-V interaction with members of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Biochemistry.* 2007;46:3896-904.
19. Dichlberger A, Cogburn LA, Nimpf J, Schneider WJ. Avian apolipoprotein A-V binds to receptor gene family members. *J Lipid Res.* 2007;48:1451-6.
20. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem.* 2005;51:351-9.
21. Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Pagano M, Takano M, Ishii J, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J Lipid Res.* 2005;46: 2015-22.
22. Dallinga-Thie GM, Van Tol A, Hattori H, Van Vark-van der Zee LC, Cansen H, Sijbrands EJ; DALI Study group. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006;49:1 505-11.
23. Vaessen SF, Schaap FG, Kuivenhoven JA, Groen AK, Hutten BA, Boekhoudt SM, et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary heart disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res.* 2006;47:2064-70.
24. Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J.* 1995;9:626-35.
25. Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Baugé E, Dehondt H, et al. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α activators. *J Biol Chem.* 2003;278:179-82.
26. Prieur X, Coste H, Rodríguez JC. The human apolipoprotein AV gene is regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and contains a novel Farnesoid X-activated Receptor Response Element. *J Biol Chem.* 2003;278:254-68.