

El polimorfismo -1131 T>C del promotor del gen de la apolipoproteína A5 altera la unión de NRF2 (*nuclear respiratory factor-2*) y disminuye la actividad del promotor

Sandra Pampín^a, Bibiana García-Bailo^b, José María Ordovás^b y José Carlos Rodríguez-Rey^a

^aDepartamento de Biología molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander. Cantabria. España.

^bNutrition and Genomics Laboratory. JM-USDA Human Nutrition Research Center on Aging. Tufts University. Boston. USA.

Introducción. El papel que desempeñan los triglicéridos (TG) ingeridos en la dieta en la aparición de aterosclerosis es controvertido. Sin embargo, recientemente se ha descrito que los valores de TG en estado posprandial son un factor de riesgo independiente para la aparición de esta enfermedad. Recientemente, se ha identificado la apolipoproteína (Apo) AV como una proteína clave en la regulación del metabolismo de los TG. El polimorfismo -1131 T>C del gen de la ApoA5 se ha asociado con cambios en los valores plasmáticos de TG y de ApoAV. El objetivo de este trabajo fue determinar el papel del polimorfismo -1131 T>C en la expresión del gen *ApoA5*.

Material y métodos. Con el fin de estudiar la influencia de este *single nucleotide polymorphisms* (SNP) en la expresión de este promotor, se han utilizado construcciones de genes reporteros de ambos alelos. Mediante experimentos de retardo en gel se demostró que este polimorfismo también altera la secuencia de unión a NRF-2.

Conclusiones. Nuestros resultados indicaron que la actividad del promotor de ApoA5 que porta la variante T del SNP -1131 T>C es mayor que la del promotor que lleva el alelo C. Además, este cambio de nucleótido se traduce en un cambio de afinidad proteínas-ácido desoxirribonucleico. Estos resultados indican que un cambio en la actividad del promotor del gen *ApoA5* podría ser la causa del incremento de los valores plasmáticos de TG asociados con el alelo C.

Palabras clave:

ApoA5. NRF2. rSNPs. Expresión genética.

-1131 T>C POLYMORPHISM OF THE APOLIPOPROTEIN A5 GENE PROMOTER ALTERS THE BINDING OF NRF2 (NUCLEAR RESPIRATORY FACTOR 2) AND DECREASES PROMOTER ACTIVITY

Introduction. Postprandial triglycerides (TG) have been established as an independent risk factor for atherosclerosis, even though the role of fasting TG in the pathogenesis of this disease remains controversial. Recently, apolipoprotein AV (ApoAV) has been identified as a key player in TG metabolism. The -1131 T>C polymorphism in the *ApoA5* gene promoter has been associated with changes in plasma triglyceride and ApoAV levels. Our objective was the functional analysis of the SNP -1131 T>C located on *ApoA5* promoter to clarify his effect on *ApoA5* expression.

Material and methods. In order to test if this SNP influences promoter function, we have performed

Este trabajo se realizó gracias a la obtención de una ayuda de investigación básica de la FEA/SEA concedida en el año 2007.

Correspondencia: Dr. J.C. Rodríguez-Rey.
Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria.
Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011. Santander. Cantabria.
España.
Correo electrónico: rodrigu@unican.es

Recibido el 18-09-2008 y aceptado el 12-2-2009.

reporter gene assays. Our results indicated that the promoter carrying the T allele is stronger than its C-allele variant. Additionally electrophoretic-mobility shift assays showed that the variant also produces a change in a NRF-2 binding site.

Conclusions. Together, these results suggest that a change in the activity of *ApoA5* promoter could be responsible for the increases in plasma TG levels associated with the C allele.

Key words:

APOA5. NRF2. rSNPs. Transcription levels.

Introducción

La apolipoproteína (Apo) AV es una apolipoproteína plasmática que participa de la formación de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de alta densidad (HDL), así como de los quilomicrones. El gen *ApoA5* se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 humano y forma parte de una agrupación génica que incluye los genes de las *ApoA1*, *ApoC3* y *ApoA4*. Experimentos llevados a cabo con ratones transgénicos indican un papel importante de la ApoAV en la homeostasis de los triglicéridos (TG). Además, ratones *knock out* para *ApoA5* presentan valores más bajos de proteína ApoAV y valores más elevados de TG en plasma que los ratones control^{1,2}. Por otra parte, la sobreexpresión de *ApoA5* en ratones, tanto de origen humano como murino, disminuye la cantidad de TG en sangre^{1,3,4}, lo que está de acuerdo con los efectos observados con algunas mutaciones puntuales, las cuales originan proteínas truncadas a partir de este gen, y que resultan en el incremento de los valores de TG en plasma⁵⁻⁷. Además, también se ha descrito que en ausencia de *ApoA5* se incrementa la síntesis de VLDL, que son sustratos pobres de la lipoproteína lipasa (LPL)², e incluso se ha descrito que la *ApoA5* funciona como un coactivador de la LPL^{4,8}. Todos estos datos podrían explicar el incremento de los valores plasmáticos de TG observados cuando disminuye la cantidad de *ApoA5*.

Se han estudiado diversas variantes del gen *ApoA5* con el fin de explicar las diferencias de concentración de TG en sangre descritas en varias poblaciones. En muchos estudios de asociación realizados utilizando *single nucleotide polymorphisms* (SNP) de *ApoA5* como marcadores, se ha puesto de manifiesto que 3 de estos SNP (56 C>G, 553 G>T y -1131 T>C) destacan en las asociaciones genotipo-fenotipo^{9,10}. De todos estos SNP del gen *ApoA5*, el polimorfismo -1131 T>C (*rs662799*) es el más estudiado, ya que el alelo minoritario -1131 C se ha

asociado con concentraciones mayores de TG en mujeres del estudio Framingham¹¹, asociación que se confirmó posteriormente en varones en el estudio LOCAT¹². El efecto del SNP -1131 T>C se ha demostrado en poblaciones de diferente origen étnico¹³ y está afectado por la ingesta de ácidos grasos omega 6¹⁴. Estudios recientes llevados a cabo con la cohorte de EPIC-Norfolk han confirmado que el alelo -1131C se asocia con concentraciones altas de TG y, lo que es aún más interesante, con concentraciones bajas de *ApoA5*, lo que indica que este polimorfismo podría estar afectando a la expresión de este gen¹⁵.

Con el fin de comprobar si el polimorfismo localizado en la posición -1131 del promotor de *ApoA5* produce algún cambio funcional en el ámbito molecular, hemos medido la actividad luciferasa de ambos alelos y analizado la potencia de ambos promotores en células originarias de hepatoma humano (HepG2). Por otra parte, se ha demostrado en este trabajo que el cambio de nucleótido provocado por la presencia del SNP -1131 T>C altera la unión del factor de transcripción NRF2 (*nuclear-respiratory factor 2*), lo que indica un posible mecanismo por el cual este SNP podría alterar la cantidad de TG plasmáticos.

Material y métodos

Construcción de plásmidos reporteros

Se clonó un fragmento de promotor del gen *ApoA5* de un tamaño de 1379 pb, que comprende desde las coordenadas -1316 a +63 relativas al sitio de inicio de transcripción como se describe en Prieur et al¹⁶. El fragmento se amplificó por reacción en cadena de polimerasa (PCR; los oligonucleótidos empleados para la realización del clonaje fueron: directo 5'-CCGAGCTGGCCTACATTTAC-3' y reverso: 5'-ATGCCCTCCCTTAGGACTGT-3'), y fue clonado en el plásmido sin promotor pGL3 basic (Promega). Se construyó un plásmido reportero con cada uno de los alelos en posición -1131, su secuencia se confirmó por secuenciación y se determinó que este polimorfismo era la única diferencia entre ellos.

Cultivo celular y transfección transitoria

La línea celular de hepatocarcinoma humano, HepG2, se creció en Dulbecco's Modified-Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Se sembraron 3×10^6 células/pocillo en placas T6 un día antes de la transfección. La transfección se hizo con el reactivo FuGene (Roche) según las instrucciones del fabricante. Se empleó 1 µg de plásmido reportero por pocillo. Como control interno se cotransfectaron 50 ng del plásmido pSV40-Renilla (Promega), en el que el gen de la luciferasa de Renilla se encuentra bajo el control del promotor temprano de pSV40. La actividad luciferasa se midió a las 48 h tras la transfección. La preparación de los extractos celulares para la medición de la actividad luciferasa se hizo utilizando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabri-

cante. Los experimentos se realizaron por triplicado y al menos se emplearon 3 muestras diferentes de ácido desoxirribonucleico (ADN) para cada alelo.

