

รายงานการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้อง
ในคนไข้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงมาก

Genetic and functional characterization of genes involved
in patients with severe hypertriglyceridemia

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2557-2558

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วีรพันธุ์ โขวิฑูรกิจ และคณะ

สาขาวิชาต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึม

ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ
2557-2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คนไข้ ครอบครัว ผู้ร่วมทำการวิจัย และผู้ช่วยเหลือทุกท่าน

เลขหมู่

เลขทะเบียน 017640

วัน...เดือน...ปี 8 พ.ค. 61

บทคัดย่อภาษาไทย

ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากมักเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยทำการถอดรหัสยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ซึ่งสร้างโปรตีน lipoprotein lipase, apolipoprotein C-II และ apolipoprotein A-V ตามลำดับในคนไทยที่มีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากและเปรียบเทียบกับคนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ปกติ โดยถอดรหัสในตำแหน่ง exons และ exon-intron junctions ในคนไข้จำนวน 101 คนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ ≥ 10 มิลลิโมล/ลิตร (886 มก./ดล.) และเปรียบเทียบกับคนที่มีระดับไขมันปกติจำนวน 111 คน ผลการศึกษา พบมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใหม่แบบ heterozygous missense mutations 2 ตำแหน่งในยีน *LPL* (p.Arg270Gly และ p.Arg432Thr) และพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใหม่แบบ frameshift mutation 1 ตำแหน่งในยีน *LPL* (p.Asp308Glyfs*5) การทดลองโดยการแสดงออกในเซลล์แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใหม่ p.Arg270Gly และ p.Asp308Glyfs*3 สัมพันธ์กับการหลั่ง *LPL* ลดลงจากเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่เคยมีการรายงานมาก่อนแบบ heterozygous missense mutations ในยีน *LPL* 3 ตำแหน่ง (p.Ala98Thr, p.Leu279Val และ p.Leu279Arg) โดยรวม พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยเหล่านี้ พบเฉพาะในคนไข้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง แต่ไม่พบเลยในคนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ปกติ (13% เทียบกับ 0%, $P < 0.0001$) พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อย 1 ตำแหน่งในยีน *APOA5* (p.Gly185Cys, rs2075291) ในคนไข้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงน้อยกว่าในคนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ปกติ (25% เทียบกับ 6%, $P < 0.0005$) เมื่อรวมทั้งหมด พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบไม่บ่อยในยีน *LPL* หรือ *APOA5* หรือการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยในยีน *APOA5* p.Gly185Cys พบได้ 37% ในกลุ่มคนไข้เทียบกับ 6% ในกลุ่มคนปกติ ($P = 3.1 \times 10^{-8}$) ในการศึกษาี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในยีน *APOC2* โดยสรุป ทั้งการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยและ/หรือพบไม่บ่อยในยีน *LPL* และ/หรือ *APOA5* พบได้บ่อยในกลุ่มคนไข้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง การเปลี่ยนแปลงหนึ่งในยีน *APOA5* คือ p.Gly185Cys พบได้บ่อยในคนไข้กลุ่มนี้และมีส่วนทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Severe hypertriglyceridemia usually results from a combination of genetic and environmental factors. In this study, we resequenced 3 candidate genes, *LPL*, *APOC2* and *APOA5*, which encode lipoprotein lipase, apolipoprotein C-II, and apolipoprotein A-V, respectively, in Thai subjects with severe hypertriglyceridemia and compared with normolipidemic controls. Sequence variants were identified by sequencing exons and exon-intron junctions in 101 subjects with triglyceride levels ≥ 10 mmol/L (886 mg/dL) and compared with those of 111 normolipidemic subjects. We found 2 novel heterozygous missense mutations in *LPL* (p.Arg270Gly and p.Arg432Thr) and 1 novel frameshift mutation in *LPL* (p.Asp308Glyfs*5). In vitro functional studies showed that the p.Arg270Gly and p.Asp308Glyfs*3 variants were associated with a significant reduction in LPL secretion. Moreover, three previously-identified heterozygous missense mutations in *LPL* (p.Ala98Thr, p.Leu279Val, and p.Leu279Arg) were identified. Collectively, these rare mutations were found only in the hypertriglyceridemic group but not in the control group (13% vs. 0%, $P < 0.0001$). One common variant of *APOA5* (p.Gly185Cys, rs2075291) was found at a higher frequency in the hypertriglyceridemic group compared with the control group (25% vs. 6%, respectively, $P < 0.0005$). Altogether, rare variants of *LPL* or *APOA5* and/or the common *APOA5* p.Gly185Cys variant were found in 37% of the hypertriglyceridemic group vs. 6% in the controls ($P = 3.1 \times 10^{-8}$). No rare variant of *APOC2* was identified. In conclusion, both common and rare DNA variants in *LPL* and/or *APOA5*, but not *APOC2*, were more commonly found in the Thai hypertriglyceridemic group. A common p.Gly185Cys *APOA5* variant, in particular, was quite prevalent and potentially contributes to high triglyceride phenotype in this group of patients.

สารบัญเรื่อง

หัวข้อ	หน้า
บทนำ	9
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	9
วัตถุประสงค์และขอบเขตของ โครงการวิจัย	11
ทฤษฎี แนวทางความคิดของ โครงการวิจัย	11
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	12
ประโยชน์ที่ได้รับ	13
วิธีการดำเนินการวิจัย	15
การเก็บข้อมูล และจำนวนตัวอย่าง	15
วิธีการวิจัยและวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	16
ผลการวิจัย	17
อภิปรายผล	23
สรุป	24
ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	24
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัย	24
ผลงานตีพิมพ์	25
บรรณานุกรม	26
ประวัตินักวิจัยและคณะ	30

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา	17
ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย (rare variant) ในยีน <i>LPL</i> และ <i>APOA5</i>	18
ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย (common variant) ในยีน <i>LPL</i> และ <i>APOA5</i>	19
ตารางที่ 4 Carrier frequencies ของการเปลี่ยนแปลงที่พบในยีน <i>LPL</i> และ <i>APOA5</i>	20

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 LPL mass ในเซลล์	21
รูปที่ 2 LPL mass ใน media	21

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

Apo	Apolipoprotein
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1
HDL	High-density lipoprotein
HTG	Hypertriglyceridemia
LDL	Low-density lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipase
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-RFLP	PCR-restriction fragment length polymorphism
VLDL	Very low-density lipoprotein
SIFT	Sorting intolerant from tolerant
SNP	Single nucleotide polymorphism
subPSEC	substitution position-specific evolutionary conservation
SVM	support vector machine

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในสภาพที่วิถีการดำเนินชีวิตเปลี่ยนไป ทำให้ลักษณะโรคในประชากรเปลี่ยนแปลงไปด้วย ในสังคมเมือง พบภาวะขาดอาหารน้อยลงมาก แต่กลับพบภาวะอ้วนลงพุง (metabolic syndrome) โรคอ้วนและโรคอื่นๆที่เกี่ยวข้องเพิ่มมากขึ้น เช่น โรคไขมันในเลือดผิดปกติ โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคหลอดเลือดหัวใจและโรคหลอดเลือดสมองตีบ โรคเหล่านี้จึงกลายเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตและภาวะทุพพลภาพในอันดับต้นๆของประชากรทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย (1) ระดับไขมันในเลือดผิดปกติเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือด ทั้งระดับ low-density lipoprotein (LDL) cholesterol สูง ระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) สูง และระดับ high-density lipoprotein (HDL) cholesterol ต่ำ นอกจากนี้ ระดับไตรกลีเซอไรด์สูง และระดับ high-density lipoprotein (HDL) cholesterol ต่ำ ยังพบบ่อยในภาวะอ้วนลงพุง โรคอ้วนและโรคเบาหวานอีกด้วย (2)

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ พบได้บ่อยในประเทศไทย จากการศึกษา InterASIA ซึ่งทำในประชากรที่อายุมากกว่า 35 ปีจำนวน 5,305 คนทั่วประเทศ พบว่าภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากกว่า 200 มิลลิกรัม/เดซิลิตร เป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยที่สุด โดยพบได้ประมาณ 1 ใน 3 ของประชากรที่ศึกษา (3) แต่ถ้าใช้เกณฑ์ที่กำหนดโดยสมาคมโรคหัวใจแห่งสหรัฐอเมริกา (American Heart Association) และ National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (4,5) ที่กำหนดว่าระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดปกติไม่เกิน 150 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ความชุกดังกล่าว จะสูงขึ้นไปอีก

คนไข้ที่มีระดับไขมันในเลือดสูง เป็นแหล่งความรู้ที่ช่วยบอกถึงปัจจัยสำคัญทางพันธุกรรมที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับไขมัน (6) ในประชากรทั่วไป ระดับไขมันในเลือดถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม แต่ในคนไข้ที่มีระดับไขมันสูงมาก เช่นระดับไตรกลีเซอไรด์สูงเกิน 10 มิลลิโมล (880 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) พบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญกว่า

ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ถือเป็น complex quantitative trait ซึ่งไม่ได้ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ Mendelian แต่เป็นผลจากความแตกต่างของ DNA ในหลายๆตำแหน่ง (6) ในปัจจุบัน การถอดรหัสพันธุกรรมที่เรียกว่า resequencing approach ซึ่งทำการถอดรหัสพันธุกรรมของอินทราหลายยีนที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ศึกษากำลังได้รับความนิยมนำขึ้น ซึ่งสามารถใช้ค้นหา missense DNA variants ที่พบได้ไม่บ่อยในประชากรกลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษา เนื่องจากการที่มี missense DNA variants หลายๆตำแหน่งเป็นตัวกำหนด quantitative trait ดังกล่าว จึงมีการใช้วิธีนี้ในการศึกษา trait ของโรคหรือลักษณะที่พบบ่อย เช่นการศึกษาในคนที่มี

ระดับ HDL ต่ำ พบว่าเกิดจากมี missense mutations ของยีน *LCAT*, *APOA1* และ *ABCA1* (9)
การศึกษาของคณะผู้วิจัยในคนไทยที่มีระดับ HDL สูง พบว่าเกิดจากมี missense mutations ของยีน *CETP* และ *LIPC* (10)

การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่ทำให้ระดับไขมันในเลือดสูงอย่างเป็นระบบยังมีอยู่น้อย และส่วนใหญ่ทำในคนผิวขาว (7-9, 11-14) ในประชากรไทย คณะผู้วิจัยเป็นกลุ่มแรกที่ศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมของภาวะไขมันในเลือดสูงมากในคนไทย เนื่องจากในประชากรต่างเชื้อชาติ พบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมที่ควบคุมแตกต่างกันไป ในการศึกษาคนไข้ที่มีระดับ HDL cholesterol สูงมาก ด้วยวิธี resequencing พบว่าคนไข้ประมาณ 1 ใน 3 มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *CETP* และ *LIPC* ที่น่าจะเป็นสาเหตุของระดับ HDL cholesterol ในเลือดสูงในคนไทย (10) การศึกษาทางพันธุกรรมดังกล่าวมีการยืนยัน โดยการศึกษาหน้าที่ระดับเซลล์ (in vitro functional studies) ด้วย (15-16) ผลการศึกษาดังกล่าว ตรงข้ามกับผลการศึกษาทางพันธุกรรมในคนผิวขาวที่พบการเปลี่ยนแปลงของยีน *CETP* น้อยมาก (17)

ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยทำการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมของภาวะไขมันในเลือดสูงมาก โดยใช้ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากเป็นต้นแบบ คนไข้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากมีความเสี่ยงสูงในการเกิดตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งอาจถึงแก่ชีวิตได้ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากอย่างเป็นระบบ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ด้วยวิธี resequencing เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวแล้ว มีการยืนยันยืนยันความผิดปกติที่พบดังกล่าวโดยการศึกษาหน้าที่ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการทำ expression studies in vitro นอกจากนี้มีการศึกษาอื่น ๆ ที่พบใหม่ว่าเกี่ยวข้องกับภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมาก เช่น *GPIHBP1* เป็นต้น

องค์ความรู้ใหม่ที่จะได้จากการศึกษานี้คือทราบถึงยีนที่มีผลต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบครบถ้วนมาก่อนในคนไทย รวมทั้งให้ข้อมูลในด้านของ single nucleotide polymorphism ที่เป็นระบบในคนไทยด้วย เป้าหมายของการวิจัยคือการค้นพบยีนที่เป็นสาเหตุของภาวะไขมันในเลือดสูงที่เป็นปัญหาสำคัญของประเทศ เป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางวิชาการได้ ผลของการศึกษานี้จะบอกถึงปัจจัยที่มีผลต่อระดับไตรกลีเซอไรด์สูง และสามารถประยุกต์ใช้ในการนำมาใช้ในทางคลินิก เพื่อพัฒนาเป็นการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องในคนไข้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง เช่น คนไข้โรคเอสส์ที่จะได้รับยาต้านไวรัสที่ทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้นได้

วัตถุประสงค์และขอบเขตของโครงการวิจัย

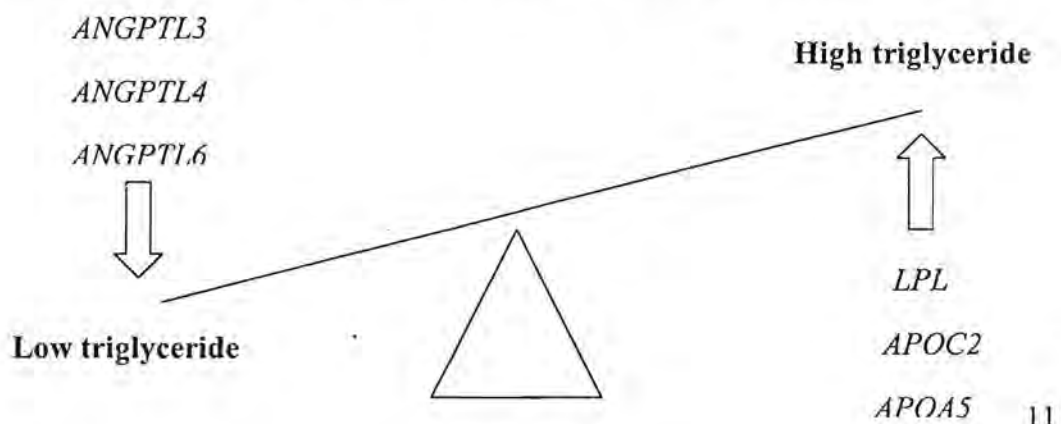
โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการควบคุมระดับไตรกลีเซอไรด์ในคนที่มียีนที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง (เช่น *LPL*, *APOC2* และ *APOA5*)

ในโครงการวิจัยนี้ จะทำการถอดรหัสทางพันธุกรรมของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ที่สร้างโปรตีน lipoprotein lipase, apolipoprotein C-II และ apolipoprotein A-V ตามลำดับ ในคนที่มียีนที่มีระดับ ไตรกลีเซอไรด์สูงจำนวน 100 ราย เปรียบเทียบกับคนที่มียีนที่มีระดับ ไตรกลีเซอไรด์ปกติ 100 ราย โดยจะทำการถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของ exon และ exon-intron junction ของยีนที่กล่าวมา มีการยืนยันผลของการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใหม่โดยการศึกษาหน้าที่ด้วย *in vitro* expression studies โดยอาจมีการศึกษาอื่น ๆ ที่พบใหม่ว่าเกี่ยวข้องกับภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมากเช่น *GPIHBP1* เป็นต้น

ทฤษฎี แนวทางความคิดของโครงการวิจัย

ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ถือเป็น complex quantitative trait หนึ่ง ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของ DNA ในหลายๆตำแหน่ง (6) ในปัจจุบัน พบว่าการที่มี missense DNA variants หลายๆตำแหน่งเป็นตัวกำหนด quantitative trait ต่างๆ จึงมีการศึกษาโดยอาศัยการถอดรหัสพันธุกรรมที่เรียกว่า resequencing approach ซึ่งทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนหลายๆยีนที่พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ศึกษา เพื่อค้นหา missense DNA variants ในประชากรกลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษาดังกล่าว (7-14) มีการใช้วิธีนี้ในการศึกษา trait ของโรคหรือลักษณะที่พบ บ่อย เช่นการศึกษาในคนที่มียีนที่มีระดับ HDL ต่ำ พบว่าเกิดจากมี mutations ของยีน *LCAT*, *APOA1* และ *ABCA1* (๘) การศึกษาในคนไทยที่มีระดับ HDL สูง พบว่าเกิดจากการมี mutations ของยีน *CETP* และ *LIPC* (10) อย่างไรก็ตาม การศึกษาทางพันธุกรรมของระดับไตรกลีเซอไรด์สูงในคนไทยที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบมาก่อนว่าเกิดจาก missense DNA variants ใน candidate gene ต่างๆหรือไม่

สมมติฐานของโครงการวิจัยนี้ คือระดับไตรกลีเซอไรด์ที่สูงขึ้นในเลือด เกิดจาก missense mutations ของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระดับไตรกลีเซอไรด์ คือ ยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5*



การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

ไตรกลีเซอไรด์เป็นไขมันชนิดหนึ่งที่ร่างกายสะสมไว้ตามอวัยวะต่างๆเพื่อใช้เป็นพลังงาน ยามที่ร่างกายต้องการ ในกระแสเลือด ไตรกลีเซอไรด์พบได้บน lipoprotein ชนิดต่างๆ เช่น chylomicrons และ very low density lipoprotein (VLDL) ค่าปกติของไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดเมื่ออดอาหารคือน้อยกว่า 150 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (4-5) ระดับของไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (6) โปรตีนหลายชนิดพบว่ามีส่วนบทบาทในการควบคุมระดับไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด Lipoprotein lipase (LPL) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่อยู่บนผิวของ endothelial cells มีหน้าที่ย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ซึ่งเซลล์สามารถใช้เป็นพลังงานได้ การทำงานของ lipoprotein lipase ต้องอาศัย apolipoprotein C-II (apo C-II) ที่ทำหน้าที่เป็น cofactor ในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (18) เมื่อไม่นานมานี้ มีการค้นพบ apolipoprotein A-V (apo A-V) ซึ่งเป็น โปรตีนอีกตัวหนึ่งที่อยู่บน chylomicron ซึ่งช่วยในการทำงานของ lipoprotein lipase ในการย่อยไตรกลีเซอไรด์เช่นกัน (19) การกลายพันธุ์ของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ซึ่ง encode โปรตีน LPL, apo C-II และ apo A-V ตามลำดับ พบว่าเป็นสาเหตุของภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงมาก (20-25) คนไข้ที่มีภาวะนี้ เสี่ยงต่อการเกิดตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งทำให้เกิดภาวะทุพพลภาพและถึงแก่ชีวิตได้

ไตรกลีเซอไรด์จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ (26-27) ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดจะทำให้ทราบถึงกลไกและโปรตีนต่างๆที่ควบคุมระดับไตรกลีเซอไรด์และจะนำไปสู่การค้นพบโปรตีนเป้าหมายที่สามารถนำมาปรับเปลี่ยนระดับไตรกลีเซอไรด์เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจได้

เมื่อความรู้และเทคโนโลยีในด้านพันธุกรรมก้าวหน้าขึ้น ทำให้มีวิธีการทางพันธุกรรม 2 วิธีที่ใช้ในการสืบค้นความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของยีนต่างๆที่มีต่อ complex quantitative traits (8) วิธีแรก คือ genome-wide association studies ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องอาศัยสมมติฐาน และสามารถค้นพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อย แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อลักษณะที่ศึกษา (28) ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ resequencing approach ซึ่งเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนที่พบมีความเกี่ยวข้องับลักษณะที่ศึกษา แต่จะพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบไม่บ่อย แต่มีผลต่อลักษณะที่ศึกษามาก (7) ทั้ง 2 วิธีนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลต่อระดับไขมันในเลือด (8) การศึกษาของ Cohen et al. นับเป็นการศึกษาแรกที่ใช้วิธี resequencing และพบว่าระดับ HDL ในเลือดต่ำนั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *ABCA1*, *APOA1* และ *LCAT* (9)

การศึกษาทางคลินิกถึงปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับภาวะไขมันในเลือดผิดปกติโดยใช้วิธี resequencing อย่างเป็นทางการยังมีอยู่น้อยและทำในประชากรผิวขาวเป็นส่วนใหญ่ โดยศึกษา

ถึงภาวะ HDL ต่ำ HDL สูง ไทรกลีเซอไรด์ต่ำ และ ไทรกลีเซอไรด์สูง (7-9, 11-14) ในประชากรไทย คณะผู้วิจัยเป็นกลุ่มแรกที่ศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมของภาวะไขมันในเลือดสูงผิดปกติในคนไทย โดยเริ่มต้นจากการศึกษาคนไทยที่มีระดับ HDL cholesterol สูงมากด้วยวิธี resequencing ผลการศึกษาพบว่าคนไทยประมาณ 1 ใน 3 มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *CETP* และ *LIPC* ที่น่าจะเป็นสาเหตุของระดับ HDL cholesterol ในเลือดสูงในคนไทย (10) การศึกษาทางพันธุกรรมดังกล่าว ได้ยืนยัน โดยการศึกษากการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ในระดับเซลล์ (in vitro functional studies) ด้วย (15-16) ผลการศึกษาดังกล่าวยืนยันว่าปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับระดับไขมันในเลือดผิดปกติในประชากรต่างเชื้อชาติกันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน กล่าวคือระดับไขมัน HDL สูงในคนไทยถูกควบคุมโดยยีน *CETP* และ *LIPC* ในขณะที่ระดับ HDL สูงในคนผิวขาวถูกควบคุมโดยยีน *LIPG* (12,17)

การศึกษาดังปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับระดับ ไทรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงที่ผ่านมาทำในคนไทยผิวขาวเป็นส่วนใหญ่ เกณฑ์กำหนดว่าระดับ ไทรกลีเซอไรด์สูงมากที่ใช้กันส่วนใหญ่คือมากกว่า 880 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (10 มิลลิโมล/ลิตร) การศึกษาของ Wang et al. ที่ใช้วิธี resequencing ในคนไทยผิวขาวพบมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *LPL* และ *APOC2* บ่อยกว่าปกติ (11)

ยีน *LPL* ประกอบด้วย 10 exons การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *LPL* พบได้ในทุก exon (20) ยีน *APOC2* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 19 ขณะที่ยีน *APOA5* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ทั้ง *APOC2* และ *APOA5* มี 3 exons การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ *APOC2* พบได้ประปรายและมักพบในคนผิวขาว (20) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของยีน *APOA5* พบได้ในประชากรหลายเชื้อชาติและมักพบเป็น missense mutations (25)

ในประเทศไทย การศึกษาปัจจัยที่ควบคุมระดับ ไทรกลีเซอไรด์ในเลือดยังจำกัด มีการศึกษา 1 การศึกษาที่ตรวจการกลายพันธุ์เฉพาะใน exon 2 ของยีน *LPL* แต่ไม่พบทั้งในกลุ่มคนไทยและกลุ่มควบคุม (29) อีก 1 การศึกษาเป็นการตรวจสอบ polymorphisms 2 ตำแหน่งในยีน *LPL* แต่พบว่าไม่เกี่ยวข้องกับระดับ ไทรกลีเซอไรด์ในเลือด (30) การศึกษาที่รายงานนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ค้นหาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระดับ ไทรกลีเซอไรด์ในเลือดในคนไทยอย่างเป็นระบบ

ประโยชน์ที่ได้รับ

ผลของการวิจัยนี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ในการทราบถึงการกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างโปรตีนที่มีบทบาทควบคุมระดับ ไทรกลีเซอไรด์ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างเป็นระบบครบถ้วนมาก่อน รวมทั้งให้ข้อมูลในด้านของ single nucleotide polymorphism ที่เป็นระบบในคนไทย องค์ความรู้ใหม่จากการศึกษานี้ช่วยบอกถึงปัจจัยที่มีผลต่อระดับ ไทรกลีเซอไรด์สูงและสามารถใช้ประยุกต์ใน

การนำมาใช้ในทางคลินิก เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องในคนไข้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไตเรื้อรังในเลือดสูง เช่นคนไข้โรคเอสดีที่จะได้รับยาต้านไวรัสที่ทำให้ระดับไตเรื้อรังสูงขึ้นได้ หน่วยงานที่จะได้ประโยชน์ คือ หน่วยงานที่ดูแลรักษาคนไข้เหล่านี้ โดยความรู้ใหม่เหล่านี้ ได้รับการถ่ายทอดไปยังศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเบาหวาน ฮาร์โมนและเมตาบอลิสม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่หัวหน้าโครงการวิจัยเป็นรองหัวหน้าศูนย์อยู่ เพื่อพิจารณาพัฒนาเป็นการตรวจทางพันธุกรรมสำหรับคนไข้ต่อไป

นอกจากนี้ความรู้ใหม่ดังกล่าวยังเป็นพื้นฐานในการวิจัยต่อยอดในอนาคตเพื่อค้นหาวิธีปรับเปลี่ยนระดับไตเรื้อรังด้วยยาหรือสารที่มีผลต่อโปรตีนเป้าหมายใหม่เหล่านั้น โดยมีจุดหมายเพื่อลดระดับ ไตเรื้อรังและลดการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งและตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันในที่สุด

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเก็บข้อมูล และจำนวนตัวอย่าง

ในการศึกษานี้ ส่วนหนึ่งใช้ตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วม โครงการวิจัยทุนรัชดาภิเษก สมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการ พิจารณาจริยธรรมเรียบร้อยแล้ว และผู้เข้าร่วมวิจัยได้ลงนามยินยอมให้มีการตรวจรหัสสาร พันธุกรรมได้ รวมทั้งเก็บตัวอย่างใหม่เพิ่มจากการสืบค้นข้อมูลของคนไข้ที่มารับการเจาะเลือดที่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และ โรงพยาบาลศิริราช

ผู้ป่วยนอกที่อายุมากกว่า 20 ปี ที่มีประวัติโทรกลีเซอไรด์สูงกว่าหรือเท่ากับ 880 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (10 มิลลิโมล/ลิตร) อย่างน้อย 2 ครั้ง ที่ได้รับการสืบค้นจากฐาน ข้อมูลคอมพิวเตอร์ของ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และ/หรือ โรงพยาบาลศิริราช ได้รับเชิญให้เข้าร่วม โครงการวิจัย ส่วนกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับโทรกลีเซอไรด์น้อยกว่า 150 มิลลิกรัม/ เดซิลิตร เกณฑ์การคัดออกจากการวิจัยคือหญิงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร และ คนไข้ที่มีประวัติ เลือดออกง่ายผิดปกติ

ผู้มีระดับโทรกลีเซอไรด์สูง และกลุ่มควบคุม กลุ่มละประมาณ 90-100 ราย
การคำนวณขนาดตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

$$n/\text{group} = \left[\frac{Z_{\alpha/2} \sqrt{2P_0(1-P_0)} + Z_{\beta} \sqrt{(P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2))}}{(P_1 - P_2)} \right]^2$$

กำหนด $\alpha = 0.05$ $Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$ (two tailed)

$\beta = 0.10$ $Z_{\beta} = Z_{0.10} = 1.28$

$P_1 =$ โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยง = 4.4% = 0.044 (จากการศึกษา
ของ Evans et al. (31))

$P_2 =$ โอกาสที่กลุ่มศึกษาจะมีปัจจัยเสี่ยง = 3/15 = 0.2 (จากการศึกษานำร่อง
โดยคณะผู้วิจัย)

$$P_0 = (P_1 + P_2) / 2$$

$$N / \text{group} = 90 \text{ ราย ต่อกลุ่ม}$$

เนื่องจากอาศัยการเก็บข้อมูลจากผู้ป่วยเพียงครั้งเดียว เพราะฉะนั้นจึงไม่จำเป็นต้องคิด drop out rate ดังนั้นต้องการจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษาทั้งหมดประมาณ 90-100 ราย/กลุ่ม

วิธีการวิจัยและวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

มีการเก็บข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางคลินิกของคนไข้และกลุ่มควบคุม เช่น เพศ อายุ น้ำหนักตัว ดัชนีมวลกาย ความดันโลหิต ระดับไขมันรวมทั้งไตรกลีเซอไรด์ ระดับน้ำตาลในเลือด การทำงานของตับและไต โรคร่วมที่พบเช่นความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง ประวัติประจำเดือน (ในเพศหญิง) ยาที่ใช้ประจำ การดื่มเหล้า ปริมาณและความถี่ การสูบบุหรี่ ข้อมูลเหล่านี้นำมาหาความสัมพันธ์กับระดับไตรกลีเซอไรด์

มีการเก็บเลือดคนไข้และกลุ่มควบคุมหลังอดอาหาร 12 ชั่วโมง จากนั้น นำเลือดมาปั่น แยกซีรัมและสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม ดีเอ็นเอของผู้มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง และของกลุ่มควบคุม ถูกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ในส่วนของ exon และ exon-intron junction ของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ที่สร้างโปรตีน lipoprotein lipase, apolipoprotein C-II และ apolipoprotein A-V ตามลำดับ จากนั้น มีการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอว่าถูกต้องตามที่ต้องการด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วส่งดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วไปตรวจสอบรหัสพันธุกรรม โดยวิธี direct sequencing ด้วย automated DNA analyzer

ในการตรวจสอบรหัสพันธุกรรมของยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* เมื่อพบการกลายพันธุ์ที่ผิดปกติ มีการยืนยันซ้ำ และนำไปเปรียบเทียบกับ database ที่มีอยู่ รวมทั้งค้นหาเพิ่มเติมในผู้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง และกลุ่มควบคุมทั้งหมด โดยใช้วิธี direct sequencing และ/หรือ PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

เมื่อพบว่ามีการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน หรือมีการกลายพันธุ์ที่คาดว่าจะทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป มีการทำนายการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่ค้นพบ โดยใช้ software program ต่างๆประกอบกัน เช่น PANTHER (<http://www.pantherdb.org>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) และ SNP3D (<http://www.snp3d.org>).

นอกจากนี้ ได้ทำการยืนยันการเปลี่ยนแปลงหน้าที่โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่ในระดับเซลล์ (expression studies) ซึ่งใช้วิธีมาตรฐานในการแสดงออกของยีนแบบชั่วคราว (transient expression) โดยมีการเตรียม full length cDNA และ mutant cDNA ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตามที่พบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี site-directed mutagenesis และยืนยันด้วยการทำ sequencing เพื่อ clone เข้าไปใน expression vector จากนั้น จะทำการ transfect เข้าในเซลล์ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหน้าที่ในระดับเซลล์ทำโดยการวัดการทำงานของปริมาณของเอนไซม์ในเซลล์และใน media ที่เพาะเลี้ยงเซลล์เปรียบเทียบกันระหว่าง cDNA ปกติและ cDNA ที่มีการกลายพันธุ์

ผลการวิจัย

ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษาแสดงในตารางที่ 1 คนไข้กลุ่มที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงมีระดับ total cholesterol และ triglyceride สูงกว่า แต่มีระดับ HDL-cholesterol ต่ำกว่า พิสัยของระดับไตรกลีเซอไรด์ในกลุ่มที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงอยู่ระหว่าง 892-10,840 มก./ดล.

ตารางที่ 1. ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา

	HTG (n=101)	Controls (n=111)	P value
อายุ (ปี)	48 ± 11	54 ± 12	<0.001
ร้อยละของเพศหญิง	37%	40%	0.38
ดัชนีมวลกาย (กก./ม. ²)	25.0 ± 4.1	24.0 ± 4.6	0.10
Total cholesterol (มก./ดล.)	320 ± 199	190 ± 41	<0.001
Triglyceride (มก./ดล.)	1,944 ± 1,532	96 ± 30	<0.001
HDL-cholesterol (มก./ดล.)	33 ± 13	56 ± 19	<0.001

แสดงข้อมูลเป็น mean ± SD หรือ %. HTG = hypertriglyceridemia

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบไม่บ่อย (rare variant) แสดงในตารางที่ 2 จากการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อย 6 แบบในยีน *LPL* ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่พบใหม่ 3 แบบ การเปลี่ยนแปลงที่เคยมีการรายงานมาก่อน 3 แบบ ทั้งหมดเป็น heterozygous missense variants ได้แก่ p.Ala98Thr, p.Leu279Val และ p.Leu279Arg ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 นี้ มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (25, 26) สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่พบใหม่ 3 แบบ พบว่า 2 แบบ เป็น missense variants คือ p.Arg270Gly และ p.Arg432Thr เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมต่างๆ 3 โปรแกรม พบว่าการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 นี้ มีผลต่อการทำงานของโปรตีน ทำให้การทำงานเปลี่ยนไป (damaging effect) ดังตารางที่ 2 ส่วนการเปลี่ยนแปลงสุดท้ายที่พบใหม่เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ 23-bp duplication ใน exon 6 คือ c.899_921dup GGCTCTGCTTGAGTTGTAGAAAG ซึ่งพยากรณ์ว่าทำให้เกิด frameshift mutation และส่งผลให้เกิด premature stop codon หลังจากนั้น 3 amino acids (p.Asp308Glyfs*3) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้โปรตีนสั้นลงและขาดส่วนที่เป็น C-terminus ซึ่งมีผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่าง lipoproteins กับ lipoprotein receptors

ตารางที่ 2. การเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อย (rare variant) ในยีน *LPL* และ *APOA5*

ตำแหน่ง	ชื่อการเปลี่ยนแปลง		พยากรณ์ผลต่อโปรตีน			จำนวน	
	ระดับ DNA	ระดับ Protein (SNP identifier)	PANTHER (subPSEC score)	SIFT score	SNPs3D (SVM score)	HTG (n=101)	Control (n=111)
ยีน							
<i>LPL</i>							
Exon 3	c.292G>A	p.Ala98Thr (rs14567341)	-4.02135	0.05	-0.73	3	0
Exon 6	c.808C>G	p.Arg270Gly (novel)	-4.98312	0.00	-3.72	1	0
	c.835C>G	p.Leu279Val (rs371282890)	-3.85059	0.00	-0.13	5	0
	c.836T>G	p.Leu279Arg (rs35414700)	-5.49939	0.00	-1.16	1	0
	c.899_921 dup GGCTCT GCTTGA GTTGTA GAAAG	p.Asp308Gly fs*3 (novel)	-	-	-	2	0
Exon 8	c.1295G>C	p.Arg432Thr (novel)	-4.19806	0.00	1.16	1	0
<i>APOA5</i>							
Exon 3	c.56C>G	p.Ser19Trp (S19W)	-4.01626	0.00	3.16	2	0

HTG = hypertriglyceridemia; subPSEC = substitution position-specific evolutionary conservation;

SIFT = Sorting Intolerant From Tolerant; SVM = support vector machine

ในยีน *APOA5* พบการเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อย 1 แบบ คือ p.Ser19Trp และไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยในยีน *APOC2*

พบการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย (common variant) 1 แบบในยีน *LPL* คือ p.Ser477Ter (เดิมรู้จักกันในชื่อของ S447X) ดังแสดงในตารางที่ 3 ในการศึกษาครั้งนี้ พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีน้อยกว่าในกลุ่มที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง

พบการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย 3 แบบในยีน *APOA5* คือ c.-3A>G, p.Val153Met และ p.Gly185Cys ความชุกของทั้ง c.-3A>G และ p.Gly185Cys พบน้อยกว่าในกลุ่มคนไข้ที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงมากกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. การเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย (common variant) ในยีน *LPL* และ *APOA5*

ตำแหน่ง	ชื่อการเปลี่ยนแปลง			Allele frequencies		P value
	ระดับ DNA	ระดับ Protein (common name)	SNP Identifier	HTG (n=101)	Controls (n=111)	
ยีน						
<i>LPL</i>						
Exon 9	c.1421 C>G	p.Ser474Ter (S447X)	rs328	0.030	0.072	0.0773
<i>APOA5</i>						
Exon 2	c.-3A>G	Kozac sequence	rs651821	0.550	0.221	2.72 x 10 ⁻¹²
Exon 4	c.457G>A	pVal153Met (V153M)	rs3135507	0.079	0.072	0.8486
Exon 4	c.553G>T	p.Gly185Cys (G185C)	rs2075291	0.144	0.032	3.58 x 10 ⁻⁵

HTG = hypertriglyceridemia; SNP = single nucleotide polymorphism

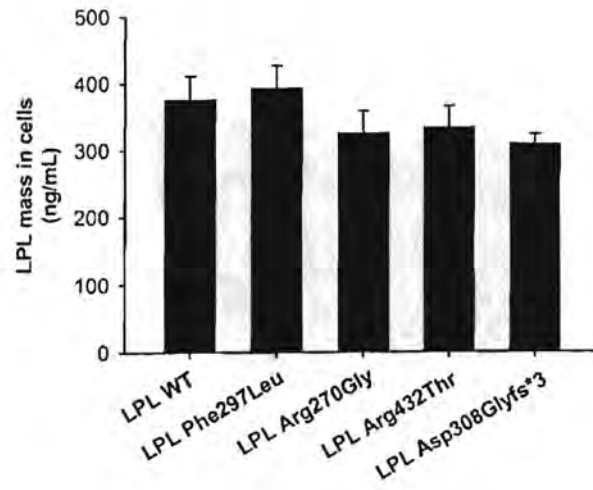
การเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยในยีน *LPL* หรือ *APOA5* พบได้ 15% ในกลุ่มที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง เทียบกับ 0% ในกลุ่มควบคุม (Odds ratio = 40.0, 95% confidence interval 2.4 to 677.3, $P=8.23 \times 10^{-6}$ ดังแสดงในตารางที่ 4) เมื่อคำนวณ carrier odds ratio (OR) สำหรับคนไข้ที่มี

การเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยในยีน *LPL* หรือ *APOA5* ≥ 1 แบบหรือการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยของยีน *APOA5* p.Gly185Cys เท่ากับ 8.59, 95% confidence interval 3.6 to 20.4 ($P=3.08 \times 10^{-8}$)

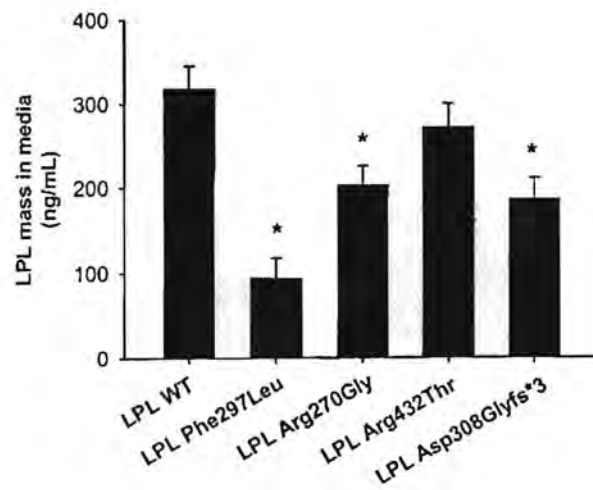
ตารางที่ 4. Carrier frequencies ของการเปลี่ยนแปลงที่พบในยีน *LPL* และ *APOA5*

	HTG (n=101)	Controls (n=111)	P value
Rare variants			
- ≥ 1 <i>LPL</i> variants	13 (13%)	0	4.23×10^{-5}
- ≥ 1 <i>APOA5</i> variants	2 (2%)	0	0.2258
- ≥ 1 <i>LPL</i> or <i>APOA5</i> variants	15 (15%)	0	8.23×10^{-6}
Common variants			
- ≥ 1 <i>APOA5</i> p.Gly185Cys	25 (25%)	7 (6%)	0.0002
Rare and common variants			
- ≥ 1 rare variants or <i>APOA5</i> p.Gly185Cys	37 (37%)	7 (6%)	3.08×10^{-8}

ในการศึกษานี้ พบการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมใหม่ในยีน *LPL* ที่ไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน 3 แบบ ซึ่งเป็น missense variants 2 แบบคือ p.Arg270Gly และ p.Arg432Thr และ duplication variant อีก 1 แบบ จึงมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยการศึกษาหน้าที่ด้วย *in vitro* expression studies ในการทดลองดังกล่าว ได้ทำ site-directed mutagenesis ของยีน *LPL* ให้ได้การเปลี่ยนแปลงที่ต้องการ โดยมีการยืนยันผลของการทำ mutagenesis ด้วยการ sequencing จากนั้น จึง transfect cld mutant cells ด้วย wild type และ mutant *LPL* แบบต่างๆ ซึ่งมีทั้ง new variants ที่ได้จากการทำ mutagenesis และ known variant ที่เคยมีการทดลองมาก่อนหน้านี้แล้ว ทำให้การทำงานของ *LPL* ลดลง (32) หลังจาก transfection ได้นำ cell lysate มาวัดปริมาณของ *LPL* ภายในเซลล์และนำ media มาวัดปริมาณของ *LPL* ที่หลั่งออกมาออกเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าปริมาณของ *LPL* ในเซลล์ที่แสดงออก *LPL* variant ต่างๆ ไม่ได้แตกต่างจาก wild type อย่างมีนัยสำคัญดังรูปที่ 1 แต่ปริมาณของ *LPL* ใน media ลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน p.Arg270Gly และ p.Asp308Glyfs*3 เมื่อเทียบกับ wild type *LPL* ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 ปริมาณ LPL ของ variants ต่างๆในเซลล์



รูปที่ 2 ปริมาณ LPL ของ variants ต่างๆใน media (*: $P < 0.005$)

นอกเหนือจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ดังกล่าวแล้ว คณะผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีน *GPIHBP1* ซึ่ง encode โปรตีน GPIHBP1 (Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein1) ซึ่งเป็นโปรตีนใหม่ที่พบว่ามีความสำคัญในกระบวนการ triglyceride lipolysis ในหลอดเลือด (33) ในคนไข้ที่มีระดับ triglyceride ในเลือดสูงมากที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนคือ c.320C>G ทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 107 จาก serine เป็น cysteine (p.S107C) ผลการวิจัยเพิ่มเติมพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ mutant S107C GPIHBP1 ที่เกิดขึ้นจับตัวกันเป็น dimers และ multimers ซึ่งแตกต่างจาก wild type GPIHBP1 ที่เป็น monomers การศึกษาหน้าที่ในระดับเซลล์พบว่า wild type GPIHBP1 monomer สามารถจับกับ LPL ได้ ในขณะที่ mutant S107C GPIHBP1 ไม่สามารถจับกับ LPL ได้ (34)

อภิปรายผล

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* ที่มีผลต่อระดับ ไทรอกลิเซอไรด์นั้น เคยมีการศึกษาในคนผิวขาวเท่านั้น (6) การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างเป็นระบบของการเปลี่ยนแปลงในยีนเหล่านี้ใน ประชากรชาวเอเชีย ผลการศึกษานี้และการศึกษาที่ผ่านมาในคนผิวขาวสนับสนุนว่าการ เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทั้งที่พบบ่อยและพบไม่บ่อยในยีน *LPL*, *APOC2* และ *APOA5* มีส่วนทำ ให้ระดับ ไทรอกลิเซอไรด์สูงขึ้นได้

ในประเทศไทยที่ศึกษา พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อย 1 แบบในยีน *APOA5* คือ p.Gly185Cys พบได้ถึงประมาณ 1 ใน 4 ของคนไข้ที่มีระดับ ไทรอกลิเซอไรด์สูงมาก การ เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมนี้ พบเฉพาะในคนเอเชีย แต่แทบไม่พบเลยในคนผิวขาวหรือประชากร อื่นๆ (27-29) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางหน้าที่ของ p.Gly185Cys พบว่ามีการลดลงในการ กระตุ้น lipoprotein lipase (18) สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยในยีน *LPL* ที่สามารถทำให้ระดับ ไทรอกลิเซอไรด์สูงขึ้นนั้น ไม่พบในประเทศไทยที่ศึกษา

ในการศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อย 6 แบบในยีน *LPL* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่ เคยมีการรายงานมาก่อนทั้ง 3 แบบ พบว่าสัมพันธ์กับระดับ ไทรอกลิเซอไรด์สูง (25, 26) ส่วนการ เปลี่ยนแปลงที่พบใหม่ 3 แบบ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมต่างๆ พบว่าการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 แบบ น่าจะมีผลให้การทำงานของโปรตีนลดลง แต่เมื่อยืนยัน โดยผลของการทำ in vitro functional studies พบว่า p.Arg270Gly และ p.Asp308Glyfs*3 เท่านั้นที่มีผลต่อการหลั่ง LPL ออกมานอกเซลล์

การเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยในยีน *APOA5* 1 แบบที่พบในการศึกษานี้คือ p.S19W ซึ่งเป็น การเปลี่ยนแปลงที่พบได้บ่อยในคนผิวขาวที่มีระดับ ไทรอกลิเซอไรด์สูง แต่ไม่ค่อยพบในคนเอเชีย (30) สำหรับการเปลี่ยนแปลงในยีน *APOC2* นั้น ไม่พบในการศึกษานี้ ซึ่งตรงกับการศึกษาก่อนหน้า นี้ที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงในยีนดังกล่าว พบได้น้อยมาก (31)

โดยสรุป การเปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยในยีน *LPL* และ *APOA5* พบได้บ่อยกว่าในกลุ่ม คนไข้ที่มีระดับ ไทรอกลิเซอไรด์ในเลือดสูง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในยีน *APOC2* การ เปลี่ยนแปลงที่พบไม่บ่อยและพบใหม่ในการศึกษานี้ ยังไม่เคยพบในการศึกษาก่อนๆ สำหรับการ เปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยในยีน *APOA5* คือ p.Gly185Cys นั้น พบได้บ่อยในคนที่ระดับ ไทรอกลิเซอไรด์ในเลือดสูง โดยรวมแล้ว ประมาณ 1 ใน 3 (37%) ของคนที่ระดับ ไทรอกลิเซอไรด์ในเลือดสูง พบมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบไม่บ่อย ≥ 1 แบบในยีน *LPL* หรือ *APOA5* หรือพบการ เปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยในยีน *APOA5* คือ p.Gly185Cys ≥ 1 copy ซึ่งการเปลี่ยนแปลงหลังสุดนี้ พบ ได้บ่อยและส่งผลให้คนไข้มีระดับ ไทรอกลิเซอไรด์ในเลือดสูงขึ้นได้

สรุป

ในคนไทยที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ประมาณ 1 ใน 3 (37%) พบมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบไม่บ่อย ≥ 1 แบบในยีน *LPL* หรือ *APOA5* หรือพบการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยในยีน *APOA5* คือ p.Gly185Cys ≥ 1 copy

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

การวิจัยในขั้นต่อไป ควรมีการรวบรวมคนไข้ให้ได้มากกว่านี้จากหลายๆสถาบัน

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยนี้ สามารถนำไปประยุกต์ในการนำมาใช้ในทางคลินิก เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องในคนไข้ที่จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง เช่นคนไข้โรคเอสทีที่จะได้รับยาต้านไวรัสที่ทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้น เป็นต้น

ผลงานตีพิมพ์

1. Plengpanich W, Young SG, **Khovidhunkit W**, Bensadoun A, Karnman H, Ploug M, Gårdsvoll H, Leung CS, Adeyo O, Larsson M, Muanpetch S, Charoen S, Fong LG, Niramitmahapanya S, Beigneux AP. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. **Journal of Biological Chemistry**. 2014 Jul 11;289(28):19491-9.

เป็น **co-corresponding author**

Impact factor (2014): **4.573**

2. **Khovidhunkit W**, Charoen S, Kiateprungvej A, Chartyingcharoen P, Muanpetch S, Plengpanich W. Rare and common variants in LPL and APOA5 in Thai subjects with severe hypertriglyceridemia: A resequencing approach. **Journal of Clinical Lipidology**. Available online 17 November 2015, article in press

เป็น **first and corresponding author**

Impact factor (2014): **3.904**

บรรณานุกรม

1. Khoo KL, Tan H, Liew YM, Deslypere JP, Janus E. Lipids and coronary heart disease in Asia. *Atherosclerosis*. 2003;169:1-10.
2. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009 Mar;5(3):150-9.
3. Aekplakorn W, Kosulwat V, Suriyawongpaisal P. Obesity indices and cardiovascular risk factors in Thai adults. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30:1782-90.
4. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123:2292-333.
5. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004;110:227-39.
6. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009;10:109-21.
7. Topol EJ, Frazer KA. The resequencing imperative. *Nat Genet*. 2007;39:439-40.
8. Khor CC, Goh DL. Strategies for identifying the genetic basis of dyslipidemia: genome-wide association studies vs. the resequencing of extremes. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:123-7.
9. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*. 2004;305:869-72.
10. Khovidhunkit W, Chartyingcharoen P, Siriwong S, Limumpompetch P, Plengpanich W. Resequencing CETP, LIPC and LIPG Genes in Thai Subjects With Hyperalphalipoproteinemia. *Am J Cardiol*. 2012 Jul 1;110(1):62-6.
11. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, Yusuf S, Pollex RL, Hegele RA. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2450-5.
12. Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, Cupples LA, Demissie S, Manning AK, Jensen MK, Rimm EB, Wang J, Rodrigues A, Bamba V, Khetarpal SA, Wolfe ML,

Derohannessian S, Li M, Reilly MP, Aberle J, Evans D, Hegele RA, Rader DJ: Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans. *J Clin Invest*. 2009 Apr;119(4):1042-50.

13. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):513-6.

14. Evans D, Aberle J, Beil FU. Resequencing the apolipoprotein A5 (APOA5) gene in patients with various forms of hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2011 Dec;219(2):715-20.

15. Plengpanich W, Le Goff W, Poolsuk S, Julia Z, Guerin M, Khovidhunkit W. CETP deficiency due to a novel mutation in the CETP gene promoter and its effect on cholesterol efflux and selective uptake into hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):370-3.

16. Plengpanich W, Tongkobpetch S, Shotelersuk V, Le Goff W, Khovidhunkit W. Functional analyses of three novel mutations in the *CETP* Promoter and two novel mutations in *LIPC* in subjects with hyperalphalipoproteinemia. Manuscript in preparation.

17. van der Steeg WA, Hovingh GK, Klerkx AH, Hutten BA, Nootenboom IC, Levels JH, van Tol A, linga-Thie GM, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. Cholesteryl ester transfer protein and hyperalphalipoproteinemia in Caucasians. *J Lipid Res*. 2007;48:674-682.

18. Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism*. 2012 Jul;61(7):906-21.

19. Tai ES, Ordovas JM. Clinical significance of apolipoprotein A5. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Aug;19(4):349-54.

20. Fojo SS, Brewer HB. Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *J Intern Med*. 1992;231:669-77.

21. Evans V, Kastelein JJ. Lipoprotein lipase deficiency--rare or common? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002;16:283-7.

22. Santamarina-Fojo S. The familial chylomicronemia syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27:551-67.

23. Crecchio C, Capurso A, Pepe G. Identification of the mutation responsible for a case of plasmatic apolipoprotein CII deficiency (Apo CII-Bari). *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:1118-27.

24. Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. *J Intern Med.* 2008;263:450-8.
25. Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, Hubacek JA, Merke M, Cooper JA, Lookene A, Putt W, Whittall R, Lee PJ, Lins L, Delsaux N, Nierman M, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ, Vrablik M, Olivecrona G, Schneider WJ, Heeren J, Humphries SE, Talmud PJ. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1866-71.
26. Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium and Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Sandhu MS, et al. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet.* 2010;375:1634-9.
27. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007;115:450-8.
28. Willer CJ, Mohlke KL. Finding genes and variants for lipid levels after genome-wide association analysis. *Curr Opin Lipidol.* 2012 Apr;23(2):98-103.
29. Tirawanchai N, Yamwong P, Pongrapeeporn KU, Likidlilid A, Ong-Ajyooth S, Amornrattana A. Screening for a D9N common mutation in exon 2 of the LPL gene in Thai normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *J Med Assoc Thai.* 2000;83 Suppl 2:S54-60.
30. Tirawanchai N, Dulyasukdi B, Likidlilid A, Pongrapeeporn KU, Poldee S, Amornrattana A. Polymorphism of the gene encoding lipoprotein lipase in thai primary hyperlipoproteinemias. *J Med Assoc Thai.* 2000;83 Suppl 2:S19-27.
31. Evans D, Arzer J, Aberle J, Beil FU. Rare variants in the lipoprotein lipase (LPL) gene are common in hypertriglyceridemia but rare in Type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2011;214:386-90.
32. Takagi A, Ikeda Y, Takeda E, Yamamoto A. A newly identified lipoprotein lipase (LPL) gene mutation (F270L) in a Japanese patient with familial LPL deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Nov 15;1502(3):433-46.
33. Beigneux AP, Weinstein MM, Davies BS, Gin P, Bensadoun A, Fong LG, Young SG. GPIHBP1 and lipolysis: an update. *Curr Opin Lipidol.* 2009 Jun;20(3):211-6.

34. Plengpanich W, Young SG, Khovidhunkit W, Bensadoun A, Karnman H, Ploug M, Gårdsvoll H, Leung CS, Adeyo O, Larsson M, Muanpetch S, Charoen S, Fong LG, Niramitmahapanya S, Beigneux AP. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. *J Biol Chem.* 2014 Jul 11;289(28):19491-9.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย วีรพันธุ์ โขวิฑูรกิจ
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Weerapan Khovidhunkit

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-1005-02724-16-5

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ นายแพทย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึม ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตึกสามัคคีพยาบาลชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4101, 02-256-4296, 086-811-8875

โทรสาร 02-652-5347

E-mail : wkhovid@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 แพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง เจริญทอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2535

5.2 American Board of Internal Medicine, Albert Einstein Medical Center สหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2539

5.3 American Board of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, University of California at San Francisco สหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2542

5.4 Ph. D. (Biomedical Sciences), University of California at San Francisco สหรัฐอเมริกา ปี พ.ศ. 2545

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Lipid and lipoprotein metabolism, biochemistry, genetics, molecular biology, proteomics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.1 โครงการวิจัยเรื่อง "Proatherogenic effects of high-density lipoprotein during the acute-phase response" ทุน American Heart Association ปีพ .ศ.2543 -2545

7.1.2 โครงการวิจัยเรื่อง "Identification and characterization of high-density lipoprotein-associated proteins during the acute-phase response" ทุน American Heart Association ปีพ .ศ.2545

7.1.3 โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของไลโปโปรตีนของผู้ป่วยระหว่างและหลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสโลหิต” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ .ศ.2546 - 2547

7.1.4 โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ high-density lipoproteins ในภาวะตอบสนอง acute-phase” ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ปีพ .ศ.2546 - 2548

7.1.5 โครงการวิจัยเรื่อง “การทำงานของเอนไซม์โคเลสเตอรอลรีด เอสเทอร์ ทรานสเฟอร์ โปรตีนในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ .ศ.2547 – 2548

7.1.6 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิต polyclonal antibodies ต่อ apolipoprotein A-I ของมนุษย์ในกระต่าย” ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีพ .ศ.2547 – 2548

7.1.7 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความไวของอินซูลินในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ปี พ254 .ศ.8

7.1.8 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การประเมินภาวะดื้ออินซูลิน การทำงานของเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และระดับไขมันในเลือดในหญิงมีครรภ์ปกติและหญิงที่เป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์เพื่อทำนายผลของการตั้งครรภ์ต่อมารดาและทารก” ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพ .ศ. 2549

7.1.9 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การทำงานของเอนไซม์เฮพพาทิก ไลเปส และไลโปโปรตีนไลเปสในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ปีพ 2549 .ศ.

7.1.10 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การเปรียบเทียบ โปรตีนส่วนประกอบของเอชดีแอลในผู้ที่มีระดับเอชดีแอลในเลือดสูงมากกับคนปกติด้วยวิธีการทางโปรตีโอมิกส์ ” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีพ 2550 .ศ.

7.1.11 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “สุขภาพในช่องปากกับโรคหลอดเลือดและหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานวัยกลางคนและผู้สูงอายุ” ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ปี 2550

7.1.12 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาโปรตีนส่วนประกอบของเอชดีแอลในผู้ที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิตด้วยวิธีการทางโปรตีโอมิกส์” ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ25 .ศ.51

7.1.13 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ retinol binding protein 4 กับผลของการตั้งครรภ์ ในหญิงมีครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์” ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีพ25 .ศ.52

7.1.14 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาการห้สพันธุกรรมในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก โดยวิธีถอดรหัสและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหน้าที่” ทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีพ25 .ศ.52-2555

7.1.15 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาการห้สพันธุกรรมในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดีแอลสูงมาก โดยวิธีถอดรหัสและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงหน้าที่” ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีพ25 .ศ.53 และ 2554

7.1.16 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “โครงการวิจัยนำร่องการศึกษาการห้สพันธุกรรมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในเมตาบอลิซึมของไตรกลีเซอไรด์ในประชากรไทยที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงมาก” ทุนรัชดาภิเษกสมโภช โครงการนำร่อง Emerging Health Risk Cluster จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.1.17 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความแตกต่างของระดับอะโปไลโปโปรตีนเอไฟว์ในคนไข้ที่มีภาวะเหตุติดเชื้อ ภาวะความเจ็บป่วยเฉียบพลันจากสาเหตุอื่นและภาวะที่ไม่มีความเจ็บป่วยแบบเฉียบพลัน” ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ ประจำปีพ25 .ศ.54

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ย้อนหลัง 5 ปี)

7.2.1 Plengpanich W, Le Goff W, Poolsuk S, Julia Z, Guerin M, **Khovidhunkit W**. CETP deficiency due to a novel mutation in the CETP gene promoter and its effect on cholesterol efflux and selective uptake into hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):370-3. ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.2.2 **Khovidhunkit W**. A genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *New England Journal of Medicine*. 2011 Apr 7;364(14):1375-6.

7.2.3 **Khovidhunkit W**, Pruksakorn P, Plengpanich W, Tharavanij T. Retinol-binding protein 4 is not associated with insulin resistance in pregnancy. *Metabolism*. 2012 Jan;61(1):65-9. ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนงบประมาณแผ่นดิน

7.2.4 Somporn P, Hirankarn N, Leelahavanichkul A, **Khovidhunkit W**, Thongboonkerd V, Avihingsanon Y. Urinary proteomics revealed prostaglandin H(2)D-isomerase, not Zn- α 2-glycoprotein, as a biomarker for active lupus nephritis. *Journal of Proteomics*. 2012 Jun 18;75(11):3240-7. ทุนงบประมาณแผ่นดิน

7.2.5 **Khovidhunkit W**, Chartyingcharoen P, Siriwong S, Limumpornpetch P, Plengpanich W. Resequencing CETP, LIPC and LIPG Genes in Thai Subjects With Hyperalphalipoproteinemia. *American Journal of Cardiology*. 2012 Jul 1;110(1):62-6. **ทุนวิจัย**
รัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.2.6 **Khovidhunkit W**, Silaruks S, Chaithiraphan V, Ongphiphadhanakul B, Sritara P, Nimitphong H, Benjanuwattra T, Ambegaonkar BM. Prevalence of Dyslipidemia and Goal Attainment After Initiating Lipid-Modifying Therapy: A Thai Multicenter Study. *Angiology*. 2012 Oct;63(7):528-34.

7.2.7 Plengpanich W, Tongkobpetch S, Shotelersuk V, Le Goff W, **Khovidhunkit W**. Functional characterization of novel variants in the CETP promoter and the LIPC gene in subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 1;416:92-5. **ทุนงบประมาณแผ่นดิน ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนานักวิจัย**
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.2.8 Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, Ohman P, Frederich R, Wiviott SD, Hoffman EB, Cavender MA, Udell JA, Desai NR, Mosenzon O, McGuire DK, Ray KK, Leiter LA, Raz I; SAVOR-TIMI 53 Steering Committee and Investigators. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2013 Oct 3;369(14):1317-26.

7.2.9 Unniachan S, Bash LD, **Khovidhunkit W**, Sri RZ, Vicaldo E, Recto C 2nd, Ambegaonkar BM. Prevalence of lipid abnormalities and attainment of normal lipid levels among patients with dyslipidaemia: a pooled analysis of observational studies from five Asian countries. *Int J Clin Pract*. 2014 Aug;68(8):1010-9.

7.2.10 El Khoury P, Plengpanich W, Frisdal E, Le Goff W, **Khovidhunkit W**, Guerin M. Improved plasma cholesterol efflux capacity from human macrophages in patients with hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 2014 May;234(1):193-9. **ทุนวิจัยรัชดาภิเษก**
สมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

7.2.11 Rawdaree P, Sarinnapakorn V, Pattanaungkul S, **Khovidhunkit W**, Tannirandom P, Peerapatdit T. A prospective, longitudinal, multicenter, observational study to assess insulin treatment patterns in diabetic patients in Thailand: results from the TITAN Study. *J Med Assoc Thai*. 2014 Nov;97(11):1140-50.

7.2.12 Plengpanich W, Young SG, **Khovidhunkit W**, Bensadoun A, Kamman H, Ploug M, Gårdsvoll H, Leung CS, Adeyo O, Larsson M, Muanpetch S, Charoen S, Fong LG,

Niramitmahapanya S, Beigneux AP. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. *J Biol Chem*. 2014 Jul

11;289(28):19491-9. **ทุนงบประมาณแผ่นดินและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์**

7.2.13 Ngaosuwan K, HOUNGNGAM N, LIMPISOOK P, PIENGpanich W,

Khovidhunkit W. Apolipoprotein A-V is not a major determinant of triglyceride levels during human sepsis. *J Crit Care*. 2015 Aug;30(4):727-31. **ทุนงบประมาณแผ่นดินและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์**

7.2.14 Srichomkwun P, HOUNGNGAM N, PASATrat S, THARAVANIJ T, WATTANACHANYA

L, **Khovidhunkit W.** Undercarboxylated osteocalcin is associated with insulin resistance, but not adiponectin, during pregnancy. *Endocrine*. 2015 Dec 26. [Epub ahead of print] **ทุนงบประมาณแผ่นดินและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์**

7.2.15 Avihingsanon A, Kerr SJ, Ramautarsing RA, Praditpornsilpa K,

Sophonphan J, Ubolyam S, Avihingsanon Y, **Khovidhunkit W,** Hiransuthikul N, Ruxrungtham K. The Association of Gender, Age, Efavirenz Use, and Hypovitaminosis D Among HIV-Infected Adults Living in the Tropics. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015 Oct 15. [Epub ahead of print]

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาววานี เปล่งพานิชย์
(ภาษาอังกฤษ) Miss Wanee Plengpanich

.2 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1307-00161-01-9

.3 ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

.4 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยปฏิบัติการวิจัย Hormonal and Metabolic Disorders Research Unit

ตึก อปร. ชั้น 9 ห้อง 901/21 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทร 02-256-4000 ต่อ 3594, 086-707-9451

E-mail: wanee8748248@gmail.com

.5 ประวัติการศึกษา

5.1 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2541

5.2 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2545

5.3 Ph.D. สาขา Biomedical Sciences จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2551

.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Genetics, Molecular biology

.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.1 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษารหัสพันธุกรรมในส่วนโปรโมเตอร์ของ
ยีน โคเลสเตอรอล เอสเทอร์ ทรานสเฟอร์ โปรตีน ในคนไทยที่มีไขมันในเลือดชนิดเอชดี แอลสูง
มาก" ทูลส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว. ปีพ .ศ.2553

7.1.2 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง " Functional studies of novel variants in the
CETP and the *LIPC* genes in patients with hyperalphalipoproteinemia" ทูล Junior Research
Fellowship Program 2011 โดยรัฐบาลฝรั่งเศส

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว(ปี 5 ย้อนหลัง)

7.2.1 Snabboon T, **Plengpanich W**, Houngngam N, Buranasupkajorn P,
Plengvidhya N, Sereepapong W, Sunthornyothin S, Shotelersuk V. Concurrent bilateral
pheochromocytoma and thoracic paraganglioma during pregnancy. *Endocrine*. 2010; 37 (2): 261-

4.

7.2.2 **Plengpanich W**, Le Goff W, Poolsuk S, Julia Z, Guerin M, Khovidhunkit W. CETP deficiency due to a novel mutation in the *CETP* gene promoter and its effect on cholesterol efflux and selective uptake into hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2011;370-3. **ทุนส่งเสริม นักวิจัยรุ่นใหม่ สกว.**

7.2.3 Khovidhunkit W, Pruksakorn P, **Plengpanich W**, Tharavanij T. Retinol-binding protein 4 is not associated with insulin resistance in pregnancy. *Metabolism*. 2012;61(1): 65-9.

7.2.4 Khovidhunkit W, Chartyingcharoen P, Siriwong S, Limumpornpetch P, **Plengpanich W**. Resequencing *CETP*, *LIPC* and *LIPG* Genes in Thai Subjects with Hyperalphalipoproteinemia. *Am J Cardiol*. 2012; 110(1):62-6.

7.2.5 **Plengpanich W**, Tongkobpetch S, Shotelersuk V, Le Goff W, Khovidhunkit W. Functional characterization of novel variants in the CETP promoter and the LIPC gene in subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Clin Chim Acta*. 2013 Feb 1;416:92-5. **ทุนงบประมาณแผ่นดิน ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย**

7.2.6 Bocchetta S, Maillard P, Yamamoto M, Gondeau C, Douam F, Lebreton S, Lagaye S, Pol S, Helle F, **Plengpanich W**, Guérin M, Bourguine M, Michel ML, Lavillette D, Roingeard P, le Goff W, Budkowska A. Up-regulation of the ATP-binding cassette transporter A1 inhibits hepatitis C virus infection. *PLoS One*. 2014 Mar 19;9(3):e92140.

7.2.7 El Khoury P, **Plengpanich W**, Frisdal E, Le Goff W, Khovidhunkit W, Guerin M. Improved plasma cholesterol efflux capacity from human macrophages in patients with hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 2014 May;234(1):193-9. **ทุนงบประมาณแผ่นดินและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์**

7.2.8 **Plengpanich W**, Young SG, Khovidhunkit W, Bensadoun A, Karnman H, Ploug M, Gårdsvoll H, Leung CS, Adeyo O, Larsson M, Muanpetch S, Charoen S, Fong LG, Niramitmahapanya S, Beigneux AP. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. *J Biol Chem*. 2014 Jul 11;289(28):19491-9. **ทุนงบประมาณแผ่นดินและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์**

7.2.9 Olivier M, Bott G R, Frisdal E, Nowick M, Plengpanich W, Desmarchelier C, Roi S, Quinn CM, Gelissen I, Jessup W, Van Eck M, Guérin M, Le Goff W, Reboul E. ABCG1 is involved in vitamin E efflux. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Dec;1841(12):1741-51.

7.2.10 Frisdal E, Le Lay S, Hooton H, Poupel L, Olivier M, Alili R, **Plengpanich W**, Villard EF, Gilibert S, Lhomme M, Superville A, Miftah-Alkhair L, Chapman MJ, Dallinga-Thie GM, Venteclef N, Poitou C, Tordjman J, Lesnik P, Kontush A, Huby T, Dugail I, Clement K, Guerin M, Le Goff W. Adipocyte ATP-binding cassette G1 promotes triglyceride storage, fat mass growth, and human obesity. *Diabetes*. 2015 Mar;64(3):840-55.

7.2.11 Ngaosuwan K, Houngngam N, Limpisook P, **Plengpanich W**, Khovichunkit W. Apolipoprotein A-V is not a major determinant of triglyceride levels during human sepsis. *J Crit Care*. 2015 Aug;30(4):727-31. **ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์**

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางนันทกร ทองแดง
(ภาษาอังกฤษ) Mrs Nuntakorn Thongtang
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1002-03525-76-4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง
4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึม ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ

โทร 02-419-7799 โทรสาร 02-419-7792.

E-mail Nuntakorn@hotmail.com

5 ประวัติการศึกษา

5.1 แพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2542

5.2 ประกาศนียบัตรบัณฑิตทางวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก สาขาเวชศาสตร์ครอบครัว มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี พ.ศ. 2543

5.3 ประกาศนียบัตรบัณฑิตทางวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2546

5.4 วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์ แพทยสภา ปี พ.ศ. 2548

5.5 วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม อนุสาขา อายุรศาสตร์โรคต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิซึมแพทยสภา ปี พ.ศ. 2550

6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Lipidology

7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.1.1 หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง "Atorvastatin Enhances the Fractional Catabolism of C-reactive Protein"

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว(ปี 5 ย้อนหลัง)

7.2.1 Thongtang N, Ai M, Otokozawa S, Himbergen TV, Asztalos BF, Nakajima K, Stein E, Jones PH, Schaefer EJ. Effects of maximal atorvastatin and rosuvastatin treatment on markers of glucose homeostasis and inflammation. Am J Cardiol. 2011;107:387-92.

7.2.2 Rawdaree P, Deerochanawong C, Peerapatdit T, **Thongtang N**, Suwanwalaikorn S, Khemkha A, et al. Efficacy and safety of generic and original pioglitazone in type 2 diabetes mellitus: a multicenter, a double-blinded, randomized-controlled study. *J Med Assoc Thai*. 2010 Nov;93(11):1249-55.

7.2.3 van Himbergen TM, Beiser AS, Ai M, Seshadri S, Otokoza S, Au R, **Thongtang N**, Wolf PA, Schaefer EJ. Biomarkers for Insulin Resistance and Inflammation and the Risk for All-Cause Dementia and Alzheimer Disease: Results From the Framingham Heart Study. *Arch Neurol*. 2012 May;69(5):594-600.

7.2.4 **Thongtang N**, Diffenderfer MR, Ooi E MM, Asztalos BF, Dolnikowski GG, Lamon-fava S, Schaefer EJ. Linkage Between C-reactive Protein and Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism. *Metabolism*. 2013 Mar;62(3):369-75.

7.2.5 Leemingsawat C, **Thongtang N**. Malignant hypertension due to a large reninoma: a case report. *J Med Assoc Thai*. 2012 Feb;95 Suppl 2:S251-5.

7.2.6 **Thongtang N**, Lin J, Schaefer EJ, Lowe RS, Tomassini JE, Shah AK, Tershakovec AM. Effects of ezetimibe added to statin therapy on markers of cholesterol absorption and synthesis and LDL-C lowering in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis*. 2012 Dec;225(2):388-96.

7.2.7 **Thongtang N**, Diffenderfer MR, Ooi EM, Asztalos BF, Dolnikowski GG, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Effects of atorvastatin on human C-reactive protein metabolism. *Atherosclerosis*. 2013 Feb;226(2):466-70.

7.2.8 Sitasuwan T, Hanamornroongruang S, Peerapatdit T, **Thongtang N**. Coexistence of Graves' disease and unilateral functioning Struma ovarii: a case report. *BMC Endocr Disord*. 2015 Nov 4;15(1):68.

7.2.9 Le NA, Diffenderfer MR, **Thongtang N**, Ooi EM, Barrett PH, Horvath KV, Dolnikowski GG, Asztalos BF, Schaefer EJ, Brown WV. Rosuvastatin Enhances the Catabolism of LDL apoB-100 in Subjects with Combined Hyperlipidemia in a Dose Dependent Manner. *Lipids*. 2015 May;50(5):447-58.

7.2.10 Srivanichakorn W, Sriwijitkamol A, Kongchoo A, Sriussadaporn S, Plengvidhya N, Lertwattanakorn R, Vannasaeng S, **Thongtang N**. Withdrawal of sulfonylureas from patients with type 2 diabetes receiving long-term sulfonylurea and insulin combination therapy results in deterioration of glycemic control: a randomized controlled trial. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015 Mar 2;8:137-45.

Multimerization of Glycosylphosphatidylinositol-anchored High Density Lipoprotein-binding Protein 1 (GPIHBP1) and Familial Chylomicronemia from a Serine-to-Cysteine Substitution in GPIHBP1 Ly6 Domain*

Received for publication, February 17, 2014, and in revised form, May 15, 2014. Published, JBC Papers in Press, May 20, 2014; DOI 10.1074/jbc.M114.558528

Wanee Plengpanich[‡], Stephen G. Young^{§¶}, Weerapan Khovidhunkit^{†1}, André Bensadoun^{||}, Hirankorn Karnman[†], Michael Ploug^{**}, Henrik Gårdsvoll^{**}, Calvin S. Leung[§], Oludotun Adeyo[§], Mikael Larsson^{††}, Suwanna Muanpetch[‡], Supannika Charoen[‡], Loren G. Fong[§], Sathit Niramitmahapanya^{§§}, and Anne P. Beigneux^{§2}

From the [‡]Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand, the Departments of [§]Medicine and [¶]Human Genetics, UCLA, Los Angeles, California 90095, the ^{||}Division of Nutritional Science, Cornell University, Ithaca, New York 14853, the ^{**}Finsen Laboratory and Biotech Research and Innovation Center, Rigshospitalet, DK-2200 Copenhagen, Denmark, the ^{††}Department of Medical Biosciences and Physiological Chemistry, Umeå University, SE-901 87 Umeå, Sweden, and the ^{§§}Department of Medicine, Rajavithi Hospital, College of Medicine, Rangsit University, Bangkok 10400, Thailand

Background: GPIHBP1 binds lipoprotein lipase (LPL) and transports it to the capillary lumen.

Results: A *GPIHBP1* missense mutation (S107C) leads to the formation of GPIHBP1 multimers that cannot bind LPL.

Conclusion: An extra cysteine leads to GPIHBP1 multimerization, defective LPL binding, and hypertriglyceridemia.

Significance: This study identifies a novel mechanism by which GPIHBP1 mutations interfere with LPL binding and cause hypertriglyceridemia.

GPIHBP1, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein of microvascular endothelial cells, binds lipoprotein lipase (LPL) within the interstitial spaces and transports it across endothelial cells to the capillary lumen. The ability of GPIHBP1 to bind LPL depends on the Ly6 domain, a three-fingered structure containing 10 cysteines and a conserved pattern of disulfide bond formation. Here, we report a patient with severe hypertriglyceridemia who was homozygous for a *GPIHBP1* point mutation that converted a serine in the GPIHBP1 Ly6 domain (Ser-107) to a cysteine. Two hypertriglyceridemic siblings were homozygous for the same mutation. All three homozygotes had very low levels of LPL in the preheparin plasma. We suspected that the extra cysteine in GPIHBP1-S107C might prevent the trafficking of the protein to the cell surface, but this was not the case. However, nearly all of the GPIHBP1-S107C on the cell surface was in the form of disulfide-linked dimers and multimers, whereas wild-type GPIHBP1 was predominantly monomeric. An insect cell GPIHBP1 expression

system confirmed the propensity of GPIHBP1-S107C to form disulfide-linked dimers and to form multimers. Functional studies showed that only GPIHBP1 monomers bind LPL. In keeping with that finding, there was no binding of LPL to GPIHBP1-S107C in either cell-based or cell-free binding assays. We conclude that an extra cysteine in the GPIHBP1 Ly6 motif results in multimerization of GPIHBP1, defective LPL binding, and severe hypertriglyceridemia.

Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1)³ is an endothelial cell protein that binds lipoprotein lipase (LPL) within the interstitial spaces and transports it to the capillary lumen (1). In the absence of GPIHBP1, LPL remains in the interstitial spaces (1), resulting in defective processing of triglyceride-rich lipoproteins, severe hypertriglyceridemia (chylomicronemia), and impaired delivery of lipid nutrients to parenchymal cells (2, 3).

GPIHBP1 belongs to the lymphocyte antigen 6 (Ly6) family of proteins. This family, which is also referred to as the α U (Ly6/ α PAR) family (4), includes the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and CD59 (an inhibitor of autologous complement activation) (5). GPIHBP1 and most mammalian members of the Ly6 family of proteins are tethered to the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor. The hallmark of Ly6 proteins is a 70–80-amino acid motif containing 8 cysteines, which are arranged in a

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants HL094732, HL090553, and HL087228. This work was also supported by the Asahi Glass Foundation, the Thailand Government Research Budget (Years 2556 and 2557), the Ratchadapiseksompotch Research Fund, Chulalongkorn University grants, and by Leducq Transatlantic Network Grant 12CVD04.

¹ To whom correspondence may be addressed: Hormonal and Metabolic Disorders Research Unit and Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Samakkee Payabarn Bldg., 2nd floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Rama IV Rd., Patumwan, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: 011-662-256-4101; Fax: 011-662-652-5347; E-mail: wkhovid@gmail.com.

² To whom correspondence may be addressed: Department of Medicine, David Geffen School of Medicine, UCLA, 4506 Gonda, 695 Charles E. Young Dr. South, Los Angeles, CA 90095. Tel.: 310-825-9422; E-mail: abeigneux@mednet.ucla.edu.

³ The abbreviations used are: GPIHBP1, glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1; Bis-Tris, bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane; LPL, lipoprotein lipase; Ly6, lymphocyte antigen 6; PIPLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptor.

GPIHBP1 Multimerization and Defective LPL Binding

TABLE 1

PCR primers for amplifying the exons of *GPIHBP1*

<i>GPIHBP1</i> exon	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
1	ACAATGACTTCTCCTTCCCTCT	CTCATCCCCTCCTTCTCCTAAG
2	TGAGTAGGGTGTAGTAGGGTGTTC	TACTCTGGAAGGCAACTGAGTGT
3	CACAGCTTACAGGACCAAGTCA	AGTGGGAACAAGTGTCTGAG
4	TGCAGAGCCACCTCAGAGAC	CCAAGACACTCCAATCCATTCT

characteristic spacing pattern and are oxidized to yield an identical disulfide bonding. The formation of disulfide bonds is one of several structural features that lead these proteins to adopt a three-fingered structure (6). The consensus three-fingered folding topology of mammalian Ly6 proteins is identical to the canonical three-fingered structure in α -neurotoxins of snake venoms (7). Many mammalian Ly6 proteins, including GPIHBP1, have a total of 10 cysteines, leading to the formation of an extra disulfide bond that stabilizes the first loop in the three-fingered structural motif.

The Ly6 domain is crucial for ligand interactions. In the case of uPAR, three Ly6 domains cooperate to form the binding interface for the serine protease urokinase-type plasminogen activator (8) as well as a low affinity binding site for the extracellular matrix protein vitronectin (9); this cooperative arrangement facilitates allosteric control of ligand binding (10). In the case of GPIHBP1, the Ly6 domain is crucial for binding LPL. Six *GPIHBP1* missense mutations, all involving conserved amino acids in the Ly6 domain, have already been linked to chylomicronemia in humans (11–18). In four of these cases, the mutant GPIHBP1 was tested and shown to lack the ability to bind LPL (12, 13, 15, 16). Subsequent studies uncovered *LPL* mutations that abolish the ability of LPL to bind to wild-type GPIHBP1 (19).

In the present study, we screened 92 patients with unexplained chylomicronemia for *GPIHBP1* mutations. We uncovered a novel missense mutation that converted Ser-107 in the GPIHBP1 Ly6 domain to a cysteine. Our studies revealed the mechanism by which this *GPIHBP1* mutation leads to chylomicronemia.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects—Ninety-two patients with severe hypertriglyceridemia, defined as fasting plasma triglyceride levels >10 mmol/liter (>885 mg/dl) on at least two occasions, were identified at King Chulalongkorn Memorial Hospital. After excluding coding-sequence and splice-site mutations in *LPL*, *APOC2*, and *APOA5*, we screened for *GPIHBP1* mutations. A homozygous missense mutation in *GPIHBP1* (c.320C>G; p.S107C) was identified in a 46-year-old woman with chylomicronemia. Unrelated normolipidemic subjects ($n = 111$) were recruited as experimental controls. All subjects provided informed consent, and all studies were performed according to the Declaration of Helsinki for human studies.

Genomic DNA Analyses—Genomic DNA was isolated from whole blood. Each exon of *GPIHBP1* and the exon-intron junctions was amplified from genomic DNA for sequencing. The primers used are shown in Table 1. A c.320C>G; p.S107C mutation was detected in a single patient and confirmed by additional DNA sequencing reactions. The functional significance of the variant was predicted *in silico* with the PolyPhen-2

and SNPs3D programs. Apolipoprotein E genotypes were determined by PCR and DNA sequencing.

Biochemical Measurements—Total plasma cholesterol, triglycerides, and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were measured with enzymatic methods (Roche Diagnostics). LPL mass levels in the preheparin plasma and in the plasma after an intravenous injection of heparin (50 IU/kg) were measured with a sandwich ELISA using monoclonal antibodies 5F9 and 5D2 (20).

GPIHBP1 Constructs—Mammalian expression vectors for untagged soluble mouse GPIHBP1 and S-protein-tagged human GPIHBP1 have been described previously (21–23). An expression vector for GPIHBP1-S107C was generated by site-directed mutagenesis with the QuikChange Lightning kit (Stratagene).

To express soluble versions of GPIHBP1 (*i.e.* GPIHBP1 lacking the GPI anchor), we used a *Drosophila* S2 cell expression system using the carboxyl-terminal Ly6 domain (domain III) of human uPAR as a tag (24, 25). DNA sequences encoding uPAR domain III, followed by sequences encoding human GPIHBP1 amino acids 21–136 and mouse GPIHBP1 amino acids 136–198 (which contain the epitope for monoclonal antibody 11A12) were ligated into pMT/V5-His (Invitrogen) with the In-Fusion HD cloning kit (Clontech). This vector contains a metallothionein promoter that allows metal-inducible expression of the protein. Mutant versions of this GPIHBP1 expression vector were generated with the QuikChange Lightning kit.

Cell Surface Expression Assay—To express GPIHBP1 in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 cells; American Type Culture Collection), we electroporated 5×10^6 cells with expression vectors (5 μ g) encoding S-protein-tagged versions of GPIHBP1. After 24 h, we assessed the ability of GPIHBP1 to reach the cell surface. The GPIHBP1-transfected cells were first incubated with a rabbit polyclonal antibody against the S-protein tag (21). After the cells were washed, the amount of GPIHBP1 on the cell surface was assessed by performing Western blotting of cell extracts with an IRdye800-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:800; Li-Cor). The total amount of GPIHBP1 in cells was assessed by Western blotting with a goat polyclonal antibody against the S-protein tag (followed by an IRdye680-conjugated donkey anti-goat IgG; 1:5,000).

Releasing GPIHBP1 from the Surface of Cells with Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C (PIPLC)—To determine whether GPIHBP1 on the cell surface was monomeric or was in disulfide-linked multimers, we released GPIHBP1 from the surface of cells with PIPLC (16 units/ml for 20 min at 37 °C). GPIHBP1 levels in the PIPLC-released material and in cell extracts were assessed by Western blotting with a goat polyclonal antibody against the S-protein tag (Abcam). In these studies, the PIPLC-released proteins were analyzed by SDS-

GPIHBP1 Multimerization and Defective LPL Binding

PAGE under both nonreducing and reducing conditions (50 mM dithiothreitol).

Cell-based LPL-GPIHBP1 Binding Assay—CHO-K1 cells were electroporated with GPIHBP1 expression vectors (5 μ g). 24 h after the electroporation, the GPIHBP1-expressing cells were incubated for 2 h at 4 °C with V5-tagged human LPL (26) in the absence or presence of heparin (250 units/ml) (21). At the end of the incubation, cells were washed six times with ice-cold PBS containing 1 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂. Relative levels of GPIHBP1 and LPL in cell extracts were assessed by Western blotting with a goat polyclonal antibody against the S-protein tag (Abcam) and a mouse monoclonal against the V5 tag (Invitrogen).

Studies with *Drosophila* S2 Cells—Soluble versions of GPIHBP1 were expressed in *Drosophila* S2 cells (Invitrogen) as fusion proteins (described earlier). The cells were plated on 6-well plates (12 \times 10⁶ cells/well) and transfected with 19 μ g of plasmid DNA with the Calcium Phosphate Transfection kit (Invitrogen). 24 h after the transfection, protein expression was induced with Schneider's medium (Sigma) containing 1% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 0.1% Pluronic F-68 (Sigma), and 500 μ M CuSO₄. For all experiments, the cells were grown in suspension culture for 3 days. To assess the electrophoretic migration of GPIHBP1, the conditioned medium and cell extracts were subjected to electrophoresis under reducing and nonreducing conditions. The GPIHBP1 protein was then detected with IRdye680-conjugated monoclonal antibody 11A12 (which recognizes mouse GPIHBP1 sequences) and IRdye800-conjugated monoclonal antibody R24 (which recognizes uPAR domain III) (27).

Cell-free LPL-GPIHBP1 Binding Assay—Soluble GPIHBP1 from CHO-K1 cells or *Drosophila* S2 cells was incubated for 1 h at 4 °C with V5-tagged human LPL (26) and agarose beads coated with monoclonal antibody 11A12 (23). After washing the beads, soluble GPIHBP1 and GPIHBP1-bound LPL were eluted from the antibody-coated beads with 0.1 M glycine, pH 2.7. The amounts of GPIHBP1 and LPL in the starting material, unbound fractions, wash fractions, and elution fractions were assessed by Western blotting with IRdye680-conjugated antibody 11A12 and an IRdye800-conjugated V5-antibody. To determine whether LPL binds preferentially to GPIHBP1 monomers, the same assay was used except that the agarose beads were coated with the LPL-specific monoclonal antibody 5D2. In those experiments, the LPL and any GPIHBP1-bound LPL captured by the antibody-coated beads were released by boiling in sample loading buffer. The different fractions were then separated by SDS-PAGE under reducing and nonreducing conditions, and Western blotting was performed with LPL- and GPIHBP1-specific antibodies.

Western Blotting—All samples were denatured in 1% lithium dodecyl sulfate for 10 min at 70 °C. Proteins were separated on 12% Bis-Tris SDS-polyacrylamide gels (Invitrogen) under reducing or nonreducing conditions and transferred to nitrocellulose membrane for Western blotting. The antibody dilutions were: 1:1,000 for a goat polyclonal against the S-protein tag (Abcam), 1:200 for a mouse monoclonal against the V5 tag (Invitrogen), 1:500 for a rabbit polyclonal against β -actin (Abcam), 1:1,000 for IRdye680-conjugated rat monoclonal

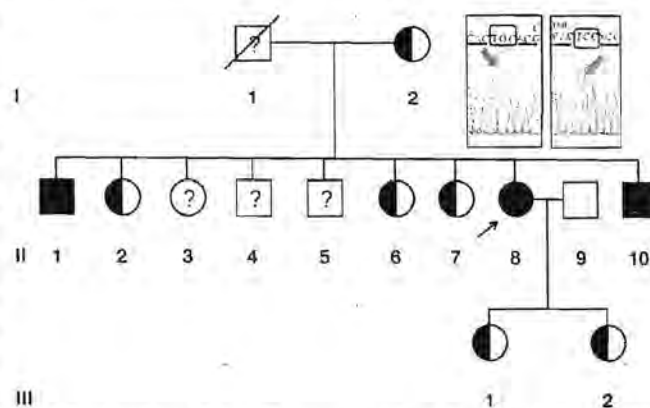


FIGURE 1. Family pedigree. The arrow indicates the proband. The p.S107C mutation is indicated by a half-filled circle or square. The slash mark denotes deceased; the question mark (?) denotes individuals who could not be tested. Insets show DNA sequencing chromatograms for a control subject (right) and the proband (left).

antibody 11A12 (23), 1:1,000 for IRdye800-conjugated mouse monoclonal antibody R24 (24), 1:500 for an IRdye800-conjugated mouse monoclonal against the V5 tag, 1:5,000 for an IRdye680-conjugated donkey anti-goat IgG, 1:5,000 for an IRdye800-conjugated donkey anti-goat IgG, 1:2,000 for an IRdye680-conjugated donkey anti-rabbit IgG, and 1:2,000 for an IRdye800-conjugated donkey anti-mouse IgG (Li-Cor).

RESULTS

Identification of a GPIHBP1 Missense Mutation—Ninety-two patients with severe hypertriglyceridemia but lacking mutations in *LPL*, *APOC2*, or *APOA5* were screened for *GPIHBP1* mutations. A C-to-G transversion in exon 4 of *GPIHBP1* (c.320C>G; p.S107C) was identified in a 46-year-old female with chylomicronemia. Her body mass index was normal. Her fasting plasma triglyceride level was 3,164 mg/dl; the fasting glucose and thyroid-stimulating hormone levels were normal.

The proband was first noted to have chylomicronemia at age 40 after presenting with epigastric discomfort and a plasma triglyceride level of 2,050 mg/dl. Subsequently, her fasting plasma triglyceride levels ranged between 1,247 and 6,448 mg/dl, although one value was as low as 505 mg/dl (when she adhered to a low fat diet and gemfibrozil treatment). The epigastric discomfort recurred episodically, but a diagnosis of pancreatitis was never established. She did not have eruptive xanthomas. She reported two uneventful pregnancies.

The family pedigree is shown in Fig. 1, and the plasma lipid levels for all available family members are recorded in Table 2. Two of the proband's brothers had a history of chylomicronemia but had lower plasma triglyceride levels than the proband. Both were homozygous for the p.S107C mutation (Fig. 1). Six family members were heterozygous for the p.S107C mutation, and all but subject II-2 had normal plasma triglyceride levels (Table 2). No *GPIHBP1* mutations were encountered in 111 normolipemic control subjects.

The preheparin plasma LPL levels in the three homozygotes were much lower than in the other family members (Table 2). The postheparin LPL plasma levels in the proband were extremely low (127 ng/ml), <5% of those in normolipidemic control subjects (3,240 \pm 321 ng/ml, *n* = 9).

GPIHBP1 Multimerization and Defective LPL Binding

TABLE 2

Clinical and molecular characteristics of the proband and her family
TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol.

Subject	Age	Sex	APOE genotype	GPIHBP1 genotype	TG	TC	HDL-C	Pre-heparin LPL mass	Fibrate therapy
	Years				mg/dl	mg/dl	mg/dl	ng/ml	
I-2	86	F	E3/E3	wt/p.S107C	108	206	43	368	No
II-1	64	M	E3/E3	p.S107C/p.S107C	842	158	16	32	Yes
II-2	62	F	E3/E3	wt/p.S107C	338	265	47	615	No
II-6	52	F	E3/E3	wt/p.S107C	152	248	46	535	No
II-7	50	F	E3/E3	wt/p.S107C	127	288	69	283	No
II-8	46	F	E3/E4	p.S107C/p.S107C	3,164	385	32	23	Yes
II-9	49	M	E3/E3	wt/wt	97	234	43	184	No
II-10	43	M	E3/E4	p.S107C/p.S107C	673	107	13	23	No
III-1	24	F	E3/E4	wt/p.S107C	87	188	44	295	No
III-2	19	F	E3/E3	wt/p.S107C	40	148	50	336	No

Testing the Effect of the S107C Mutation on the Trafficking of GPIHBP1 to the Cell Surface—Ser-107 in the GPIHBP1 Ly6 domain is conserved from the egg-laying platypus to humans, and both PolyPhen-2 and SNP3D predicted that the S107C substitution would be deleterious to protein function. Because the S107C mutation introduces a new cysteine and a free thiol group into the GPIHBP1 Ly6 domain, we suspected that the mutant protein might be misfolded and manifest impaired trafficking to the cell surface. To test this idea, we expressed wild-type GPIHBP1 and GPIHBP1-S107C in CHO cells and quantified the amount of GPIHBP1 on the cell surface. As an experimental control, we tested GPIHBP1-N78Q/N82Q, where N-linked glycosylation is absent and trafficking to the cell surface is known to be impaired (21). We also tested GPIHBP1-S107A. The S107C and S107A mutations had little effect on the amount of GPIHBP1 that reached the cell surface (95.9 ± 0.6 and $87.7 \pm 2.1\%$ of wild-type GPIHBP1, respectively) (Fig. 2). As we expected, reduced amounts of GPIHBP1-N78Q/N82Q reached the cell surface ($39.7 \pm 0.1\%$ of wild-type GPIHBP1).

Testing Whether GPIHBP1-S107C Forms Multimers—We speculated that the extra, unpaired cysteine in the Ly6 domain of GPIHBP1-S107C might lead to the formation of disulfide bonds between two GPIHBP1 proteins, resulting in dimer formation. To test this idea, we transfected CHO cells with wild-type GPIHBP1, GPIHBP1-S107C, or GPIHBP1-S107A and then released GPIHBP1 from the surface of the cells with PIPLC. The PIPLC-released proteins were then analyzed by SDS-PAGE and Western blotting under both reducing and nonreducing conditions. In the setting of reducing conditions, Western blots revealed similar amounts of wild-type GPIHBP1, GPIHBP1-S107C, and GPIHBP1-S107A; all proteins migrated at ~ 28 kDa (Fig. 3A, middle panel). However, in nonreduced samples, there were obvious differences. Virtually all of the GPIHBP1-S107C was in the form of dimers and multimers, and 28-kDa monomers were undetectable. With wild-type GPIHBP1, there were substantial amounts of monomers, and with GPIHBP1-S107A, there were intermediate levels of monomers (Fig. 3A, top panel).

To test whether the formation of GPIHBP1-S107C multimers was a unique feature of the CHO expression system, we expressed soluble versions of human GPIHBP1 proteins in *Drosophila* S2 cells, a cell line that is commonly used to express proteins of the Ly6 family (24, 25, 28). The soluble GPIHBP1

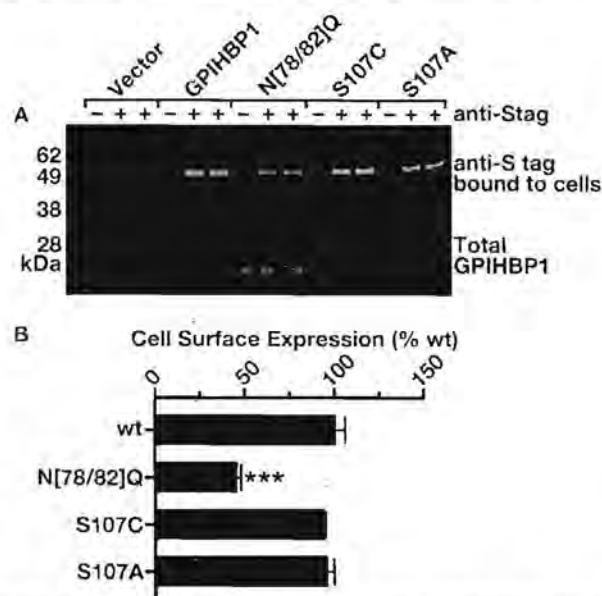


FIGURE 2. Assessing the cell surface expression of GPIHBP1-S107C. A, Western blot to assess the amount of GPIHBP1 on the surface of CHO-K1 cells. Cells were electroporated with S-protein-tagged wild-type or mutant GPIHBP1 constructs. 24 h later, the cells were washed and incubated for 2 h at 4°C with a rabbit polyclonal antibody against the S-protein tag (10 μ g/ml). After washing the cells, Western blotting was performed on cell lysates with an antibody against rabbit IgG (green; to assess the amount of the rabbit anti-S-protein antibody bound to GPIHBP1 on the surface of cells) and a goat polyclonal against the S-protein tag (red; to assess total levels of GPIHBP1 expression in cells). B, bar graph of GPIHBP1 expression on the cell surface (mean \pm S.E. (error bars) of four replicate measurements). The amount of GPIHBP1 on the cell surface was normalized to total GPIHBP1 expression in cells and plotted as a percentage of the ratio observed with wild-type GPIHBP1 (set at 100%). Statistical analysis was by one-way analysis of variance; ***, $p < 0.05$.

contained an amino-terminal uPAR tag (detectable with antibody R24) and a carboxyl-terminal tag from mouse GPIHBP1 (detectable with antibody 11A12). High levels of wild-type GPIHBP1, GPIHBP1-S107C, and GPIHBP1-S107A were secreted from the *Drosophila* cells, as judged by Western blots of media samples run under reducing conditions (Fig. 3B, bottom two panels). When we examined samples that had been run under nonreducing conditions, most of the wild-type GPIHBP1 was monomeric although some was in the form of dimers and multimers (as judged by the antibody 11A12 Western blot) (Fig. 3B, top three panels). In contrast, nearly all of the GPIHBP1-S107C was in the form of dimers and multimers. GPIHBP1-S107A exhibited intermediate amounts of monomers (Fig. 3B,

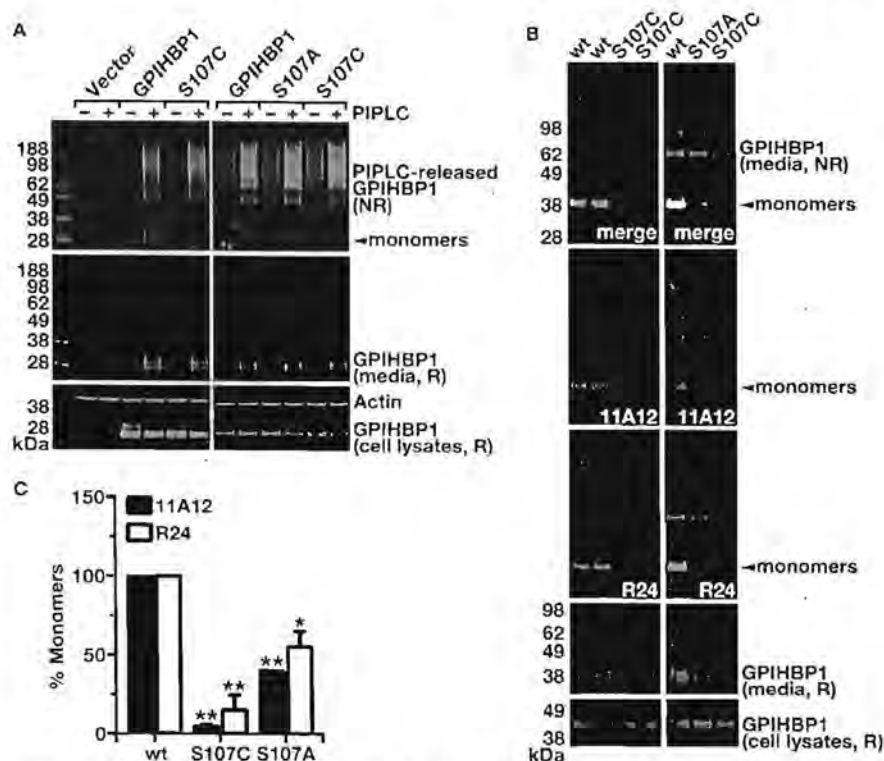


FIGURE 3. Assessing the electrophoretic migration of GPIHBP1-S107C under reducing and nonreducing conditions. A, electrophoretic migration of the GPIHBP1 released by PIPLC from the surface of GPIHBP1-transfected cells. CHO-K1 cells were electroporated with 5-protein-tagged wild-type or mutant GPIHBP1 constructs. 24 h later, the cells were washed and incubated for 20 min at 37 °C with PIPLC (16 units/ml) to release GPI-anchored proteins. Western blotting was performed on cell lysates under reducing conditions (R) and on the PIPLC-released proteins under nonreducing (NR) and reducing conditions. All samples were denatured in 1% lithium dodecyl sulfate for 10 min at 70 °C. Actin (red) was used as a loading control. The location of GPIHBP1 monomers (~28 kDa) is indicated with an arrowhead. B, electrophoretic migration of soluble human GPIHBP1 secreted by *Drosophila* S2 cells. Soluble GPIHBP1 proteins containing an amino-terminal uPAR tag (detectable with antibody R24) and a carboxyl-terminal mouse GPIHBP1 motif (detectable with antibody 11A12) were expressed in *Drosophila* S2 cells. Antibody R24 binds preferentially to properly folded monomers, whereas antibody 11A12 binds to both monomers and multimers. All samples were denatured in 1% lithium dodecyl sulfate for 10 min at 70 °C. Proteins were separated under nonreducing conditions (NR; conditioned media, top three panels) and reducing conditions (R; conditioned media and cell lysates, bottom two panels). GPIHBP1 proteins were detected with IRdye680-conjugated antibody 11A12 (red) and an IRdye800-conjugated antibody R24 (green). The GPIHBP1 monomer (~38 kDa) is indicated with an arrowhead. C, quantification of the ratio of monomeric to total GPIHBP1 expressed as the percentage of the ratio observed with wild-type GPIHBP1 (set at 100%). The intensity of the GPIHBP1 monomers and the entire lane (total GPIHBP1) was quantified with a Li-Cor infrared scanner. Shown are mean ratios \pm S.E. (error bars) of three independent experiments. Statistical analysis was by two-way analysis of variance (mutant versus wild-type); *, $p < 0.001$; **, $p < 0.0001$.

top three panels). The S107C mutation reduced the amount of monomers in the media by 85–95%, and the S107A mutation by 45–60%, as judged by quantitative analysis of the Western blots with a Li-Cor scanner (Fig. 3C). In the case of the antibody R24 Western blot, we detected almost exclusively monomeric protein, simply because antibody R24 has a strong preference for the properly folded uPAR Ly6 domain III. R24 does not bind to uPAR after it has been subjected to reducing agents.

To determine whether multimerization occurs inside the cell or only after reaching the cell surface, we examined the migration pattern under nonreducing conditions of cell lysates prepared from CHO-K1 cells that had been transfected with wild-type GPIHBP1 or GPIHBP1-S107C and then treated with PIPLC. Multimers could be detected in the cell lysates both with wild-type GPIHBP1 and GPIHBP1-S107C (Fig. 4), suggesting that multimerization begins before GPIHBP1 reaches the cell surface. Interestingly, 16% of intracellular GPIHBP1-S107C was monomeric (Fig. 4), whereas monomers represented only 1% of the PIPLC-released material (Fig. 3A), implying that multimerization continues at the cell surface.

Multimers were also detected in cells lysates of *Drosophila* S2 cells that had been transfected with wild-type GPIHBP1 and

GPIHBP1-S107C (Fig. 4). For wild-type GPIHBP1, monomers represented 12% of intracellular GPIHBP1 (Fig. 4) whereas up to 50% of the secreted protein was monomeric (Fig. 3, B and C). This suggests that some misfolded proteins are targeted for degradation in *Drosophila* cells. For GPIHBP1-S107C, monomers only represented 4.4% of the intracellular protein (Fig. 4) and 3.5% of the secreted mutant protein (Fig. 3, B and C), suggesting that large amounts of misfolded proteins could overwhelm the quality control systems of the cell.

Testing the LPL-binding Properties of the Wild-type GPIHBP1 Produced by Insect Cells—Because the uPAR domain III-GPIHBP1 fusion protein contains two sequential Ly6 domains, we first determined whether the soluble wild-type GPIHBP1 secreted by *Drosophila* cells is capable of binding LPL. We mixed the medium from the GPIHBP1-expressing *Drosophila* S2 cells with the medium of CHO cells that expressed a V5-tagged human LPL and agarose beads coated with the LPL-specific monoclonal antibody 5D2 (20). After 1 h, the beads were washed, and the LPL (including any LPL-GPIHBP1 complexes) were eluted from the antibody-coated beads by heating in SDS-PAGE sample buffer. The starting material, unbound fractions, wash samples, and elution samples were then exam-

GPIHBP1 Multimerization and Defective LPL Binding

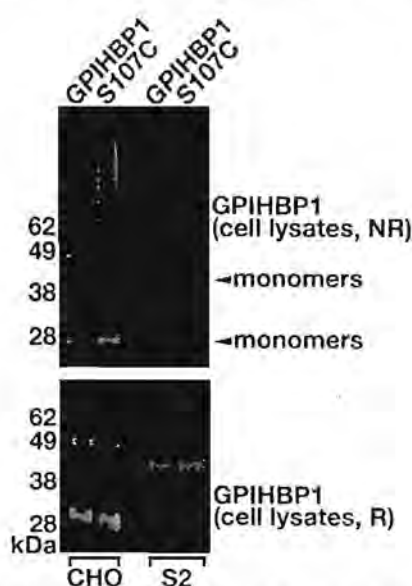


FIGURE 4. Assessing the electrophoretic migration of intracellular GPIHBP1-S107C under reducing and nonreducing conditions. CHO-K1 cells were electroporated with 5-protein-tagged wild-type or GPIHBP1-S107C constructs. 24 h later, the cells were washed and incubated for 20 min at 37 °C with PIPLC (16 units/ml) to release GPI-anchored proteins. Soluble forms of GPIHBP1 proteins containing a carboxyl-terminal mouse GPIHBP1 motif (detectable with antibody 11A12) were expressed in *Drosophila* S2 cells. Western blotting was performed on cell lysates under nonreducing (NR, top panel) and reducing (R, bottom panel) conditions. All samples were denatured in 1% lithium dodecyl sulfate for 10 min at 70 °C. GPIHBP1 proteins were detected with a goat polyclonal antibody against the 5-protein tag (CHO cells; green) or an IRdye680-conjugated antibody 11A12 (S2 cells; red). The location of GPIHBP1 monomers is indicated with an arrowhead (~28 kDa for CHO-K1 cells; ~38 kDa for *Drosophila* S2 cells).

ined by SDS-PAGE under reducing conditions. Western blots revealed both the human GPIHBP1 protein and LPL in the elution material, indicating that the immobilized LPL captured the soluble uPAR-GPIHBP1 fusion protein (Fig. 5A, top panels) as efficiently as the soluble untagged GPIHBP1 produced in CHO-K1 cells (Fig. 5B, top panels).

We hypothesized that only monomeric GPIHBP1 would bind LPL. To explore this idea, we ran the same samples under nonreducing conditions and performed Western blotting with monoclonal antibody 11A12. For the GPIHBP1 produced in *Drosophila* cells, substantial amounts of dimers and multimers were present in the starting material, unbound fractions, and wash fractions. Only 26% of GPIHBP1 was monomeric in the starting material, whereas 91% of the GPIHBP1 that co-eluted with LPL was monomeric (Fig. 5A, bar graph), demonstrating that LPL binds almost exclusively to monomeric GPIHBP1 (Fig. 5A, bottom panels). Similar results were obtained with untagged wild-type mouse GPIHBP1 secreted by CHO-K1 cells (Fig. 5B). Only 11% of GPIHBP1 was monomeric in the starting material, whereas 66% of the GPIHBP1 that co-eluted with LPL was monomeric (Fig. 5B).

Assessing the Ability of GPIHBP1-S107C to Bind LPL—Because multimers appeared to have little capacity to bind LPL and because GPIHBP1-S107C exists almost exclusively in the form of dimers and multimers, we suspected that GPIHBP1-S107C would not bind to LPL. To test this prediction, we used both cell-based and cell-free LPL-GPIHBP1 binding assays. In

the cell-based assay, we incubated GPIHBP1-transfected CHO cells with V5-tagged human LPL in the presence or absence of heparin (which inhibits LPL binding to GPIHBP1) (29). After washing the cells, the binding of LPL to the GPIHBP1-expressing cells was assessed by performing Western blotting on cell extracts. Cells expressing wild-type GPIHBP1 bound LPL avidly, and the amount of binding was reduced by heparin (Fig. 6A). The amount of LPL binding to cells expressing GPIHBP1-S107C and GPIHBP1-C68G was negligible (0.2 and 1% of wild-type control, respectively) (Fig. 6A). The inability of GPIHBP1-C68G to bind to LPL is consistent with an earlier study by Olivecrona *et al.* (16). GPIHBP1-S107A, which displayed an intermediate ability to form monomers (Fig. 3), retained some capacity to bind LPL (14% of wild-type GPIHBP1) (Fig. 6A).

In the cell-free assay, we mixed the soluble GPIHBP1 from *Drosophila* S2 cells with V5-tagged human LPL and antibody 11A12-coated agarose beads. After washing the beads, GPIHBP1 and any GPIHBP1-bound LPL were eluted with 0.1 M glycine, pH 2.7. The amounts of GPIHBP1 and LPL present in the eluate were assessed with Western blotting. With wild-type GPIHBP1, both GPIHBP1 and LPL were present in the eluate, indicating that the immobilized GPIHBP1 binds LPL. With GPIHBP1-S107C and GPIHBP1-C65Y, LPL binding was only 0.3 and 2%, respectively, of that with wild-type GPIHBP1, indicating that these mutant proteins were incapable of binding LPL (Fig. 6B).

DISCUSSION

GPIHBP1 is responsible for picking up LPL within the interstitial spaces and shuttling it across endothelial cells to the capillary lumen (1). Earlier studies showed that missense mutations in the GPIHBP1 Ly6 domain interfere with LPL binding and transport and cause severe hypertriglyceridemia (12, 13, 15, 16, 21, 23). However, how these mutations alter GPIHBP1 structure and impair LPL binding has been unclear. Our lack of understanding of GPIHBP1 missense mutations stands in contrast to the situation with the LDL receptor, where multiple missense mutations have been classified into distinct categories based on molecular mechanisms (*e.g.* defective trafficking of the receptor to the cell surface, defective ligand binding, inability to localize to clathrin-coated pits) (30). In the present study, we identified a new GPIHBP1 missense mutation, S107C, in a family with hypertriglyceridemia and uncovered the mechanism of disease. This mutation, which introduces an extra cysteine into the Ly6 domain, resulted in multimerization of GPIHBP1. The propensity of GPIHBP1-S107C to form dimers and multimers was documented with the GPI-anchored form of the protein in mammalian cells and with a secreted version of the protein in *Drosophila* S2 cells. We went on to show, using cell-based and cell-free binding assays, that the GPIHBP1-S107C lacked the ability to bind LPL. The failure of the GPIHBP1-S107C to bind LPL made perfect sense because we showed, using an immunoprecipitation assay, that only GPIHBP1 monomers are capable of binding LPL. The most parsimonious explanation is that the formation of intermolecular disulfide bonds destabilizes GPIHBP1, results in the misfolding of the Ly6 domain and aggregation, disrupting the GPIHBP1-LPL binding site and/or sterically blocking the access of LPL to its binding site. Addi-

GPIHBP1 Multimerization and Defective LPL Binding

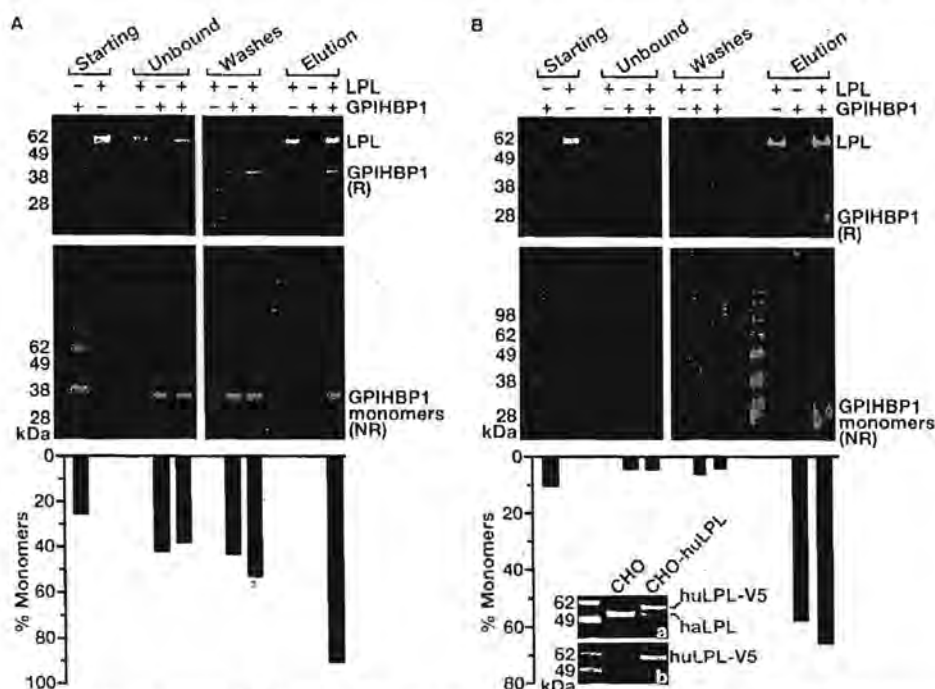


FIGURE 5. Testing whether GPIHBP1 dimers and multimers are capable of binding LPL. The conditioned medium of GPIHBP1-transfected CHO-K1 or S2 cells was incubated with V5-tagged human LPL and antibody 5D2-coated agarose beads for 1 h at 4 °C. After washing the beads, the LPL along with any LPL-bound GPIHBP1 was released from the beads by heating in sample loading buffer. Western blotting under reducing conditions (top panels) or nonreducing conditions (bottom panels) was performed on the starting material, the unbound fractions, the wash fractions, and elution fractions with an IRdye800-conjugated anti-V5 antibody (top panels, green), and an IRdye680-conjugated antibody 11A12 (top and bottom panels, red). **A**, 5D2 bead assay performed with conditioned medium from GPIHBP1-transfected *Drosophila S2* cells. The intensity of the GPIHBP1 monomers and the entire lane (total GPIHBP1) was quantified in each fraction with a Li-Cor infrared scanner. The bar graph represents the ratio of monomeric to total GPIHBP1 in each fraction. **B**, 5D2 bead assay performed with conditioned medium from GPIHBP1-transfected CHO-K1 cells. The bar graph represents the ratio of monomeric to total GPIHBP1 detected in each fraction with a Li-Cor infrared scanner. Of note, monomeric GPIHBP1 eluted from the 5D2-coated beads even in the absence of added V5-tagged human LPL. This is likely due to the production of hamster LPL by CHO-K1 cells (37). **Inset**, Western blot showing the presence of endogenous hamster LPL (haLPL) in the conditioned medium from CHO-K1 cells (CHO) and CHO cells that had been stably transfected with V5-tagged human LPL (CHO-huLPL) (26). The haLPL was detected with a goat anti mouse LPL antibody followed by an IRdye680-conjugated donkey anti-goat IgG (red, panel A). V5-tagged human LPL (huLPL-V5) was detected with antibody 5D2 followed by an IRdye800-conjugated donkey anti-mouse IgG (green, panel A) or with an IRdye800-conjugated anti-V5 antibody (green, panel B). Antibody 5D2 cross-reacted with haLPL (panel A).

tional studies will be needed to determine whether the same mechanism applies to some or all of the previously identified *GPIHBP1* mutations associated with chylomicronemia (11–18).

The S107C substitution had little effect on the trafficking of GPIHBP1 to the surface of CHO cells or on the secretion of soluble forms of GPIHBP1 in *Drosophila S2* cells. This result is consistent with earlier studies showing that the substitution of conserved cysteines in the GPIHBP1 Ly6 domain with alanines had little effect on the trafficking of GPIHBP1 to the cell surface (23). The absence of significant effects of cysteine mutations on GPIHBP1 trafficking in mammalian cells (or on the secretion of soluble GPIHBP1 from insect cells) was somewhat surprising and may represent a property specific to GPIHBP1. In our own studies, we found that a cysteine mutation in SLURP1 (a secreted Ly6 protein) virtually eliminates the secretion of SLURP1 from CHO-K1 cells.⁴ Also, a cysteine mutation in CD59 (a GPI-anchored Ly6 protein) markedly reduces the amount of CD59 on the surface of blood mononuclear cells (31). Moreover, cysteine mutants in the ligand-binding domain of the LDL receptor do not traffic to the cell surface (30). On the other hand, cysteine mutations in the extracellular domain of Notch3 can cause vascular dementia without affecting the traf-

ficking of Notch3 to the cell surface (32). Why GPIHBP1 cysteine mutations have little or no impact on protein trafficking is unclear but it is tempting to speculate that protein dimerization and multimerization might allow GPIHBP1 to escape the surveillance mechanisms that would ordinarily target misfolded proteins for degradation.

It was surprising that some disulfide-linked dimers and multimers also formed with wild-type GPIHBP1. This was the case in both the CHO cell and insect cell expression systems. The *in vivo* relevance of this observation is unclear. It is possible that multimerization of wild-type GPIHBP1 is a peculiarity of CHO cells or *Drosophila S2* cells or that it is a consequence of protein overexpression. However, there is evidence that multimers of Ly6 proteins could occur normally. Fletcher *et al.* (33) released CD59 (a GPI-anchored Ly6 protein) from the surface of blood cells with PIPLC, separated the proteins by SDS-PAGE under nonreducing conditions, and then performed Western blotting with a CD59-specific monoclonal antibody that was capable of binding to improperly folded versions of CD59. In their Western blot, CD59 monomers were the predominant species in the PIPLC-released material, but there were also significant amounts of dimers and higher order multimers (33).

Our study was also informative from the clinical perspective. First, our studies indicate that *GPIHBP1* mutations are uncom-

⁴ A. P. Beigneux, unpublished observations.

GPIHBP1 Multimerization and Defective LPL Binding

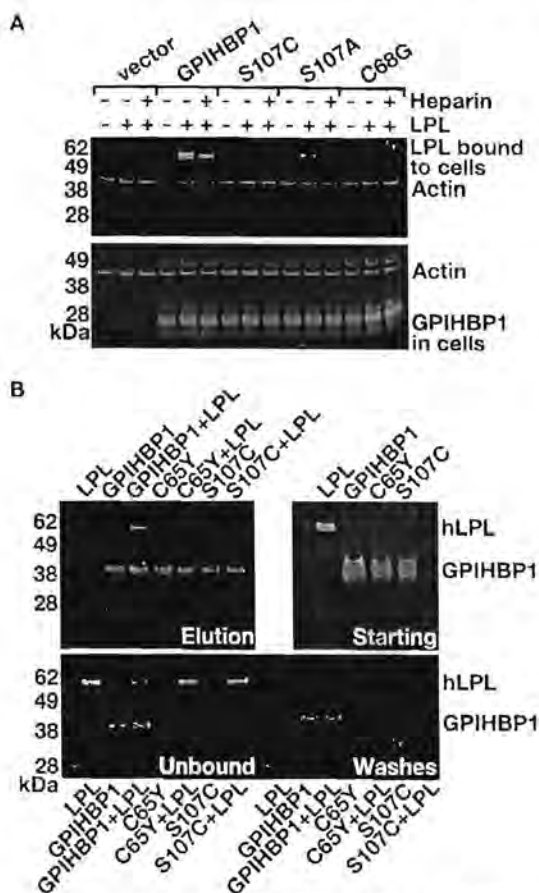


FIGURE 6. Assessing the ability of GPIHBP1-S107C to bind LPL. **A**, testing the binding of LPL to GPIHBP1 on the surface of mammalian cells. CHO-K1 cells were electroporated with empty vector or S-protein-tagged versions of wild-type or mutant GPIHBP1 constructs. 24 h later, the cells were incubated for 2 h at 4°C with V5-tagged human LPL in the absence or presence of heparin (250 units/ml). After washing the cells, LPL binding to cells was assessed by performing Western blotting of cell lysates with an anti-V5 antibody (green). In a separate Western blot, GPIHBP1 expression was assessed with an S-protein-specific antibody (green). Actin (red) was used as a loading control. **B**, a cell-free assay to test the ability of LPL to bind to soluble GPIHBP1. *Drosophila* S2 cells were transfected in triplicate wells with secreted versions of wild-type or mutant GPIHBP1 proteins containing an amino-terminal uPAR tag and carboxyl-terminal mouse GPIHBP1 sequences (detected by antibody 11A12). At the end of the 3-day induction, GPIHBP1-transfected cells were pooled and pelleted, and the conditioned medium was concentrated 6-fold with Amicon Ultra 10 MWCO filters. The conditioned medium from wild-type and mutant GPIHBP1-transfected cells was then incubated with V5-tagged human LPL and 11A12-coated beads for 1 h at 4°C. After washing the beads, GPIHBP1 and any GPIHBP1-bound LPL were released from the beads with 0.1 M glycine, pH 2.7. Western blotting was performed on the starting material, unbound fractions, wash fractions, and elution fractions with an IRdye800-conjugated anti-V5 antibody (green) and an IRdye680-conjugated 11A12 antibody (red).

mon in Thailand, even in a cohort of hypertriglyceridemic patients where mutations in *LPL*, *APOC2*, and *APOA5* had been excluded. The low frequency of *GPIHBP1* mutations in the Thai population is consistent with findings from similar patient populations in North America and Europe (11–15, 34). Second, our study revealed that *GPIHBP1* mutations are associated with very low levels of LPL in the preheparin plasma. There had been suggestions that this might be the case (15, 16), but the data in the current study solidify this finding and also provide a good reason to believe that the levels of LPL in the preheparin plasma reflect levels of LPL along capillary lumen.

Third, the proband had very low levels of LPL mass in the postheparin plasma, suggesting that most of the LPL released into the plasma in humans is from intravascular stores of LPL. In *Gpihbp1* knock-out mice, the postheparin LPL levels increase to levels approaching those in wild-type mice, but the dose of heparin administered to mice (on a mg/kg basis) is much higher than the dose given to human subjects (35).

An intriguing finding in the present studies was that two homozygotes identified through the family investigation had only moderately increased plasma triglyceride levels. In contrast, the proband had severe hypertriglyceridemia. Like the proband in our family, nearly all of the previously described probands with *GPIHBP1* mutations had severe hypertriglyceridemia and associated phenotypes (e.g. pancreatitis, eruptive xanthomas) (11–15). Together, these reports have created the impression that *GPIHBP1* deficiency typically results in severe hypertriglyceridemia along with all of the expected comorbidities. The fact that two of the homozygotes in this study had only moderately elevated plasma triglyceride levels raises the possibility that the view that *GPIHBP1* mutations invariably cause severe hypertriglyceridemia could be the result of ascertainment bias and that broader screening efforts might eventually identify *GPIHBP1* deficiency as a cause of mild to moderate hypertriglyceridemia. Ascertainment bias has been well documented in the case of LDL receptor mutations and familial hypercholesterolemia. The plasma cholesterol levels in familial hypercholesterolemia heterozygotes identified by the presence of ischemic heart disease and tendon xanthomas are higher than those in familial hypercholesterolemia heterozygotes identified through family or population studies (36).

REFERENCES

- Davies, B. S., Beigneux, A. P., Barnes, R. H., 2nd, Tu, Y., Gin, P., Weinstein, M. M., Nobumori, C., Nyrén, R., Goldberg, I., Olivecrona, G., Bensadoun, A., Young, S. G., and Fong, L. G. (2010) GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab.* **12**, 42–52
- Weinstein, M. M., Goulbourne, C. N., Davies, B. S., Tu, Y., Barnes, R. H., 2nd, Watkins, S. M., Davis, R., Reue, K., Tontonoz, P., Beigneux, A. P., Fong, L. G., and Young, S. G. (2012) Reciprocal metabolic perturbations in the adipose tissue and liver of GPIHBP1-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 230–235
- Ginzinger, D. G., Clee, S. M., Dallongeville, J., Lewis, M. E., Henderson, H. E., Bauje, E., Rogers, Q. R., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Dyer, R., Innis, S., Jones, B., Fruchart, J. C., and Hayden, M. R. (1999) Lipid and lipoprotein analysis of cats with lipoprotein lipase deficiency. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 17–26
- Ploug, M., Gårdsvoll, H., Jørgensen, T. J., Lønborg Hansen, L., and Dano, K. (2002) Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti-invasive cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 177–183
- Mallya, M., Campbell, R. D., and Aguado, B. (2006) Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci.* **15**, 2244–2256
- Fry, B. G., Wüster, W., Kini, R. M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., and Rooney, A. P. (2003) Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J. Mol. Evol.* **57**, 110–129
- Galat, A. (2008) The three-fingered protein domain of the human genome. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3481–3493
- Gårdsvoll, H., Gilquini, B., Le Du, M. H., Ménèz, A., Jørgensen, T. J., and Ploug, M. (2006) Characterization of the functional epitope on the urokinase receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 19260–19272
- Gårdsvoll, H., and Ploug, M. (2007) Mapping of the vitronectin-binding site on the urokinase receptor: involvement of a coherent receptor inter-

- face consisting of residues from both domain I and the flanking interdomain linker region. *J. Biol. Chem.* **282**, 13561–13572
10. Mertens, H. D., Kjaergaard, M., Myslind, S., Gårdsvoll, H., Jørgensen, T. J., Svergun, D. I., and Ploug, M. (2012) A flexible multidomain structure drives the function of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). *J. Biol. Chem.* **287**, 34304–34315
 11. Rios, J. J., Shastry, S., Jasso, J., Hauser, N., Garg, A., Bensadoun, A., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2012) Deletion of GPIHBP1 causing severe chylomicronemia. *J. Inher. Metab. Dis.* **35**, 531–540
 12. Beigneux, A. P., Franssen, R., Bensadoun, A., Gin, P., Melford, K., Peter, J., Walzem, R. L., Weinstein, M. M., Davies, B. S., Kuivenhoven, J. A., Kastelein, J. J., Fong, L. G., Dallinga-Thie, G. M., and Young, S. G. (2009) Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 956–962
 13. Charrière, S., Peretti, N., Bernard, S., Di Filippo, M., Sassolas, A., Merlin, M., Delay, M., Debar, C., Lefai, E., Lachaux, A., Moulin, P., and Marçais, C. (2011) GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-Terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1675–E1679
 14. Coca-Prieto, I., Kroupa, O., Gonzalez-Santos, P., Magne, J., Olivecrona, G., Ehrenborg, E., and Valdivielso, P. (2011) Childhood-onset chylomicronaemia with reduced plasma lipoprotein lipase activity and mass: identification of a novel GPIHBP1 mutation. *J. Intern. Med.* **270**, 224–228
 15. Franssen, R., Young, S. G., Peelman, F., Herteant, J., Sierts, J. A., Schimmel, A. W., Bensadoun, A., Kastelein, J. J., Fong, L. G., Dallinga-Thie, G. M., and Beigneux, A. P. (2010) Chylomicronemia with low postheparin lipoprotein lipase levels in the setting of GPIHBP1 defects. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3**, 169–178
 16. Olivecrona, G., Ehrenborg, E., Semb, H., Makoveichuk, E., Lindberg, A., Hayden, M. R., Gin, P., Davies, B. S., Weinstein, M. M., Fong, L. G., Beigneux, A. P., Young, S. G., Olivecrona, T., and Hernell, O. (2010) Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. *J. Lipid Res.* **51**, 1535–1545
 17. Surendran, R. P., Visser, M. E., Heemelaar, S., Warig, J., Peter, J., Defesche, J. C., Kuivenhoven, J. A., Hosseini, M., Péterfy, M., Kastelein, J. J., Johansen, C. T., Hegele, R. A., Stroes, E. S., and Dallinga-Thie, G. M. (2012) Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J. Intern. Med.* **272**, 185–196
 18. Yamamoto, H., Onishi, M., Miyamoto, N., Oki, R., Ueda, H., Ishigami, M., Hiraoka, H., Matsuzawa, Y., and Kihara, S. (2013) Novel combined GPIHBP1 mutations in a patient with hypertriglyceridemia associated with CAD. *J. Atheroscler. Thromb.* **20**, 777–784
 19. Voss, C. V., Davies, B. S., Tat, S., Gin, P., Fong, L. G., Pelletier, C., Mottler, C. D., Bensadoun, A., Beigneux, A. P., and Young, S. G. (2011) Mutations in lipoprotein lipase that block binding to the endothelial cell transporter GPIHBP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 7980–7984
 20. Peterson, J., Fujimoto, W. Y., and Brunzell, J. D. (1992) Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J. Lipid Res.* **33**, 1165–1170
 21. Beigneux, A. P., Davies, B. S., Tat, S., Chen, J., Gin, P., Voss, C. V., Weinstein, M. M., Bensadoun, A., Pullinger, C. R., Fong, L. G., and Young, S. G. (2011) Assessing the role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) three-finger domain in binding lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **286**, 19735–19743
 22. Gin, P., Beigneux, A. P., Davies, B., Young, M. F., Ryan, R. O., Bensadoun, A., Fong, L. G., and Young, S. G. (2007) Normal binding of lipoprotein lipase, chylomicrons, and apo-AV to GPIHBP1 containing a G56R amino acid substitution. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 1464–1468
 23. Beigneux, A. P., Gin, P., Davies, B. S., Weinstein, M. M., Bensadoun, A., Fong, L. G., and Young, S. G. (2009) Highly conserved cysteines within the Ly6 domain of GPIHBP1 are crucial for the binding of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **284**, 30240–30247
 24. Gårdsvoll, H., Hansen, L. V., Jørgensen, T. J., and Ploug, M. (2007) A new tagging system for production of recombinant proteins in *Drosophila* S2 cells using the third domain of the urokinase receptor. *Protein Expr. Purif.* **52**, 384–394
 25. Gårdsvoll, H., Kriegbaum, M. C., Hertz, E. P., Alpizar-Alpizar, W., and Ploug, M. (2013) The urokinase receptor homolog haldisin is a novel differentiation marker of stratum granulosum in squamous epithelia. *J. Histochem. Cytochem.* **61**, 802–813
 26. Ben-Zeev, O., Mao, H. Z., and Doolittle, M. H. (2002) Maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum: concurrent formation of functional dimers and inactive aggregates. *J. Biol. Chem.* **277**, 10727–10738
 27. Gårdsvoll, H., Jacobsen, B., Kriegbaum, M. C., Behrendt, N., Engelholm, L., Østergaard, S., and Ploug, M. (2011) Conformational regulation of urokinase receptor function: impact of receptor occupancy and epitope-mapped monoclonal antibodies on lamellipodia induction. *J. Biol. Chem.* **286**, 33544–33556
 28. Xu, X., Gårdsvoll, H., Yuan, C., Lin, L., Ploug, M., and Huang, M. (2012) Crystal structure of the urokinase receptor in a ligand-free form. *J. Mol. Biol.* **416**, 629–641
 29. Beigneux, A. P., Davies, B. S., Gin, P., Weinstein, M. M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R. L., Wong, J. S., Blamer, W. S., Ding, Z. M., Melford, K., Wongsitiroj, N., Shu, X., de Sauvage, F., Ryan, R. O., Fong, L. G., Bensadoun, A., and Young, S. G. (2007) Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab.* **5**, 279–291
 30. Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 133–170
 31. Nevo, Y., Ben-Zeev, B., Tabib, A., Straussberg, R., Anikster, Y., Shover, Z., Fattal-Valevski, A., Ta-Shma, A., Aharoni, S., Rabie, M., Zenvirt, S., Goldshmidt, H., Fellig, Y., Shaag, A., Mevorach, D., and Elpeleg, O. (2013) CD59 deficiency is associated with chronic hemolysis and childhood relapsing immune-mediated polyneuropathy. *Blood* **121**, 129–135
 32. Haritunians, T., Boulter, J., Hicks, C., Buhrman, J., DiSibio, G., Shawler, C., Weinmaster, G., Notziger, D., and Schanen, C. (2002) CADASIL Notch3 mutant proteins localize to the cell surface and bind ligand. *Circ. Res.* **90**, 506–508
 33. Fletcher, A., Bryant, J. A., Gardner, B., Judson, P. A., Spring, F. A., Parsons, S. F., Mallinson, G., and Anstee, D. J. (1992) New monoclonal antibodies in CD59: use for the analysis of peripheral blood cells from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) patients and for the quantitation of CD59 on normal and decay accelerating factor (DAF)-deficient erythrocytes. *Immunology* **75**, 507–512
 34. Wang, J., and Hegele, R. A. (2007) Homozygous missense mutation (G56R) in glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) in two siblings with fasting chylomicronemia (MIM 144650). *Lipids Health Dis.* **6**, 23
 35. Weinstein, M. M., Yin, L., Beigneux, A. P., Davies, B. S., Gin, P., Estrada, K., Melford, K., Bishop, J. R., Esko, J. D., Dallinga-Thie, G. M., Fong, L. G., Bensadoun, A., and Young, S. G. (2008) Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **283**, 34511–34518
 36. Tybjaerg-Hansen, A., Jensen, H. K., Benn, M., Steffensen, R., Jensen, G., and Nordestgaard, B. G. (2005) Phenotype of heterozygotes for low-density lipoprotein receptor mutations identified in different background populations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 211–215
 37. Gin, P., Beigneux, A. P., Voss, C., Davies, B. S., Beckstead, J. A., Ryan, R. O., Bensadoun, A., Fong, L. G., and Young, S. G. (2011) Binding preferences for GPIHBP1, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein of capillary endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 176–182

Original Article

Rare and common variants in *LPL* and *APOA5* in Thai subjects with severe hypertriglyceridemia: A resequencing approach

Weerapan Khovidhunkit, MD, PhD*, Supannika Charoen, MD, Arunrat Kiateprungvej, MD, Palm Chartyingcharoen, BS, Suwanna Muanpetch, BS, Wanee Plengpanich, PhD

Hormonal and Metabolic Disorders Research Unit, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Drs Khovidhunkit, Charoen, Kiateprungvej, Chartyingcharoen, Muanpetch, and Plengpanich); and Department of Medicine, Excellence Center for Diabetes, Hormone, and Metabolism, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand (Drs Khovidhunkit, Chartyingcharoen, Muanpetch, and Plengpanich)

KEYWORDS:

Triglyceride;
Genetics;
Lipoprotein lipase;
Apolipoprotein A-V;
Hypertriglyceridemia;
Resequencing;
Pancreatitis

BACKGROUND: Severe hypertriglyceridemia usually results from a combination of genetic and environmental factors. Few data exist on the genetics of severe hypertriglyceridemia in Asian populations.

OBJECTIVE: To examine the genetic variants of 3 candidate genes known to influence triglyceride metabolism, *LPL*, *APOC2*, and *APOA5*, which encode lipoprotein lipase, apolipoprotein C-II, and apolipoprotein A-V, respectively, in a large group of Thai subjects with severe hypertriglyceridemia.

METHODS: We identified sequence variants of *LPL*, *APOC2*, and *APOA5* by sequencing exons and exon-intron junctions in 101 subjects with triglyceride levels ≥ 10 mmol/L (886 mg/dL) and compared with those of 111 normotriglyceridemic subjects.

RESULTS: Six different rare variants in *LPL* were found in 13 patients, 2 of which were novel (1 heterozygous missense variant: p.Arg270Gly and 1 frameshift variant: p.Asp308Glyfs*3). Four previously identified heterozygous missense variants in *LPL* were p.Ala98Thr, p.Leu279Val, p.Leu279Arg, and p.Arg432Thr. Collectively, these rare variants were found only in the hypertriglyceridemic group but not in the control group (13% vs 0%, $P < .0001$). One common variant in *APOA5* (p.Gly185Cys, rs2075291) was found at a higher frequency in the hypertriglyceridemic group compared with the control group (25% vs 6%, respectively, $P < .0005$). Altogether, rare variants in *LPL* or *APOA5* and/or the common *APOA5* p.Gly185Cys variant were found in 37% of the hypertriglyceridemic group vs 6% in the controls ($P = 3.1 \times 10^{-8}$). No rare variant in *APOC2* was identified.

CONCLUSIONS: Rare variants in *LPL* and a common variant in *APOA5* were more commonly found in Thai subjects with severe hypertriglyceridemia. A common p.Gly185Cys *APOA5* variant, in particular, was quite prevalent and potentially contributed to hypertriglyceridemia in this group of patients.

© 2015 National Lipid Association. All rights reserved.

* Corresponding author, Hormonal and Metabolic Disorders Research Unit, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bhumisirimangalanasorn Bldg., 4th floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Rama IV Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand.

E-mail address: wkhovid@gmail.com

Submitted October 13, 2015. Accepted for publication November 1, 2015.

Introduction

Hypertriglyceridemia is an independent risk factor for coronary artery disease, and severe hypertriglyceridemia is associated with an increased risk of acute pancreatitis.^{1,2} Circulating triglyceride levels are controlled by both genetic and environmental factors.³ In severe hypertriglyceridemia, genetic factors undoubtedly play an important role, and a number of genes that modulate triglyceride levels have been implicated. Most of these genes affect triglyceride metabolism by impairing triglyceride hydrolysis in the circulation.³ Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme that hydrolyses triglyceride in lipoproteins, and its activity requires 2 other apolipoproteins, apolipoprotein (apo) C-II, a cofactor of LPL, and apo A-V, a modulator of LPL function. Deficiency in LPL, apo C-II, or apo A-V leads to defective LPL-mediated triglyceride hydrolysis.^{4,5} As a result, triglyceride-rich lipoproteins accumulate in the bloodstream, causing severe hypertriglyceridemia. Sequence variants in *LPL*, *APOC2*, and *APOA5*, which encode LPL, apo C-II, and apo A-V, respectively, have been shown to underlie severe hypertriglyceridemia in certain patients.^{5,6}

To determine the genetic contributions of various genes in complex quantitative traits, 2 genetic approaches have commonly been used. The genome-wide association studies (GWAS) are nonhypothesis-driven methods that can detect common variants with modest effect sizes.⁷ The resequencing approach, on the other hand, involves deep sequencing of the region known to be linked to the extreme phenotype and identifies rare variants of larger effect sizes.⁸ These 2 complementary approaches have been successfully applied to study the genetic determinants of lipid and lipoprotein metabolism.⁹ A pioneer work of Cohen et al¹⁰ using a resequencing approach showed that subjects with low high-density lipoprotein-cholesterol had higher frequencies of rare nonsynonymous variants in *ABCA1*, *APOA1*, and *LCAT*. Later resequencing studies in subjects with severe hypertriglyceridemia identified both rare and common variants in GWAS-identified genes (such as *LPL* and *APOA5*) and non-GWAS-identified genes (such as *APOC2* and *LMFI*).¹¹⁻¹⁴ These studies showed a significant excess of rare large-effect variants in candidate genes, which could contribute to the pathophysiology of severe hypertriglyceridemia.

Most of the genetic studies in subjects with extreme hypertriglyceridemia have been performed almost exclusively in subjects of Caucasian ancestry,¹¹⁻¹⁵ and data on the genetic basis of the high-triglyceride phenotype in Asians are quite limited. In this study, we systematically examined the genetic contribution of *LPL*, *APOC2*, and *APOA5* to the development of severe hypertriglyceridemia in Thai subjects using a resequencing approach.

Materials and methods

Subjects

A computerized database of clinical chemistry results of the Department of Clinical Pathology of King Chulalongkorn Memorial Hospital was searched for abnormally high triglyceride levels (≥ 10 mmol/L or 886 mg/dL) to identify subjects with severe hypertriglyceridemia. Ambulatory subjects aged at least 20 years who had triglyceride levels higher than the above cutoff point on at least 2 occasions were invited for recruitment. A complete medical history was obtained, and medical records were reviewed for pertinent information. Ambulatory normotriglyceridemic subjects (triglyceride levels < 1.7 mmol/L or < 150 mg/dL) who had no history of dyslipidemia and were not taking any medications known to affect triglyceride levels were also recruited. Informed consent was obtained individually, and the study protocol was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. The human protocols were carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Experiments

After a 12-hour overnight fast, blood was collected. Sera were separated, and DNA was extracted using standard techniques. Each exon and exon-intron junction of *LPL* (10 exons), *APOC2* (4 exons), and *APOA5* (4 exons) was individually amplified by polymerase chain reaction. Details on the primers used are available in the Supplementary Material. Polymerase chain reaction products were purified using ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom) and directly sequenced (Macrogen, Seoul, South Korea). Identified DNA variants were confirmed in another independent experiment. Screening of identified variants in the control group was performed using either direct sequencing or polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

Bioinformatic analysis

The nomenclature for the identified sequence variants was in accordance with the recommendations of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-prot.html>). Position 1 of the cDNA starts at A of the ATG-translation initiation codon. As a result, there are differences in the variant nomenclature, eg, Leu252Val is now termed p.Leu279Val. All variants were checked in the NCBI dbSNP Build 145 (released July 31, 2015). Common variants were defined as a minor allele frequency $> 1\%$ in controls, whereas rare variants were those with a minor allele frequency $< 1\%$ in controls. The functional

consequences of the identified sequence variants were determined using several bioinformatics programs, including PANTHER (<http://www.pantherdb.org>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), and SNPs3D (<http://www.snps3d.org>). In PANTHER, a substitution position-specific evolutionary conservation score < -3 , which corresponds to the probability of .5 that a variant is deleterious ($P_{\text{deleterious}}$), has been found to be a cutoff for a functional significance. A lower value of $P_{\text{deleterious}}$ indicates more severe impairment.¹⁶ For SIFT, an amino acid substitution is predicted to be damaging if a score is .05 or lower. In the SNPs3D program, a negative support vector machine score indicates that the variant is deleterious.

Statistical analysis

Standard statistical analysis was performed using SPSS software program (version 16, Chicago, IL). Statistical significance between the groups was examined using the unpaired Student's *t*-test or Fisher's exact test. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated according to Bland and Altman.¹⁷ A discounting technique was used to avoid an infinite OR. *P* value $< .05$ was considered statistically significant. Sidak correction was used to calculate the lower significance threshold to account for multiple testing involved.

Results

Subject characteristics

One hundred one subjects with severe hypertriglyceridemia and 111 normotriglyceridemic controls were recruited. Clinical characteristics of the study subjects are summarized in Table 1. The hypertriglyceridemic group had significantly higher levels of total cholesterol and triglyceride and significantly lower level of high-density lipoprotein-cholesterol. The range of the mean triglyceride level in the hypertriglyceridemic group was 892 to

10,840 mg/dL. Thirteen subjects in the hypertriglyceridemic group had history of acute pancreatitis whereas none in the normotriglyceridemic group did. The most common potential contributing factors (so-called secondary causes) were diabetes mellitus (49%), followed by alcohol use (36%, average intake of 30 grams/d of alcohol or approximately 2 standard drinks/d), human immunodeficiency virus infection (22%), chronic kidney disease (10%), protease inhibitor use (8%), oral contraceptive pills (4%), and glucocorticoid use (1%).

Rare sequence variants

Rare sequence variants in the candidate genes are summarized in Table 2. We found six rare variants in the coding region of *LPL* in 13% of subjects. Among the six rare variants, two were novel. The other four previously identified rare variants were all heterozygous missense variants (p.Ala98Thr, p.Leu279Val, p.Leu279Arg, and p.Arg432Thr). All these known variants, except p.Arg432Thr, have been associated with severe hypertriglyceridemia.¹⁸⁻²² One novel rare variant was a heterozygous missense variant, p.Arg270Gly. Using 3 different *in silico* prediction programs, this novel variant and the p.Arg432Thr known variant were consistently predicted to have a damaging effect on the protein (Table 2). The other novel rare variant was a 23-bp duplication in exon 6, c.899_921dup GGCTCTGCTTGAGTTGTAGAAAG, which was predicted to cause a frameshift mutation leading to a premature stop codon 3 amino acids downstream (p.Asp308Glyfs*3). This rare variant was predicted to result in a truncated LPL protein lacking the C-terminus, which is important for interaction with lipoproteins and lipoprotein receptors. Two subjects harbored this rare variant: a homozygous man with hypertriglyceridemia since childhood and a heterozygous woman with pancreatitis during pregnancy. None of these rare variants were found in 111 control subjects with normal triglyceride levels.

Only 1 rare variant in the *APOA5* gene, p.Ser19Trp, was found in 2 subjects. This particular variant is, however, quite common among Caucasian subjects with severe hypertriglyceridemia.¹¹ No rare sequence variants were found in *APOC2*.

Common sequence variants

One common variant in *LPL*, p.Ser477Ter (commonly known as S447X), was found as summarized in Table 3. In our study, this variant was less prevalent in the hypertriglyceridemic group compared with controls.

Three common variants in *APOA5*, c.-3A>G, p.Val153-Met, and p.Gly185Cys, were also identified. Both the c.-3A>G and the p.Gly185Cys variants were significantly more prevalent in subjects with severe hypertriglyceridemia compared with controls (Table 3).

Table 1 Clinical characteristics of the study participants

Variable	HTG (n = 101)	Control (n = 111)	<i>P</i> value
Age (y)	48 ± 11	54 ± 12	<.001
Percent female	37%	40%	.38
History of acute pancreatitis	13%	0%	<.001
Body mass index (kg/m ²)	25.0 ± 4.1	24.0 ± 4.6	.10
Total cholesterol (mg/dL)	320 ± 199	190 ± 41	<.001
Triglyceride (mg/dL)	1944 ± 1532	96 ± 30	<.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	33 ± 13	56 ± 19	<.001

HDL, high-density lipoprotein; HTG, hypertriglyceridemia.
Data are presented as mean ± standard deviation or %.

Table 2 Rare sequence variants in the *LPL* and *APOA5* genes

Location	Variant name		Predicted effect at the protein level			No. of carriers	
	DNA level	Protein level (SNP identifier)	PANTHER (subPSEC score)	SIFT score	SNPs3D (SVM score)	HTG (n = 101)	Control (n = 111)
Gene: <i>LPL</i>							
Exon 3	c.292G>A	p.Ala98Thr (rs14567341)	-4.02135	0.05	-0.73	3	0
Exon 6	c.808C>G	p.Arg270Gly (novel)	-4.98312	0.00	-3.72	1	0
	c.835C>G	p.Leu279Val (rs371282890)	-3.85059	0.00	-0.13	5	0
	c.836T>G	p.Leu279Arg (rs35414700)	-5.49939	0.00	-1.16	1	0
	c.899_921dup GGCTCTG CTTGAGTTGTAGAAAG	p.Asp308Glyfs*3 (novel)	—	—	—	2	0
Exon 8	c.1295G>C	p.Arg432Thr (rs760824086)	-4.19806	0.00	1.16	1	0
Gene: <i>APOA5</i>							
Exon 3	c.56C>G	p.Ser19Trp (rs3135506)	-4.01626	0.00	3.16	2	0

HTG, hypertriglyceridemia; SIFT, sorting intolerant from tolerant; SNP, single nucleotide polymorphism; subPSEC, substitution position-specific evolutionary conservation; SVM, support vector machine.

Differences in the frequency of sequence variants between the 2 groups

Rare variants in *LPL* or *APOA5* genes were strongly associated with severe hypertriglyceridemia. They were present cumulatively in 15% of the hypertriglyceridemic group compared with 0% in controls (carrier OR = 40.0, 95% CI 2.4–677.3, $P = 8.23 \times 10^{-6}$, Table 1). For the common variant, the *APOA5* p.Gly185Cys variant, in particular, was present in approximately one quarter (25 of 101) of subjects with severe hypertriglyceridemia compared with 7 of 111 controls (carrier OR = 4.88, 95% CI 2.0–11.9, $P = 2.0 \times 10^{-4}$). In contrast, the *LPL* p.Ser474Ter was marginally associated with a protection from severe hypertriglyceridemia (5% of hypertriglyceridemic subjects were carriers vs 14% of controls, OR = 0.31, 95% CI 0.11–0.88, $P = .02$).

Combining rare and common variants significantly associated with hypertriglyceridemia, 37% of hypertriglyceridemic subjects were carriers compared with 6% of controls (carrier OR = 8.59, 95% CI 3.6–20.4, $P = 3.08 \times 10^{-8}$).

Sequence variants among subjects with history of acute pancreatitis

Among 13 subjects with history of acute pancreatitis, 4 had a heterozygous p.Gly185Cys common variant in *APOA5* without other rare variants, 3 had only rare variants in *LPL* each (p.Ala98Thr, p.Leu279Val, and p.Asp308Glyfs*3), and the other 6 had no identifiable variants that could contribute to severe hypertriglyceridemia.

Because of a small number of subjects with acute pancreatitis, we found it difficult to associate any particular variant with the occurrence of acute pancreatitis.

Discussion

Subjects with severe hypertriglyceridemia are at increased risk of acute pancreatitis. The genetic component in determining triglyceride concentrations in these subjects, especially of Asian ancestry, remains unexplored. By resequencing 3 candidate genes involved in triglyceride metabolism, *LPL*, *APOC2*, and *APOA5*, we observed a

Table 3 Common sequence variants in the *LPL* and *APOA5* genes

Location	Variant name			Allele frequencies		P value
	DNA level	Protein level (common name)	SNP identifier	HTG (n = 101)	Controls (n = 111)	
Gene: <i>LPL</i>						
Exon 9	c.1421C>G	p.Ser474Ter (S447X)	rs328	0.030	0.072	.0773
Gene: <i>APOA5</i>						
Exon 2	c.-3A>G	Kozac sequence	rs651821	0.550	0.221	2.72×10^{-12}
Exon 4	c.457G>A	p.Val153Met (V153 M)	rs3135507	0.079	0.072	.8486
Exon 4	c.553G>T	p.Gly185Cys (G185 C)	rs2075291	0.144	0.032	3.58×10^{-5}

HTG, hypertriglyceridemia; SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 4 Carrier frequencies of sequence variants in LPL and APOA5

Type of variants	HTG (n = 101)	Controls (n = 111)	P value
Rare variants			
≥1 LPL variants	13 (13%)	0	4.23×10^{-5}
≥1 APOA5 variants	2 (2%)	0	0.2258
≥1 LPL or APOA5 variants	15 (15%)	0	8.23×10^{-6}
Common variants			
≥1 APOA5 p.Gly185Cys	25 (25%)	7 (6%)	0.0002
Rare and common variants			
≥1 rare LPL or APOA5 variants or APOA5 p.Gly185Cys	37 (37%)	7 (6%)	3.08×10^{-8}

HTG, hypertriglyceridemia.

strong association of several genetic variants with severe hypertriglyceridemia. Rare variants were most abundant in LPL, accounting for 13% of subjects. These rare LPL variants and the other rare APOA5 variant, p.Ser19Trp, were found only in subjects with severe hypertriglyceridemia and not in the control group. In addition, 1 common APOA5 variant, p.Gly185Cys, was significantly more prevalent in the hypertriglyceridemic group. Together, 37% of hypertriglyceridemic subjects had ≥1 rare LPL or APOA5 variants or a common APOA5 p.Gly185Cys variant.

Several studies have used the resequencing approach to determine the genetic contribution of candidate genes in a variety of extreme lipid phenotypes. Among various genes involved in severe hypertriglyceridemia, the highest frequency of rare variants was found in LPL, which ranged from 6% of subjects in Canada¹² to 34% in Netherlands.¹² A larger study in subjects of European ancestry also confirmed that LPL harbored the highest number of rare variants per kilobase of coding sequence.¹³ In a study of 107 multiethnic subjects in Germany with severe hypertriglyceridemia (triglyceride > 10 mmol/L), 13 (12%) subjects were carriers of rare variants in LPL.²⁵ Our results showing that rare variants in LPL were more common than those in APOA5 and APOC2 are therefore similar to those reported in Caucasians.

In the present study, 6 rare variants in LPL were identified, 2 of which were novel. Except for p.Arg432Thr, all the other 3 previously identified rare variants in LPL (p.Ala98Thr, p.Leu279Val, and p.Leu279Arg) have been associated with hypertriglyceridemia.¹⁸⁻²² *In vitro* expression experiments have confirmed that these known rare variants were pathogenic. For example, the p.Ala98Thr variant was associated with a marked reduction in LPL activity and secretion.^{18,21} Both the p.Leu279Arg (previously reported as Leu252Arg) and the p.Leu279Val (also known as Leu252Val) variants were associated with undetectable

LPL catalytic activity *in vitro*.¹⁸⁻²⁰ So far, these 3 known variants have been detected only in Asian subjects.

The known rare variant in exon 8, p.Arg432Thr, has been reported in the NCBI database but has not previously been associated with hypertriglyceridemia. Several prediction programs have suggested that this variant is deleterious to the function of LPL as the arginine-432 residue is strictly conserved across a number of animal species from chimpanzee to zebrafish (data not shown). A nearby missense variant leading to a substitution of a highly conserved glutamic acid-437 with valine has also been described in a patient with chylomicronemia.²¹ Although it is known that most rare variants causing LPL deficiency are clustered in exons 5 and 6,²⁵ which correspond to the N-terminus of the protein, *in vitro* experiments have further shown that the described variant in exon 8, which corresponds to the C-terminal domain of LPL, can affect the formation of an active dimer, resulting in the loss of enzymatic activity.²⁴

Two novel rare variants were identified in this study. The first variant was the p.Arg270Gly missense variant due to a base change from cytosine to guanine at codon 808. The arginine-270 residue is highly conserved across different species and another missense variant, p.Arg270Cys, due to a base change from cytosine to thymine at the same codon 808, has been found in patients of European ancestry with familial chylomicronemia.²⁶ The other novel variant was a 23-bp duplication in exon 6, resulting in a truncated protein. Lack of the C-terminus could affect dimer formation of LPL and its interaction with lipoproteins and lipoprotein receptors. However, definite proof that these novel rare variants are pathogenic requires further functional experiments.

Certain variants in APOA5 were also strongly associated with severe hypertriglyceridemia in our study. Only 1 rare variant, p.Ser19Trp, was found in 2 subjects with severe hypertriglyceridemia and none in the control group. This finding is in contrast to what has been reported in Caucasians where the p.Ser19Trp variant is a common variant in Caucasian populations, especially in those with hypertriglyceridemia.^{11,12,27} One common variant, p.Gly185Cys, is strongly associated with severe hypertriglyceridemia in our study. This particular variant, accounting for approximately one-fourth of subjects, is quite prevalent and has been found almost exclusively in the Asian populations.²⁸⁻²⁹ Functional studies have shown that the p.Gly185Cys variant is functionally defective with a reduction in LPL activation.³⁰ In our study, no variants in APOC2 were found, which is consistent with previous studies that APOC2 variants are exceedingly rare.¹²

It is now becoming apparent that genetic variations differ among different races and ethnic backgrounds. Our results in Thai subjects, representing Asians, illustrate certain similarities and differences compared to those from previous studies in Caucasians. Similar to reports in Caucasian subjects with severe hypertriglyceridemia, we found that in Thai, rare variants in LPL were more common

than those in *APOA5* or *APOC2*. In addition, variants in *APOC2* appeared to be extremely rare. Nevertheless, we observed a number of differences as well. First, although certain *LPL* variants, such as p.Asp36Asn and p.Asn318Ser, were quite common in Caucasian subjects with hypertriglyceridemia,^{11,12,15} they were not found in our study of Thai subjects. Secondly, different common *APOA5* variants were ethnic-specific. While the p.Ser19Trp variant was frequently found in Caucasians, the p.Gly185Cys variant was more common in Asians. Apart from sequence variants in *LPL*, *APOC2*, and *APOA5*, very rare variants were also found in *LMFI* and *GPIIIBP1* in some Caucasian subjects.^{12,14} Whether variants in *LMFI* and *GPIIIBP1* are comparably rare in Asians remains unknown³¹ and is currently under investigation in our laboratory.

In conclusion, rare variants in *LPL* and *APOA5*, but not *APOC2*, were significantly more common in the hypertriglyceridemic group. One common *APOA5* variant, p.Gly185Cys, was quite prevalent. Together, approximately one-third (37%) of hypertriglyceridemic subjects had ≥ 1 copy of rare variants in *LPL* or *APOA5* or ≥ 1 copy of the common *APOA5* p.Gly185Cys variant. The p.Gly185Cys *APOA5* variant might represent a risk marker for development of severe hypertriglyceridemia in Asian subjects. Our results add to the growing body of evidence that both rare and common variants in various candidate genes play an important role in the pathophysiology of hypertriglyceridemia. The genetic basis of the other two-thirds of these patients is, however, still unknown and remains a subject of further investigations.

Acknowledgments

The authors thank the Asahi Glass Foundation, the Ratchadapiseksompotch Fund, and the Thailand National Budget Grant for the support.

Authors' contributions: W.K., S.C., and A.K. contributed to conception and design and analysis and interpretation of data. S.C., A.K., P.C., S.M., and W.P. contributed to acquisition of data. W.K. drafted the article. W.P. contributed to critical revision. W.K., S.C., A.K., P.C., S.M., and W.P. contributed to final approval.

Financial disclosure

The authors have no conflicts of interest.

References

- Jacobson TA, Ito MK, Maki KC, et al. National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1—executive summary. *J Clin Lipidol*. 2011;8: 73–188.
- