

# Apolipoproteína E Arg136Ser: una variante de apolipoproteína E asociada a hiperlipoproteinemia tipo III con herencia autosómica dominante incompleta

A.L. García Otín<sup>a</sup>, A. Cenarro<sup>b</sup>, F. Civeira<sup>b</sup>, A. Gañán<sup>a</sup>, D. Recalde<sup>a</sup>, J. Puzo<sup>c</sup>, E. Ros<sup>d</sup> y M. Pocoví<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. <sup>b</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. <sup>c</sup>Servicio de Bioquímica. Hospital San Jorge. Huesca. <sup>d</sup>Unitat de Lípids. Servei de Dietètica i Nutrició. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

---

**Fundamento.** La hiperlipoproteinemia tipo III (HLP tipo III) se caracteriza por el catabolismo reducido y la acumulación de lipoproteínas remanentes. La mayoría de pacientes con HLP tipo III son homocigotos para el alelo de la apolipoproteína (apo) ε2 (Cys112, Cys158). Sin embargo, se han descrito otras variantes de apo E que, en heterocigosidad, están asociadas con HLP tipo III. Recientemente hemos identificado una de estas variantes, apo E2 Arg136Ser.

**Métodos.** Con objeto de analizar su prevalencia y de profundizar en el conocimiento de las características hereditarias de la HLP tipo III asociada a esta variante, hemos determinado, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de restricción, los genotipos de apo E en 230 pacientes con hiperlipemia mixta y en 1.202 muestras de ADN de sujetos procedentes de la Comunidad Autónoma de Aragón: 103 recién nacidos y 1.109 sujetos de edades comprendidas entre 2 y 92 años.

**Resultados.** La frecuencia estimada del alelo apo ε2 Arg136Ser fue de 0,0037. Hemos identificado a un total de 43 sujetos portadores de esta variante, 17 de los cuales (39%) tenían HLP tipo III. La mutación se asocia con dominancia parcial de HLP tipo III, y la expresión de la hiperlipemia en los sujetos portadores depende, entre otros factores, de la edad, índice de masa corporal y sexo.

**Conclusión.** La variante apo E2 Arg136Ser es aparentemente frecuente en nuestra población y está asociada con HLP tipo III y dominancia incompleta.

**Palabras clave:**  
Apolipoproteína E. Hiperlipoproteinemia. Lipoproteínas. Genética.

---

## APOLIPOPROTEIN E Arg136Ser: AN APOLIPOPROTEIN E VARIANT ASSOCIATED WITH INCOMPLETE DOMINANCE OF TYPE III HYPERLIPOPROTEINEMIA

**Background.** Type III hyperlipoproteinemia (type III HLP) is characterized by reduced catabolism and accumulation of remnant lipoprotein particles. Most type III HLP patients are homozygous for the apolipoprotein (apo) ε2 (Cys112, Cys158) allele. However, several other rare variants at this locus have been associated in heterozygous state with type III HLP. Recently, one of these variants, apo E2 Arg136Ser has been identified in Spanish population and reported to be associated with type III HLP.

**Methods.** In order to assess the prevalence of this rare variant in our population and the inheritance characteristics of type III HLP linked to this apo E variant, we have examined the apo E genotype by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) product in 230 patients with mixed hyperlipidemia and 1,202 subjects from the Comunidad Autónoma de Aragón (Spain): 103 unrelated newborns and 1,109 subjects (2-92 years old).

---

Correspondencia: Dr. M. Pocoví.  
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular.  
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.  
50009 Zaragoza.  
Correo electrónico: mpocovi@posta.unizar.es

**Results.** The estimated apo  $\epsilon 2$  Arg136Ser allele frequency in this population was 0.0037. We have identified 43 carriers of the apo  $\epsilon 2$  Arg136Ser allele, and 39% of them disclose type III HLP. This mutation is associated with partial dominance of type III HLP and expression of hyperlipidemia in carriers shows different penetration depending on age, body mass index and gender.

**Conclusion.** The apo E2 Arg136Ser variant might be frequent in our population and it is associated with incomplete dominance of type III HLP.

## Introducción

La apolipoproteína E (apo E) es un miembro de la familia de las apolipoproteínas, involucradas en el transporte y metabolismo lipídico. Es un componente de superficie de remanentes de quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esta apolipoproteína tiene varias funciones en el metabolismo lipídico, incluyendo su participación como ligando en la captación de lipoproteínas por los receptores hepáticos<sup>1,2</sup> y en el transporte reverso de colesterol<sup>3</sup>. La apo E es una proteína de 299 aminoácidos con dos dominios bien diferenciados. El dominio aminoterminal contiene cuatro alfa-hélices. En la cuarta alfa-hélice, que comprende los aminoácidos 130-164, se encuentra la zona de unión al receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>4</sup>.

En humanos, el gen de apo E se localiza en el cromosoma 19, tiene una extensión de 3,7 kb, e incluye cuatro exones. Las variaciones genéticas en este *locus* son las responsables de los polimorfismos proteicos E2, E3 y E4, los cuales proceden de tres alelos,  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ . Estos polimorfismos se encuentran situados en el cuarto exón del gen y corresponden a la presencia de Arg (codón CGC) o Cys (codón TGC) en las posiciones 112 y 158, que dan lugar a apo E2 con Cys112/Cys158, a apo E3 con Cys112/Arg158 y a apo E4 con Arg112/Arg158<sup>5</sup>. Los tres alelos comunes del gen de apo E tienen un impacto importante en la variación de los valores de lípidos y lipoproteínas plasmáticos en población general. En comparación con el alelo  $\epsilon 3$ , el alelo  $\epsilon 2$  está asociado con cifras medias reducidas de colesterol total (CT), colesterol unido a LDL (cLDL) y apo B y con concentraciones elevadas de triglicéridos (TG). En cambio, el alelo  $\epsilon 4$  tiene un efecto opuesto sobre estos parámetros lipídicos<sup>6</sup>. Aparte del efecto de las variantes comunes de la apo E sobre el metabolismo lipídico, la apo E2 también está

asociada con hiperlipoproteinemia tipo III (HLP tipo III). Este trastorno lipídico se caracteriza por la acumulación de remanentes de quilomicrones y VLDL, que se produce como consecuencia de un catabolismo disminuido de partículas remanentes, debido a la baja afinidad de la apo E2 por los receptores hepáticos. Los pacientes con esta hiperlipoproteinemia presentan concentraciones elevadas de CT y TG, relación cVLDL/TG > 0,30, presencia en plasma de beta-VLDL y un aumento del riesgo de enfermedad coronaria prematura<sup>7</sup>. Alrededor del 50% de los pacientes con HLP tipo III presentan xantomas palmares estriados que son patognomónicos de esta dislipemia<sup>8</sup>. La gran mayoría de pacientes con HLP tipo III son homocigotos para la apo E2<sup>7</sup>. En la población caucásica, la homocigosidad para apo E2 se presenta en aproximadamente el 1% de la población. Sin embargo, la frecuencia de HLP tipo III es sólo de un 2-10/10.000<sup>7</sup> y, por tanto, sólo un porcentaje pequeño de los sujetos homocigotos para apo E2 desarrolla HLP tipo III. En consecuencia, en el caso de la HLP tipo III asociada a homocigosidad para el alelo  $\epsilon 2$ , la dislipemia es de herencia autosómica recesiva multifactorial, siendo una condición necesaria pero no suficiente para su expresión la presencia del alelo  $\epsilon 2$  en homocigosidad. No se conocen con precisión las causas adicionales por las que los sujetos homocigotos para el alelo  $\epsilon 2$  expresan HLP tipo III. Se asume que estos factores pueden ser ambientales, como la obesidad, el estado nutricional y el consumo de alcohol, y hormonales (insulina, hormonas sexuales y tiroideas), o que dependen de la coherencia de genes que predisponen a hiperlipemia<sup>9</sup>.