Experimentos de retardo en gel

Los extractos nucleares se prepararon a partir de células HepG2 en semiconfluencia. La secuencia de los oligonucleótidos de doble cadena empleados para la realización del ensayo de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) fueron: 5'-GGAAGTGGAGCGAAAGTAAGATTGCC-3' (directo) y 5'-GGCAAATCTTACTTTTCGTCCAGTT-3' (reverso) para el alelo T; y 5'-GGAGTGGAGCGAAAGTGAGATTGCC-3' (directo) y 5'-GGCAAATCTCACTTTTCGTCCAGTT-3' (reverso) para el alelo C. La preparación de los extractos nucleares, el marcaje de los oligos y las condiciones de electroforesis se realizaron según el protocolo descrito en Mozas et al¹⁷. Se añadieron 2 µg de anticuerpo anti-NRF2 (sc-722; Santa Cruz Biotechnology) a la mezcla para la realización del superretardo. El protocolo detallado se describe en Ordovas et al¹⁸. Para competir de manera inespecífica, se emplearon oligonucleótidos del gen *SLC30A8*: 5'-GGCAGCCAGCTGGGACAG-3' (directo) y 5'-GGCTGTCCAGCTGGCTG-3' (reverso).

Resultados y discusión

En trabajos previos realizados por el grupo de Prieur et al¹⁶, se mapeó el sitio de inicio de transcripción del gen *ApoA5* y se describieron algunos elementos reguladores contenidos en él. El fragmento de 1379 pb que se ha clonado y utilizado en este trabajo, se extiende desde la posición -1316 a +63 desde el lugar de inicio de la transcripción, y contiene la mayoría de los elementos esenciales para la expresión de *ApoA5* descritos hasta el momento.

Los resultados de los experimentos de transfección transitoria hechos con los plásmidos que contienen las 2 variantes alélicas del SNP -1131 T>C, se muestran en la figura 1. Las células transfectadas con el plásmido reportero que porta el alelo T mostraron una ratio de actividad luciferasa mayor que las transfectadas con el plásmido correspondiente al alelo C (ratio = $1,83 \pm 0,44$; $n = 5$; $p < 0,05$), lo que implica que el alelo T es un promotor más potente.

En otro trabajo del año 2003, se demuestra que los valores de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de *ApoA5* se correlacionan con los valores transcripcionales de los FT receptor alfa del activador-proliferador del peroxisoma (PPARα) y HNF4α¹⁹. Estas proteínas actúan por unión a elementos DR-1 que constituyen los denominados elementos de respuesta a PPAR (PPRE). Actualmente, se sabe que la regulación llevada a cabo a través de estos elementos es compleja. De hecho, estos elementos pueden integrar diferentes acciones inducidas por receptores nucleares, como RXR, RAR, HNF4 o COUP, dependiendo de la secuencia del elemento regulador y el contexto en el que se halle el promotor. Ya se había descrito la implicación de PPARα en el incremento

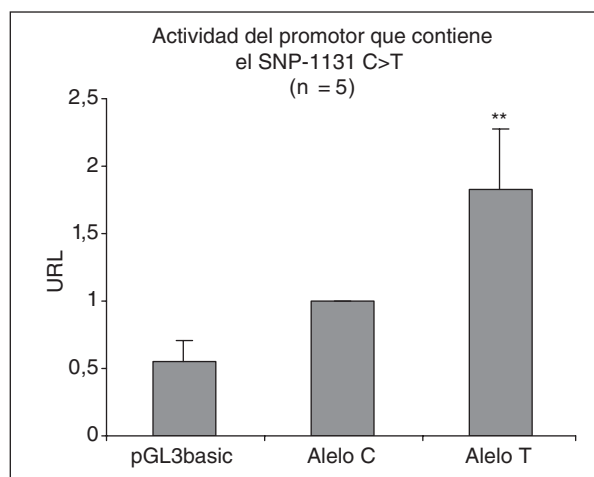


Figura 1. Efecto del single nucleotide polymorphism (SNP) -1131 T>C en la actividad del promotor. El fragmento de 1379 pb que contiene el SNP se clonó en posición 5' del gen luciferasa del plásmido pGL3. La actividad luciferasa se midió en células HepG2. Los experimentos se realizaron 5 veces a partir de diferentes muestras de ácido desoxirribonucleico. Los resultados se expresan en unidades relativas de luciferasa (URL).

de expresión del gen *ApoA5* en células hepáticas independientemente de la presencia de este SNP²⁰, así que para ver si había diferencias en la regulación de la expresión del gen *ApoA5* entre los 2 alelos de este polimorfismo en presencia de alguno de estos FT, se cotransfectaron en células HepG2 ambas variantes del promotor de *ApoA5* con plásmidos de expresión que contenían los FT HNF4α, y PPARγ. Como puede verse en la figura 2, las células cotransfectadas transitoriamente con el FT PPARγ y RXR, necesario para su unión al ADN, muestran un incremento de inducción de actividad promotora en ambas variantes, tanto en presencia como en ausencia de ciglitazona 3 µM (ciglitazona [CG]), un agonista específico de isoforma de PPARγ (ratio *ApoA5* T/*ApoA5* C + PPARγ/RXR: $2,8 \pm 0,6$; $n=3$, $p > 0,05$, mientras que la ratio *ApoA5* T/*ApoA5* C + PPARγ/RXR 3µM CG: $2,9 \pm 0,27$, $p < 0,05$), pero en ninguno de los 2 casos se observaron diferencias de activación entre ambos alelos en presencia de estas proteínas reguladoras respecto a lo observado en células control, lo que nos indica que son otros factores los que están implicados en la expresión diferencial de este promotor observada entre ambos alelos. También se testó la influencia de HNF4α, pero en este caso no se observó incremento de la actividad luciferasa con ninguno de los promotores cuando se cotransfectó esta proteína (datos no mostrados).

El que el cambio de un solo nucleótido en una región reguladora resulte en diferencias en la expresión

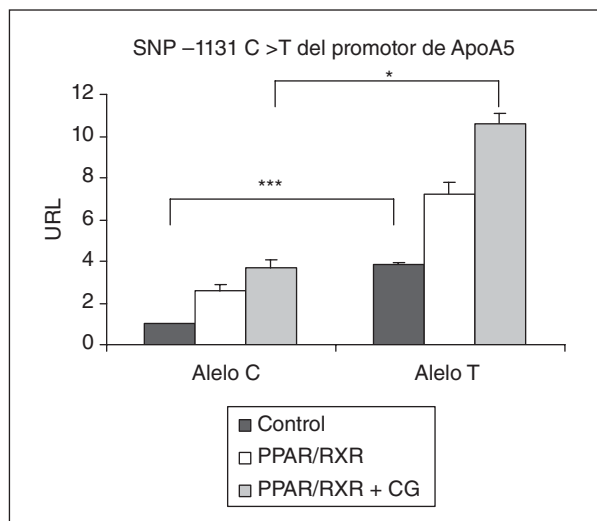


Figura 2. Efecto del factor de transcripción receptor gamma del activador-proliferador del peroxisoma (PPAR γ) sobre la expresión de los alelos del *single nucleotide polymorphism* (SNP) -1131 T>C. Se observa en esta figura el incremento de expresión de ambos promotores en presencia de PPAR γ y receptores retinoides X (RXR, del inglés retinoid X receptor) tanto en ausencia como en presencia del agonista específico de PPAR γ , la ciglitazona (CG) a una concentración 3 μ M. El aumento de actividad luciferasa observado es similar con ambos alelos.

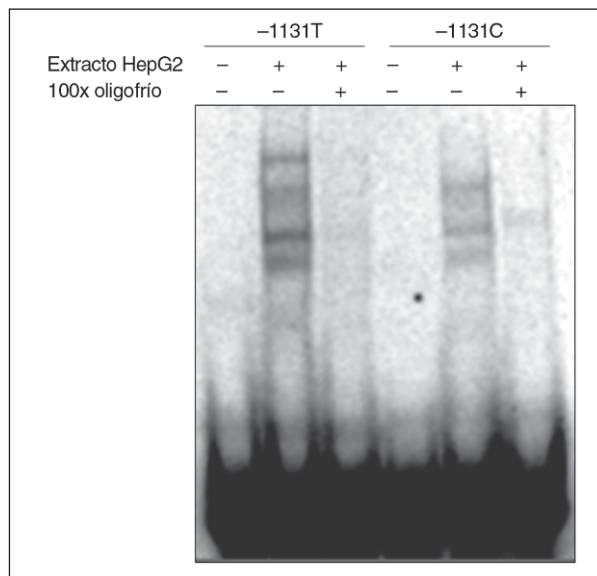


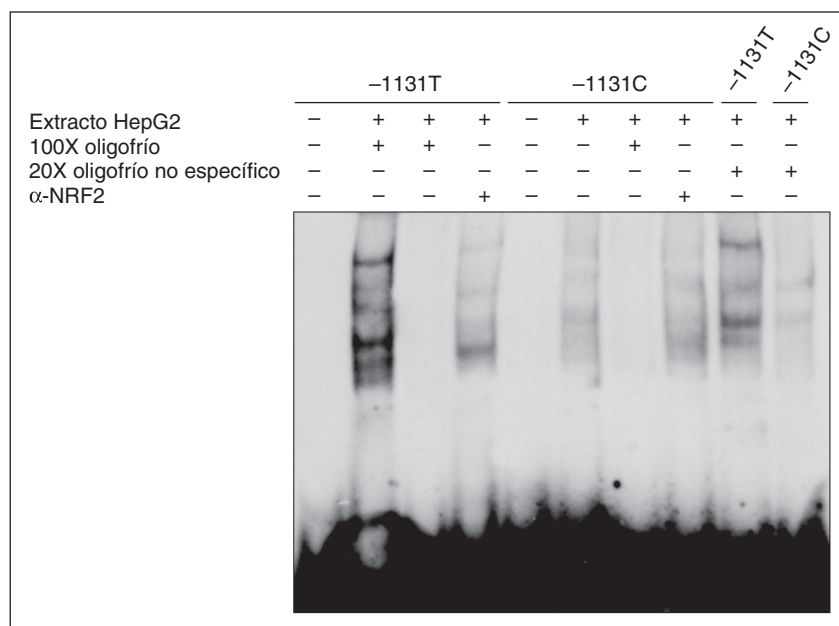
Figura 3. Las variantes -1131 T>C afectan a la unión proteína-ácido desoxirribonucleico. Los oligonucleótidos que portan los alelos del SNP -1131 T>C y el protocolo del experimento de retardo en gel (análisis de retardación de la movilidad electroforética [EMSA]) se indican en Material y métodos. En el primer carril del EMSA para cada alelo no se incluyó extracto nuclear, mientras que en los otros 2 carriles se incubó la mezcla de reacción con 15 μ g de extracto nuclear procedente de células HepG2. En el tercer carril se añadió a la mezcla de reacción un exceso 100x de sonda fría para competir el análisis.

sión de un gen, podría explicarse por un cambio en la unión de las proteínas reguladoras de la transcripción a esa secuencia de ADN. Para comprobar si el SNP -1131 T>C alteraba la afinidad de algún factor de transcripción por el ADN, se realizó un EMSA con oligonucleótidos específicos de cada alelo, los cuales se describen en el apartado de materiales y métodos. El EMSA que se muestra en la figura 3 es representativo de 7 experimentos realizados, y en todos ellos se obtuvo el mismo resultado. El EMSA realizado con el fragmento que porta el alelo T mostró 3 bandas retardadas. Esta unión se revirtió totalmente cuando se compitió con un exceso de cien veces de sonda fría. La formación de estos complejos proteína-ADN desaparecen cuando el análisis se realiza con los oligonucleótidos correspondientes al alelo C. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que este SNP produce la disminución de la activación del promotor debido a que altera la afinidad de unión entre complejos proteicos y el ADN.

Con el objeto de identificar qué factor de transcripción podría estar implicado en este cambio, se analizó la secuencia circundante a este SNP con 2 programas informáticos: Matinspector²¹ y MAPPER²². Ambas herramientas bioinformáticas indicaron que este cambio de base podría alterar la unión de NRF2, entre otros factores, a la secuencia de ADN. Esta posibilidad se confirmó tras realizar un super-retardo con el anticuerpo α -NRF2. En presencia de este anticuerpo, la intensidad de las bandas retardadas disminuyó de manera significativa, lo que indicaba que el factor de transcripción NRF2 podría estar formando parte de los complejos proteína-ADN (fig. 4) vistos en el retardo que se muestra en la figura 3. NRF2 es un factor de transcripción que controla la expresión de varios genes relacionados con la biogénesis y función mitocondrial en relación con los valores energéticos de la célula^{23,24}. La posibilidad de que hay una expresión coordinada del gen *ApoA5* en función del estado energético de la célula podría ser una hipótesis interesante para realizar futuros estudios en este sentido.

El efecto transcripcional del SNP -1131 T>C ha sido objeto de cierta controversia. En una publicación inicial de Talmud et al²⁵ se indicaba que no había diferencias de expresión entre ambos alelos. Sin embargo, cuando este manuscrito estaba en preparación, un artículo del mismo grupo mostraba que el cambio por sí mismo o en combinación con otros SNP podría alterar la potencia del promotor²⁶. Nuestros resultados apoyan esta evidencia. El cambio -1131 T>C del promotor de *ApoA5* resultó en una menor actividad del promotor. Si el alelo C tuviese el mismo efecto in vivo debería esperarse una cantidad menor de *ApoA5* en portado-

Figura 4. La proteína NRF2 forma parte de los complejos proteína-ácido desoxirribonucleico. Se empleó un anticuerpo específico para NRF2 en la reacción (calles 4 y 8 desde la izquierda). Un exceso de oligonucleótido frío 20x no específico se utilizó como control extra de la especificidad de las bandas retardadas (las 2 calles de la derecha). Se utilizaron 20 µg de extracto proteico para el realizar el análisis.



res de esta variante. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio realizado con la cohorte de EPIC-Norfolk, en los que se demostró una asociación entre el alelo C y menores valores de ApoA5¹⁵, y encajaría con un modelo en el cual el aumento de los valores de TG y/o riesgo cardiovascular serían resultado de la disminución de la expresión del gen *ApoA5*.

Al contrario de lo que ocurre con las variantes genéticas de regiones codificantes, las mutaciones en regiones reguladoras tienen efectos más suaves en el fenotipo. De acuerdo con esto, su efecto podría observarse sólo en condiciones ambientales determinadas. Es más, los SNP reguladores son muy frecuentes; según estudios recientes se estima que aproximadamente un tercio de los SNP que se localizan en regiones reguladoras tendrían alguna consecuencia funcional en la regulación de la expresión genética^{27,28}. En resumen, las regiones reguladoras constituyen dianas obvias para la búsqueda de mutaciones involucradas en la aparición de enfermedades complejas, como la hiperlipemia.

Bibliografía

- 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.
- Grosskopf I, Baroukh N, Lee SJ, Kamari Y, Harats 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.
- Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, 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.
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vries C, Van der Vliet HN, Chamuleau RA, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004;279:27941-7.
- Marcais C, Verges B, Charriere S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, et al. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest*. 2005;115:2862-9.
- Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotto L, Bellocchio A, Bertolini S, et al. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2006;188:215-7.
- Priore Oliva C, Pisciotto L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:411-7.
- Fruchart-Najib J, Bauge 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.
- Kao JT, Wen HC, Chien KL, Hsu HC, Lin SW. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet*. 2003;12:2533-9.
- Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lánská V, Poledne R. The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin Genet*. 2004;65:126-30.
- Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD, et al. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res*. 2004;45:2096-105.
- Talmud PJ, Martin S, Taskiran MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, et al. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res*. 2004;45:750-6.

13. Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, et al. The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res.* 2003;44:2365-73.
14. Lai CQ, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Adiconis X, Zhu Y, et al. Dietary intake of n-6 fatty acids modulates effect of apolipoprotein A5 gene on plasma fasting triglycerides, remnant lipoprotein concentrations, and lipoprotein particle size: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2006;113:2062-70.
15. Vaessen SF, Schaap FG, Kuivenhoven JA, Groen AK, Hutten BA, Boekholdt SM, et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res.* 2006;47:2064-70.
16. 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;278:25468-80.
17. Mozas P, Galetto R, Albajar M, Ros E, Pocoví M, Rodríguez-Rey JC, et al. A mutation (-49C>T) in the promoter of the low density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2002;43:13-8.
18. Ordoñas L, Roy R, Pampin S, Zaragoza P, Osta R, Rodríguez-Rey JC, et al. The g.763G>C SNP of the bovine FASN gene affects its promoter activity via Sp-mediated regulation: Implications for the bovine lactating mammary gland. *Physiol Genomics.* 2008;34:144-8.
19. Hahne P, Krempler F, Schaap FG, Soyak SM, Höffinger H, Miller K, et al. Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans. *J Intern Med.* 2008;264:452-62.
20. Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge 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;278:17982-5.
21. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4878-84.
22. Marinescu VD, Kohane IS, Riva A. MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. *BMC Bioinformatics.* 2005;6: 79.
23. Ongwijitwat S, Wong-Riley MT. Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons? *Gene.* 2005;360: 65-77.
24. Hayashi R, Ueda T, Farwell MA, Takeuchi N. Nuclear respiratory factor 2 activates transcription of human mitochondrial translation initiation factor 2 gene. *Mitochondrion.* 2007;7:195-203.
25. Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem.* 2005;280:28215-20.
26. Palmen J, Smith AJ, Dorfmeister B, Putt W, Humphries SE, Talmud PJ. The functional interaction on in vitro gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA52, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoA5 levels. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782:447-52.
27. Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2249-54.
28. Pampin S, Rodríguez-Rey JC. Functional analysis of regulatory single-nucleotide polymorphisms. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18: 194-8.