La expresión de HLP tipo III también se ha observado en individuos que son heterocigotos para variantes raras de apo E<sup>10,11</sup>. En el caso de variantes raras prácticamente todos los portadores expresan HLP tipo III. Además, en la mayoría de casos las manifestaciones clínicas son más graves y se presentan a edades más tempranas, en comparación con la forma recesiva de HLP tipo III asociada con la homocigosidad para el alelo  $\epsilon 2$ . Por tanto, en estos individuos la herencia es autosómica dominante con un alto grado de penetrancia<sup>10,11</sup>.

La combinación de técnicas de análisis del genotipo y fenotipo de la apo E en la población ha permitido identificar nuevas variantes de apo E, algunas de las cuales se encuentran asociadas a HLP tipo III<sup>12</sup>. En un estudio previo identificamos varias familias españolas con una variante rara, apo E Arg136Ser, asociada con HLP tipo III<sup>13</sup>. Con objeto de profundizar en el conocimiento de la expre-

sión de la HLP tipo III y conocer la prevalencia de esta variante en la población, hemos analizado los genotipos de apo  $\epsilon$  en un amplio grupo de población, identificando a 43 portadores y analizando las características clínicas y lipídicas de los mismos.

### Pacientes y métodos

#### Sujetos

Se seleccionó a 230 sujetos aparentemente no relacionados con hiperlipemia mixta procedentes de 12 comunidades autónomas (Andalucía, Aragón, Asturias, Baleares, Cantabria, Cataluña, Castilla La Mancha, Galicia, La Rioja, Madrid, País Vasco y Comunidad Valenciana). Los criterios de inclusión fueron: edad comprendida entre 18 y 65 años, y CT y TG superiores al percentil 90 con respecto a la distribución de lípidos en la población laboral española<sup>14,15</sup>. Los criterios de exclusión fueron: TG > 1.000 mg/dl, enfermedad renal o hepática, diabetes mellitus tipo 1, actividad de gammaglutamil transpeptidasa en plasma > 85 U/l y tratamiento hipolipemiente.

Por otro lado, se seleccionó a 1.202 individuos, de los que 103 fueron recién nacidos anónimos (sangre de cordón umbilical procedente de tres centros de la Comunidad Autónoma de Aragón) y 1.109 fueron sujetos de edades comprendidas entre 2 y 92 años, todos ellos residentes en la Comunidad Autónoma de Aragón.

En el caso de nueve portadores del alelo apo  $\epsilon 2$  Arg136Ser se consiguió la colaboración de 87 familiares de primer grado y cónyuges. En cada uno ellos se realizó una exploración física, se determinó el perfil lipídico y se analizó el genotipo de apo  $\epsilon$  y la mutación apo E2 Arg136Ser.

En este estudio, la HLP tipo III se definió de acuerdo a los siguientes criterios: presencia de hiperlipemia mixta con banda beta ancha tras separación de las lipoproteínas por electroforesis sobre acetato de celulosa, relaciones cVLDL/TG > 0,30 y cVLDL/TG-VLDL > 0,42<sup>7</sup>.

El protocolo experimental de este estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y cumple con los principios de ética de la Declaración de Helsinki de 1975, así como de la revisión de 1983.

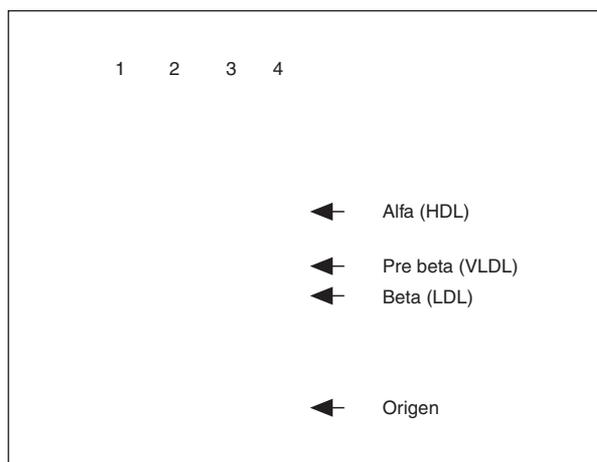


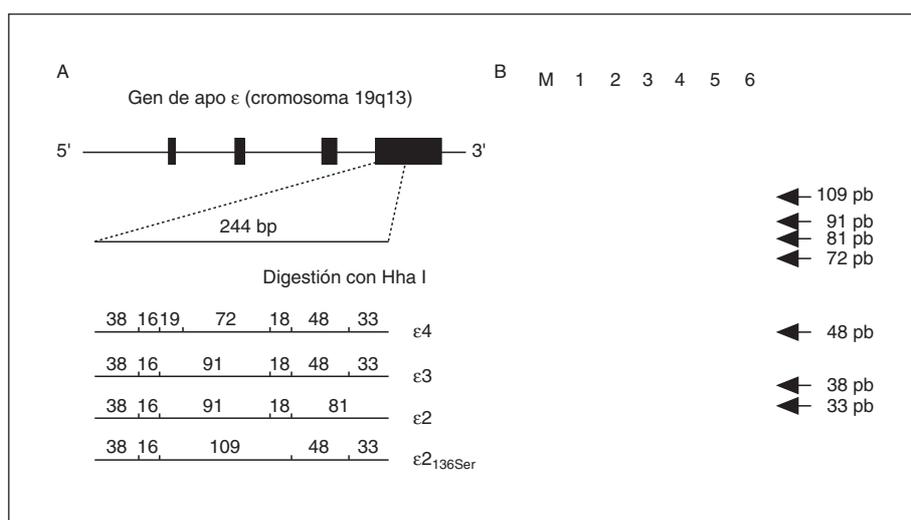
Figura 1. Electroforesis de lipoproteínas en acetato de celulosa. Línea 1: lipoproteínas LDL aisladas por ultracentrifugación secuencial. Línea 2: plasma de un paciente con hiperlipoproteinemia tipo III; obsérvese la banda beta ancha característica. Línea 3: plasma de un individuo normolipémico. Línea 4: plasma de un paciente con hipercolesterolemia familiar.

#### Determinaciones de lípidos y lipoproteínas

Las muestras de sangre se obtuvieron tras una noche de ayuno en tubos que contenían EDTA (1 mg/ml). El plasma se separó por centrifugación a 4 °C durante 20 min a 2.500 xg. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma y en fracciones lipoproteicas se analizaron enzimáticamente (Boehringer Mannheim, Alemania) utilizando un autoanalizador Dacos 2 en un laboratorio que participa en un programa de estandarización. Las VLDL fueron aisladas por ultracentrifugación<sup>16</sup>. El cHDL se midió en el sobrenadante tras la precipitación de las lipoproteínas que contienen apo B con fosfotungstato-Mg<sup>++</sup> (Boehringer Mannheim, Alemania). Las lipoproteínas plasmáticas se separaron por electroforesis sobre tiras de acetato de celulosa (Atom) durante 35 min a 200 V en tampón dietilbarbiturato 0,04 M (pH 8) y se tiñeron con negro Sudán (fig. 1).

Figura 2. Estrategia utilizada para la determinación del genotipo de apo E. A. Amplificación del fragmento de 244 pb del cuarto exón del gen de la apo  $\epsilon$  y mapa de restricción con HhaI de los 3 alelos comunes y apo  $\epsilon 2$  Arg136Ser. B. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% de los fragmentos de 244 pb digeridos con HhaI.

M: marcador de tamaños moleculares (plásmido  $\phi$ X174 digerido con HaeIII); línea 1:  $\epsilon 2/\epsilon 2$  Arg136Ser; línea 2:  $\epsilon 3/\epsilon 2$  Arg136Ser; línea 3:  $\epsilon 2$  Arg136Ser/ $\epsilon 2$  Arg136Ser; línea 4:  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ; línea 5:  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , y línea 6:  $\epsilon 3/\epsilon 2$ .



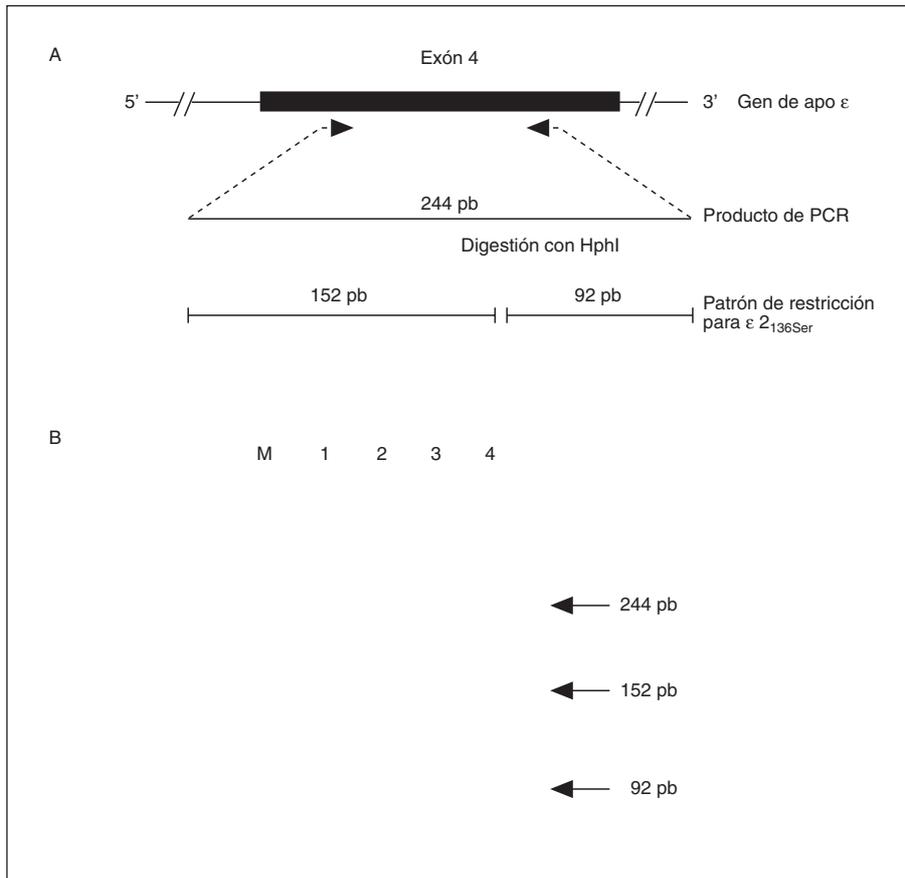


Figura 3. Análisis de la mutación apo ε<sub>2</sub> Arg136Ser. En la parte superior del panel se muestra la estrategia utilizada para la amplificación por PCR del fragmento del cuarto exón del gen de apo ε y posterior digestión con HphI. La digestión del producto amplificado con HphI en presencia de la mutación apo ε<sub>2</sub> Arg136Ser produce dos fragmentos de 147 y 97 pb. La parte inferior del panel (B) muestra el perfil electroforético sobre poliacrilamida al 8% del producto amplificado y digerido con HphI de dos individuos control (líneas 1 y 4), un heterocigoto para la mutación apo ε<sub>2</sub> Arg136Ser (línea 2) y un homocigoto (línea 3). La línea M corresponde a un marcador de tamaño molecular de ADN (plásmido pUC-18 digerido con MspI).

### Genotipo de apo ε y análisis de la mutación apo E2 Arg136Ser

El ADN se obtuvo a partir de sangre periférica con EDTA mediante el método de salado<sup>17</sup>. La determinación del genotipo de apo ε se llevó a cabo mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de 244 pb del cuarto exón del gen de apo E y digestión con la endonucleasa de restricción HhaI (Gibco-BRL), de acuerdo con el procedimiento descrito previamente<sup>18</sup>. Las muestras digeridas con HhaI se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 8% (1,5 mm de espesor × 20 cm de longitud) con una corriente constante de 45 mA durante 2 h. Tras la electroforesis, los geles se incubaron durante 20 min con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y los fragmentos de ADN se visualizaron con luz UV (302 nm) utilizando un transiluminador (fig. 2). El alelo apo ε<sub>2</sub> Arg136Ser da lugar a la pérdida del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HhaI situado en el codón 136, produciendo una banda de 109 pb. En todos los casos en que se observó esta banda de 109 pb, la mutación del codón 136 se confirmó mediante digestión con HphI (USB) del fragmento amplificado por PCR de 244 pb. La secuencia de ADN para los codones 135 y 136 en el alelo mutado es GTGAGC, en lugar de GTGCGC, creando un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima HphI. En presencia del alelo apo ε<sub>2</sub> Arg136Ser, por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, tras la digestión con HphI se visualizaron dos fragmentos de 147 y 96 pb (fig. 3).

### Métodos estadísticos

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (DE). Las diferencias entre medias se calcularon utilizando el test de la t de Student. La significación estadística se determinó utilizando el método de ANOVA. Los valores de p < 0,05 se consideraron significativos. La estadística se llevó a cabo con el programa informático StatView 512+™ (Abacus Concepts, Inc., Calabasas, Ca, EE.UU.).

### Resultados

Durante el análisis del genotipo de apo ε mediante digestión con HhaI de los 230 sujetos con dislipemia mixta, identificamos a 11 sujetos que mostraban una banda anormal de 109 pb (fig. 2). El fragmento de 244 pb amplificado por PCR de un sujeto homocigoto para esta banda anormal se clonó en el vector pGEM-T (Promega, EE.UU.) y se secuenciaron cuatro clones independientes por el método enzimático de Sanger. Los cuatro clones pusieron de manifiesto un cambio correspondiente a una transversión C → A en el primer nucleótido del codón 136. Esta mutación da lugar a la sustitución del aminoácido arginina en posición 136 por

**Tabla 1. Datos antropométricos, concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas, características clínicas y genotipo de apo ε de los 17 pacientes con HLP tipo III portadores de la mutación apo ε2 Arg136Ser**

N	Sexo	Edad	IMC	Genotipo Apo ε	Colesterol				Triglicéridos		cVLDL / TG	cVLDL / TG-VLDL	Semiología
					Total	LDL	HDL	VLDL	Total	VLDL			
1	V	62	30,6	E3/E2 <sub>136S</sub>	277	122	44	111	326	241	0,34	0,46	IM
2	V	45	23,5	E3/E2 <sub>136S</sub>	325	214	30	81	215	ND	0,38	ND	
3	M	64	28,9	E3/E2 <sub>136S</sub>	274	145	83	46	139	83	0,33	0,55	
4	V	66	29,8	E3/E2 <sub>136S</sub>	326	156	41	128	401	247	0,32	0,52	ACV
5	V	71	24,4	E2/E2 <sub>136S</sub>	276	153	53	73	229	ND	0,32	ND	
6	V	47	33,1	E3/E2 <sub>136S</sub>	319	182	35	101	289	198	0,35	0,51	
7	V	32	21,2	E2 <sub>136S</sub> /E2 <sub>136S</sub>	273	139	43	91	193	100	0,47	0,91	
8	M	51	24,0	E2/E2 <sub>136S</sub>	292	159	64	68	180	110	0,38	0,62	
9	M	61	26,0	E3/E2 <sub>136S</sub>	283	150	52	81	155	ND	0,50	ND	xant. e.
10	V	56	35,0	E3/E2 <sub>136S</sub>	399	250	42	107	356	223	0,30	0,48	
11	V	40	29,4	E4/E2 <sub>136S</sub>	302	136	28	139	382	299	0,36	0,46	xant. e.; ACV
12	V	76	25,4	E4/E2 <sub>136S</sub>	339	191	62	86	260	189	0,33	0,43	xant. t; arc.
13	V	56	28,2	E1 <sub>127D</sub> /E2 <sub>136S</sub>	316	99	32	185	440	355	0,42	0,52	xant. t; ACV
14	M	59	29,8	E2 <sub>136S</sub> /E2 <sub>136S</sub>	344	161	33	149	427	208	0,35	0,48	xant. t.
15	V	45	26,5	E3/E2 <sub>136S</sub>	270	157	41	72	208	ND	0,34	ND	IM
16	V	41	25,9	E3/E2 <sub>136S</sub>	365	222	36	107	218	104	0,49	0,48	
17	V	38	27,8	E3/E2 <sub>136S</sub>	261	156	36	69	221	143	0,31	0,80	

V: varones; M: mujeres; IMC: índice de masa corporal; xant. t.: xantomas tendinosos; xant. e.: xantomas eruptivos; arc.: arco corneal; IM: infarto agudo de miocardio; ACV: accidente cerebrovascular.

serina. Las características de este sujeto homocigoto, así como los detalles de la identificación de la mutación, han sido descritos previamente<sup>12</sup>.

Analizando la secuencia de los codones 135 y 136 observamos que la forma mutante crea un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI (fig. 3). Este sitio de HphI permite hacer un análisis relativamente rápido de la presencia o ausencia de dicha mutación en el producto de PCR de 244 pb que se utiliza para determinar el genotipo de apo ε. El análisis por este procedimiento de los 11 sujetos con hiperlipemia mixta que presentaron la banda anormal de 109 pb en la determinación del genotipo de apo ε, confirmó que 9 de ellos eran heterocigotos para la mutación apo ε2 Arg136Ser y uno era homocigoto. Por tanto, la frecuencia de sujetos con la mutación apo ε2 Arg136Ser en la población de sujetos con hiperlipemia mixta fue del 4,3%. La secuenciación del fragmento de ADN del otro sujeto con banda anormal de 109 pb que no produjo digestión con HphI permitió identificar una nueva variante de apoE, apo E2 Arg136Cys (datos no expuestos). La procedencia de los 10 pacientes portadores de la mutación apo ε2 Arg136Ser fue la siguiente: seis de Aragón, dos del País Vasco, uno de Cataluña y uno de La Rioja.

El análisis del genotipo de apo ε en una muestra de población de Aragón de 1.202 sujetos (recién nacidos y población general) puso de manifiesto que 9 sujetos presentaban una banda anormal de 109 pb.

Tras la digestión del fragmento de PCR con HphI, se confirmó que todos eran portadores de la mutación apo ε2 Arg136Ser. Por tanto, la frecuencia alélica estimada en la citada población fue de 0,0037.

Durante el estudio de los familiares de los probandos, se detectaron 24 sujetos adicionales portadores de la mutación apo ε2 Arg136Ser y 63 no portadores de la mutación. En total, encontramos 43 sujetos portadores de la mutación apo ε2 Arg136Ser. El análisis de lípidos y lipoproteínas, así como la exploración física de todos los sujetos portadores del alelo mutante evidenció que 17 portadores (39%) presentaban HPL tipo III.

Las características clínicas individuales de los sujetos con HLP tipo III se muestran en la tabla 1 y los datos medios en la tabla 2. Tres pacientes presentaron xantomas tendinosos, dos, xantomas eruptivos y uno, arco corneal; dos habían tenido un infarto de miocardio previo y tres un accidente cerebrovascular. Trece fueron varones y cuatro mujeres. No se encontró a ninguna mujer premenopáusica portadora de la mutación que presentase HLP tipo III. La edad media y el índice de masa corporal (IMC) fueron significativamente más elevados ( $p < 0,05$ ) en los sujetos con HLP tipo III que en los portadores de la mutación que no presentaron esta dislipemia. El análisis del gen de apo ε en los pacientes con HLP tipo III evidenció que dos eran homocigotos para el alelo apo ε2 Arg136Ser, 10 presentaron el genotipo apo ε3/ε2 Arg136Ser;

**Tabla 2. Datos medios de portadores del alelo  $\epsilon 2$  Arg136Ser con y sin HLP tipo III y familiares no portadores**

	Portadores $\epsilon 2_{136S}$ HLP tipo III	p	Portadores $\epsilon 2_{136S}$ no HLP tipo III	p	Familiares no portadores
N	17	-	26	-	63
Sexo (V/M)	13/4	0,08*	13/13	NS*	27/36
Edad (años)	54 $\pm$ 12,4	0,01	37 $\pm$ 21,3	0,04	47 $\pm$ 20,5
IMC	27,6 $\pm$ 3,55	0,03	23,7 $\pm$ 4,20	0,04	26,0 $\pm$ 3,70
CT	308 $\pm$ 38,3	0,001	187 $\pm$ 37,6	0,01	215 $\pm$ 40,6
cLDL	164 $\pm$ 37,5	0,01	110 $\pm$ 34,9	0,01	144 $\pm$ 30,9
TG	273 $\pm$ 97,5	0,001	109 $\pm$ 55,8	NS	108 $\pm$ 42,1
cHDL	44 $\pm$ 14,4	NS	46 $\pm$ 15,6	0,04	53 $\pm$ 15,0
cVLDL	100 $\pm$ 34,9	0,001	31 $\pm$ 18,5	0,001	18 $\pm$ 11,3
TG-VLDL	193 $\pm$ 82,6	0,001	63 $\pm$ 37,9	NS	56 $\pm$ 32,5
cVLDL/TG	0,37 $\pm$ 0,063	0,05	0,28 $\pm$ 0,071	0,001	0,16 $\pm$ 0,043
cVLDL/TG-VLDL	0,55 $\pm$ 0,133	NS	0,57 $\pm$ 0,162	0,001	0,34 $\pm$ 0,082

Datos de lípidos y lipoproteínas expresados en mg/dl (media  $\pm$  DE); IMC: índice de masa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ); p: indica la diferencia entre grupos; V: varones; M: mujeres; NS: no significativo; \*valor de p calculado por análisis de la  $\chi^2$  comparando las diferencias en número de varones y mujeres entre los dos grupos.

dos apo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  Arg136Ser, dos apo  $\epsilon 4/\epsilon 2$  Arg136Ser y uno presentó un genotipo apo  $\epsilon 1$  Gly 127Asp,Arg158Cys/ $\epsilon 2$  Arg136Ser.

La concentración media de cLDL en los pacientes con HLP tipo III portadores de la mutación no evidenció diferencias significativas con respecto a los familiares no portadores. En cambio, la concentración de cHDL fue significativamente más baja ( $p < 0,04$ ) en los sujetos con HLP tipo III.

Los portadores de la mutación que no expresan HLP tipo III tenían por término medio el cVLDL, cVLDL/TG y cVLDL/TG-VLDL más altos ( $p < 0,001$ ) que los no portadores. En cambio, el CT, cLDL y cHDL fueron significativamente más bajos en el grupo de portadores que en el de no portadores (tabla 2). Entre los portadores de la mutación que no presentaban HLP tipo III, dos presentaban hiperlipemia mixta con CT y TG por encima del percentil 95<sup>14,15</sup> y otro una hipercolesterolemia con CT por encima del percentil 95. Entre los familiares no portadores siete eran hipercolesterolémicos, cuatro presentaron hiperlipemia mixta, y dos eran hipertriglicéridémicos.

### Discusión

Recientemente identificamos una variante rara de apo E, apo E2 Arg136Ser, indistinguible por isoelectrofoque de la apo E2, que estaba asociada con HLP tipo III<sup>12</sup> y que, aparentemente, en España se observa con cierta frecuencia en los sujetos con HLP tipo III<sup>13</sup>.

Analizando por PCR y análisis de restricción el genotipo de apo E en pacientes con hiperlipemia mixta hemos identificado esta variante en 10 (4,3%) que, tras el análisis de las lipoproteínas, resultaron presentar una HLP tipo III. Nuestros resultados de-

muestran que el análisis del genotipo de apo  $\epsilon$  puede aportar una información importante en el estudio de la HLP tipo III. Los cambios de secuencia en ADN pueden no alterar el comportamiento electroforético de la proteína apo E y, por tanto, la separación de las isoformas de apo E en función de su carga no resulta lo suficientemente específica para identificar un fenotipo de forma exacta. La técnica de PCR en combinación con el análisis de restricción permite una determinación más precisa del genotipo de apo E, disminuyendo los riesgos de artefactos inherentes a los métodos de análisis de la proteína.

Aparentemente, esta variante de apo E es frecuente en la Comunidad Autónoma de Aragón, como lo demuestra el hecho de la elevada frecuencia alélica (0,0037) encontrada en una muestra amplia de población aragonesa. Es probable que en los análisis poblacionales de apo E realizados en otros estudios esta variante haya sido confundida con la isoforma común apo E2, ya que ambas proteínas tienen la misma carga y, por tanto, idéntico punto isoeléctrico en la determinación de los fenotipos de la apo E. Esta hipótesis se apoya en el elevado número de portadores de la mutación aparentemente no relacionados identificados en este estudio. Esta mutación ha sido previamente identificada en Nueva Zelanda, Estados Unidos, Francia, Italia, etc., y es por tanto improbable que existan ancestros comunes entre los distintos sujetos portadores. Una de las hipótesis plausibles es que sea resultado de una mutación recurrente que ha surgido en individuos con distinto acervo genético; de hecho, esta mutación tiene lugar en una citosina de un par CpG, el cual se sabe que es un sitio frecuente de mutación<sup>12</sup>.

**Tabla 3. Mutaciones descritas en la región codificante del gen de apo E**

Variante	Cambio aminoácido	Cambio ADN	Interacción		Patología	Ref.
			Heparina	rLDL		
E5 Japan	Glu3→Lys	GAG→AAG	ND	200%	HC	22
E5 Canada	Glu13 → Lys	GAG → AAG	ND	ND	ND	23
E4 Philadelphia	Glu13 → Lys/Arg145 → Cys	GAG → AAG/CGT → TGT	ND	ND	HLP III	24
E0	Trp20 → Stop	TGG → TGA	ND	ND	HLP III	25
E2 Kyoto	Arg25 → Cys	CGC → TGC	ND	10%	LPG	26
E4- Freiburg	Leu28 → Pro/Cys112 → Arg	CTG → CCG	ND	100%	CAD	27
E0	Stop en codón 60	Del 1pb codón 31	ND	ND	HLP III	28
E3- Freiburg	Thr42 → Ala	ACA → GCA	ND	ND	ND	29
E5 Frankfurt	Gln81 → Lys/Cys112 → Arg	CAA → AAA/TGC → CGC	ND	ND	HC	30
E5	Pro84 → Arg/Cys112 → Arg	CCG → CGC/TGC → CGC	ND	100%	HC	31
E3	Ala99 → Thr/Ala152 → Pro	GCG → ACG/GCC → CCC	ND	ND	ND	32
E3 Leiden	Duplicación aa 121-127		ND	25%	HLP III	33
E4 (común)	Cys112 → Arg	TGC → CGC	ND	100%	HC	
E1	Gly127 → Asp/Arg158 → Cys	GGC → GAC/CGC → TGC	40%	4%	HLP III	34
E2	Arg134 → Gln	CGG → CAG	ND	ND	ND	35
E3' Montreal	Arg136 → His	CGC → CAC	< E3	80%	HLP	36
E2 Christchurch	Arg136 → Ser	CGC → AGC	ND	40%	HLP III	37
E2	Arg136 → Cys	CGC → TGC	100%	33%	HLP III	38
E1 Tokyo	Delección 3 aa 141-143		ND	ND	LPG	39
E1	Delección 3 aa 142-144		ND	ND	LPG	40
E2	Arg142 → Leu	CGC → CTC	ND	ND	HLP III	41
E3	Cys112 → Arg/Arg142 → Cys	TGC → CGC/CGC → TGC	< E3	20%	HLP III	42
E2	Arg145 → Cys	CGT → CGC	ND	ND	HLP III	43
E2 Sendai	Arg145 → Pro	CGT → CCT	ND	ND	LPG	44
E3 Kochi	Arg145 → His	CGT → CAT	ND	ND	HTG	45
E1 Harrisburg	Lys146 → Glu	AAG → GAG	20%	8%	HLP III	46
E2	Lys146 → Gln	AAG → CAG	ND	40%	HLP III	47
E1 Hammersmith	Lys146 → Asn/Arg147 → Trp	AAG → GAG/CGG → TGG	ND	ND	HLP III	48
E3 del L149	Delección 3 pb codón 149		ND	ND	ND	49
E1	Delección 18 aa 156-173		ND	ND	LPG	50
E2 (común)	Arg158 → Cys	CGC → TGC	60%	2%	HLP III	
E2 Toranomon	Gln187 → Glu	CAG → GAG	ND	100%	HLP III	51
no secretada	Del aa 209-212 y Stop en 229	Delección 10 pb	ND	ND	HLP III	52
E3 Washington	Trp210 → Stop	TGG → TGA	ND	ND	HLP III	53
E5	Glu212 → Lys	GAG → AAG	122%	117%	HLP	54
E2 Fukuoka	Arg224 → Gln	CGG → CAG	100%	100%	HLP III	55
E2 Dunedin	Arg228 → Cys	CGC → TGC	ND	100%	HTG	56
E2	Val236 → Glu	GTG → GAG	ND	ND	HTG	57
E7 Suita	Glu244 → Lys/Glu245 → Lys	GAG → AAG/GAG → AAG	> E3	23%	HLP III	58
E3	Cys112 → Arg/Arg251 → Gly	TGC → CGC/CGC → GGC	ND	ND	HTG	25
E1	Arg158 → Cys/Leu252 → Glu	CGC → TGC/CTG → GAG	ND	ND	HC	25
E4-	Cys112 → Arg/Arg274 → His	TGC → CGC/CGC → CAC	ND	ND	ND	25
E4+	Ser296 → Arg	AGC → CGC	ND	ND	ND	25
E1 Bethesda	ND	ND	ND	ND	HLP III	59
		Mutación ajuste	ND	ND	HLP III	60

ND: no descrito; HC: hipercolesterolemia; HTG: hipertrigliceridemia; HLP: hiperlipoproteinemia; HLP III: hiperlipoproteinemia tipo III; LPG: glomerulopatía lipoproteica; CAD: enfermedad coronaria; del: delección; aa: aminoácido.

La apo E es un ligando para todos los receptores de la familia del receptor de las LDL (rLDL), especialmente el rLDL y la proteína relacionada con el rLDL (LRP), pero también se une a los proteoglicanos heparán sulfato (HSPG) y, a través de estas interacciones, desempeña un papel fundamental en el aclaramiento de partículas remanentes por parte del hígado. Las partículas remanentes atraviesan el endotelio fenestrado del hígado y entran en el espa-

cio de Disse, en el que interaccionan con los HSPG. La retención de remanentes en el espacio de Disse favorece, por un lado, la actuación de la lipasa hepática sobre sus componentes lipídicos y, por otro, que adquieran en su superficie una mayor proporción de apo E secretada por los hepatocitos. Tras esta etapa de procesamiento y enriquecimiento en apo E, los remanentes son internalizados por el rLDL, el LRP en cooperación con los HSPG, o bien

mediante retirada directa tras la interacción con los HSPG por un mecanismo de cinética lenta<sup>19</sup>. De estas tres vías de retirada, la principal, cuantitativamente, es la interacción con el rLDL, pero parece esencial la interacción con HSPG para un procesamiento previo correcto de las partículas<sup>20</sup>. Por tanto, las mutaciones en el gen de la apo E pueden afectar tanto a la unión de las partículas remanentes a los receptores, como a la interacción con los HSPG. La interacción de la apo E con los HSPG se analiza utilizando heparina como modelo de proteoglicano de superficie cargado negativamente<sup>21</sup>.

La HLP tipo III generalmente se hereda como un rasgo autosómico recesivo asociado con el fenotipo apo E2/2, y a la expresión fenotípica de la hiperlipemia contribuyen factores adicionales, genéticos o ambientales. En los individuos homocigotos para la isoforma común de apo E2 Arg158Cys, sólo un pequeño porcentaje, 1-4%, desarrolla HLP tipo III, y generalmente se asume que la expresión de la hiperlipemia está muy influenciada por factores como la edad, el IMC, el estado nutricional y el sexo.

En la actualidad se conocen más de cuarenta variantes de apo E (tabla 3). Sin embargo, sólo la mitad de las descritas están asociadas a HLP tipo III. La asociación con HLP tipo III depende, entre otros factores, de la capacidad de unión al rLDL y la interacción con los HSPG. Los estudios familiares de portadores de variantes raras, como apo E3 Cys112Arg/Arg142Cys<sup>42</sup>, apo E2 Lys146Gln<sup>47</sup> y apo E1-Harrisburg Lys146Glu<sup>46</sup>, han demostrado que la heterocigosidad para estas variantes está asociada con la expresión de la HLP tipo III a pesar de la presencia de un alelo "normal", indicando que en estos casos la HPL tipo III se hereda de forma autosómica dominante con un alto nivel de penetrancia. En cambio, la herencia autosómica dominante es parcial o incompleta en otras variantes como la apo E4-Philadelphia Glu13Lys/Arg145Cys.

Nuestros resultados demuestran que la variante apo E2 Arg136Ser se asocia con HLP tipo III de forma independiente del otro alelo, ya que se ha observado expresión de la hiperlipemia en sujetos tanto homocigotos para la variante como heterocigotos (apo ε4, apo ε3, apo ε2, apo ε1). Por otra parte, el nivel de penetrancia es mayor que en el caso de la homocigosidad para la apo E2 Arg158Cys, ya que en el presente estudio el 39% de los portadores de la variante presentaron HLP tipo III. Sin embargo, la penetrancia fue incompleta, ya que no todos los portadores estaban afectados. Nuestros datos indican que la expresión de la HLP tipo III en los portadores de la variante está fuertemente asociada con la edad (la media de edad de los portadores

con HLP tipo III era de 54 años frente a 37 años en los portadores sin HLP tipo III); el sexo (sólo el 23,5% de los portadores con HLP tipo III eran mujeres); el estado hormonal (no se observó ninguna mujer premenopáusica entre los portadores que expresara HLP tipo III), e índice de masa corporal (media de IMC de los portadores con HLP tipo III, 27,6 frente a 23,7 kg/m<sup>2</sup> en los portadores sin HLP tipo III). Es importante destacar que los portadores de la variante que no expresan hiperlipemia tienen, por término medio, concentraciones de cVLDL y relaciones cVLDL/TG y cVLDL/TG-VLDL significativamente más elevadas que los no portadores ( $p < 0,001$ ), lo que es indicativo de que existe un catabolismo alterado de partículas remanentes en estos individuos.

La mutación de la apo E analizada en el presente estudio se localiza en la región de unión al receptor y afecta a la carga de esta región<sup>4</sup>. Los estudios *in vitro* han demostrado que la apo E2 Arg136Ser sólo tiene un 40% de afinidad por el receptor, y se desconoce su capacidad de interacción con la heparina. Por otra parte, es importante señalar la importancia del aminoácido que cambia en esta variante, ya que la arginina de la posición 136 se encuentra conservada en ocho de las nueve especies animales analizadas<sup>61</sup>.

En conclusión, hemos demostrado que la variante apo E2 Arg136Ser es relativamente frecuente en población española que presenta hiperlipemia mixta, es frecuente en la población aragonesa y está asociada con dominancia parcial de HLP tipo III.

## Agradecimiento

Este artículo ha sido realizado en parte gracias a los proyectos FIS 99/0048 y DGES/FEDER 2FD97-2142-CO3-01.

## Bibliografía

1. Havel RJ, Chao YC, Windler EE, Kotite L, Guo LSS. Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4339-4353.
2. Sherril BC, Innerarity TL, Mahley RW. Rapid hepatic clearance of the canine lipoprotein containing only the E apolipoprotein by high affinity receptor. *J Biol Chem* 1980; 225: 1804-1807.
3. Barter P. High density lipoproteins and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 210-214.
4. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the receptor binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 1991; 252: 1817-1822.
5. Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW. Human apoprotein E heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apoE isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256: 9077-9083.
6. Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 268-285.

7. Mahley RW, Rall SC. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases* (7.<sup>a</sup> ed.). Nueva York: McGraw Hill, 1995; 1953-1980.
8. Polano MK. Xanthoma types in relation to the type of hyperlipoproteinemia. *Nutr Metab* 1973; 15: 107-118.
9. Utermann G. Morgani Lecture. Genetic polymorphism of apolipoprotein E. Impact on plasma lipoprotein metabolism. En: Crepaldi G, Tiengo A, Baggio G, editores. *Diabetes, obesity and hyperlipidemia*. Amsterdam: Elsevier, 1985; 1-28.
10. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH, Taylor JM. Apolipoprotein E. Genetic variants provide insight into its structure and function. *Curr Opin Lipidol* 1990; 1: 87-95.
11. Rall SC Jr, Innerarity TL, Weisgraber KH, Wardell MR, Mahley RW. The type of mutation in apolipoprotein E determines whether type III hyperlipoproteinemia is expressed as a dominant or recessive trait. En: Descovich GC, editor. *Proceeding of the seventh atherosclerosis and cardiovascular disease conference*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990; 81-88.
12. Pocoví M, Cenarro A, Civeira F, Myers RH, Casao E, Esteban M et al. Incomplete dominance of type III hyperlipoproteinemia associated with the rare apolipoprotein E2 (Arg136 → Ser) variant in multigenerational pedigree studies. *Atherosclerosis* 1996; 122: 33-46.
13. Civeira F, Pocoví M, Cenarro A, Casao E, Villella E, Joven J et al. Apo E variants in patients with type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1996; 127: 273-282.
14. Civeira F, Pocoví M, Moreda A, Alamillo J, Cía P, Grande F. Niveles de colesterol y triglicéridos, y distribución del colesterol en lipoproteínas en una población laboral. Varones. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1990; 2: 43-47.
15. Moreda A, Alamillo J, Pocoví M, Civeira F, Blasco M, Ordovás JM. Niveles de colesterol y triglicéridos, y distribución del colesterol en lipoproteínas en una población laboral. Mujeres. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1990; 2: 48-54.
16. Havel RJ, Eder HA, Bragdom JH. Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-1355.
17. Miller S, Dykes D, Polensky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
18. Castillo S, Cenarro A, Civeira F, Gañán A, García Otín AL, Gonzalvo C et al. Técnicas especiales para el diagnóstico de las alteraciones del metabolismo lipídico. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1999; 11: 205-224.
19. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism key pathways involving cell-surface heparan proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999; 40: 1-16.
20. De Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD. Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J Lipid Res* 1996; 37: 197-208.
21. Mann WA, Lohse P, Gregg RE, Ronan R, Hoeg JM, Zech LA et al. Dominant expression of type III Hyperlipoproteinemia. Pathological insights derived from structural and kinetics characteristics of Apo E-1 (Lys146 → Glu). *J Clin Invest* 1995; 96: 1100-1107.
22. Tajima S, Yamamura T, Yamamoto A. Analysis of apolipoprotein E5 gene from a patient with hyperlipoproteinemia. *J Biochem (Tokyo)* 1988; 104: 48-52.
23. Mailly F, Xu CF, Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Talmud PJ, Davignon J et al. Characterization of a new apolipoprotein E5 variant detected in two French-Canadian subjects. *J Lipid Res* 1991; 32: 613-620.
24. Lohse P, Mann WA, Stein EA, Brewer HB. Apolipoprotein E 4 Philadelphia (Glu13→Lys, Arg 145→Cys). Homozygosity for two rare point mutations in the apolipoprotein E gene combined with severe type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem* 1991; 266: 10479-10484.
25. Feussner G, Feussner V, Hoffman MM, Lohrmann J, Wieland H, Marz W. Molecular basis of type III hyperlipoproteinemia in Germany. *Hum Mutat* 1998; 11: 417-423.
26. Matsunaga A, Sasaki J, Komatsu T, Kanatsu K, Tsuji E, Moriyama K et al. A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg25Cys), in lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int* 1999; 56: 421-427.
27. Orth M, Weng W, Funke H, Steinmetz A, Assmann G, Nauck M et al. Effects of a frequent apolipoprotein E isoform, ApoE4 Freiburg (Leu28→Pro), on lipoproteins and the prevalence of coronary artery disease in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1306-1315.
28. Feussner G, Funke H, Weng W, Assmann G, Lackner KJ, Ziegler R. Severe type III hyperlipoproteinemia associated with unusual apolipoprotein E1 phenotype and epsilon 1/null genotype. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 599-608.
29. Wieland H, Funke H, Krieg J, Luley C. Apo E3/Freiburg and apo E4/Freiburg are two genetic apo E variants which are caused by exchanges of uncharged aminoacids and do not appear to be associated with lipid disorders or heart disease. *Abstract Book of the Ninth International Symposium on Atherosclerosis*, Rosemont, Illinois, EE.UU., 1991; 164.
30. Ruzicka V, Marz W, Russ A, Fisher E, Mondorf W, Gross W. Characterization of the gene for apolipoprotein E5-Frankfurt (Gln81→Lys, Cys112→Arg) by polymerase chain reaction, restriction isotyping, and temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1993; 14: 1032-1037.
31. Wardell MR, Rall SC, Schaefer EJ, Kane JP, Weisgraber KH. Two apolipoprotein E5 variants illustrate the importance of the position of additional positive charge on receptor-binding activity. *J Lipid Res* 1991; 32: 521-528.
32. McLean JW, Elshourbagy NA, Chang DJ, Mahley RW, Taylor JM. Human apolipoprotein E mRNA. cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J Biol Chem* 1984; 259: 6498-6504.
33. Wardell MR, Weisgraber KH, Havekes LM, Rall SC. Apolipoprotein E3-Leiden contains a seven-aminoacid insertion that is a tandem repeat of residues 121-127. *J Biol Chem* 1989; 264: 21205-21210.
34. Weisgraber KH, Rall SC, Innerarity TL, Mahley RW, Kuusi T, Ehnholm C. A novel electrophoretic variant of human apolipoprotein E. Identification and characterization of apolipoprotein E1. *J Clin Invest* 1984; 73: 1024-1033.
35. De Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat* 1994; 4: 178-194.
36. Minnich A, Weisgraber KH, Newhouse Y, Dong LM, Fortin LJ, Tremblay M et al. Identification of a novel apolipoprotein E variant, apolipoprotein E3' (Arg136→His): association with mild dyslipidemia and double pre-beta very low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1995; 36: 57-66.
37. Wardell MR, Brennan SO, Janus ED, Fraser R, Carrell RW. Apolipoprotein E2-Christchurch (Arg136→Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* 1987; 80: 483-490.
38. Walden CC, Huff MW, Leiter LA, Connelly PW, Hegele RA. Detection of a new apolipoprotein-E mutation in type III hyperlipidemia using deoxyribonucleic acid restriction isotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 699-704.
39. Konishi K, Saruta T, Kuramochi S, Oikawa S, Saito T, Han H et al. Association of a novel 3-aminoacid deletion mutation of apolipoprotein E (Apo E Tokyo) with lipoprotein glomerulopathy. *Nephron* 1999; 83: 214-218.
40. Hattori H, Nagano M, Egashira T, Ogawa T, Arai H, Watanabe T et al. A novel mutation of the apolipoprotein E gene in a patient with lipoprotein glomerulopathy. *Atherosclerosis* 1999; 144 (Supl 1): 104.
41. Richard P, De Zulueta MP, Beucler I, De Gennes JL, Cassaigne A, Iron A. Identification of a new apolipoprotein E variant (E2 Arg142 → Leu) in type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1995; 112: 19-28.
42. Horie Y, Fazio S, Westerlund JR, Weisgraber KH, Rall SC. The functional characteristics of a human apolipoprotein E variant (cysteine at residue 142) may explain its association with dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem* 1992; 267: 1962-1968.
43. De Villiers WJ, Van der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Henderson H, Marais AD. The apolipoprotein E2 (Arg145Cys) mutation causes autosomal dominant type III hyperlipoproteinemia with incomplete penetrance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 865-872.

44. Oikawa S, Matsunaga A, Saito T, Sato H, Seki T, Hoshi K et al. Apolipoprotein E Sendai (arginine 145 → proline): a new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 820-823.
45. Suehiro T, Yoshida K, Yamano T, Ohno F. Identification and characterization of a new variant of apolipoprotein E (apo E-Kochi). *Jpn J Med* 1990; 29: 587-594.
46. Mann WA, Gregg RE, Sprecher DL, Brewer HB. Apolipoprotein E-1 Harrisburg: a new variant of apolipoprotein E dominantly associated with type III hyperlipoproteinemia. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1005: 239-244.
47. Rall SC, Weisgraber KH, Innerarity TL, Bersot TP, Mahley RW, Blum CB. Identification of a new structural variant of human apolipoprotein E, E2(Lys146 leads to Gln), in a type III hyperlipoproteinemic subject with the E3/2 phenotype. *J Clin Invest* 1983; 72: 1288-1297.
48. Hoffer MJ, Nithyanathan S, Naumova RP, Kibrige MS, Frants RR, Havekes LM et al. Apolipoprotein E1-Hammersmith (Lys146 → Asn; Arg147 → Trp), due to a dinucleotide substitution, is associated with early manifestation of dominant type III hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1996; 124: 183-189.
49. Livak KJ, Hainer JW. A microtiter plate assay for determining apolipoprotein E genotype and discovery of a rare allele. *Hum Mutat* 1994; 3: 379-385.
50. Ando M, Sasaki J, Hua H, Matsunaga A, Uchida K, Jou K et al. A novel 18-aminoacid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int* 1999; 56: 1317-1323.
51. Okubo M, Aoyama Y, Harada K, Fukawa M, Tsukada T, Mokuno H et al. A novel apolipoprotein E2 variant, E2 Toranomon (Q187E), identified in a type III hyperlipoproteinemia patient with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 140: 187-190.
52. Feussner G, Dobmeyer J, Grone HJ, Lohmer S, Wohlfeil S. A 10-bp deletion in the apolipoprotein epsilon gene causing apolipoprotein E deficiency and severe type III hyperlipoproteinemia. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 281-291.
53. Lohse P, Brewer HB, Meng MS, Skarlatos SI, LaRosa JC, Brewer HB Jr. Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene. *J Lipid Res* 1992; 33: 1583-1590.
54. Feussner G, Scharnagl H, Scherbaum C, Acar J, Dobmeyer J, Lohrmann J et al. Apolipoprotein E5 (Glu212 → Lys): increased binding to cell surface proteoglycans but decreased uptake and lysosomal degradation in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 1996; 37: 1632-1645.
55. Moriyama K, Sasaki J, Takada Y, Arakawa F, Matsunaga A, Ito Y et al. Characterization of a novel variant of apolipoprotein E, E2 Fukuoka (Arg-224→Gln) in a hyperlipidemic patient with xanthomatosis. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1301: 185-190.
56. Wardell MR, Rall SC, Brennan SO, Nye ER, George PM, Janus ED et al. Apolipoprotein E2-Dunedin (228 Arg replaced by Cys): an apolipoprotein E2 variant with normal receptor-binding activity. *J Lipid Res* 1990; 31: 535-543.
57. Van den Maagdenberg AM, Weng W, De Bruijn IH, De Knijff P, Funke H, Smelt AH et al. Characterization of five new mutants in the carboxyl-terminal domain of human apolipoprotein E: no cosegregation with severe hyperlipidemia. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 937-946.
58. Yamamura T, Dong LM, Yamamoto A. Characterization of apolipoprotein E7 (Glu244'Lys, Glu245'Lys), a mutant apolipoprotein E associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Lipid Res* 1999; 40: 253-259.
59. Ghiselli G, Gregg RE, Brewer HB. Apolipoprotein E Bethesda. Isolation and partial characterization of a variant of human apolipoprotein E isolated from very low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1984; 794: 333-339.
60. Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Felber BK, Pavlakis G, Zannis VI. The molecular basis of a familial apo E deficiency. An acceptor splice site mutation in the third intron of the deficient apo E gene. *J Biol Chem* 1987; 262: 2310-2315.
61. Yang YW, Chan L, Li WH. Cloning and sequencing of bovine apolipoprotein E complementary DNA and molecular evolution of apo E, C-I and C-II. *J Mol Evol* 1991; 32: 469-475.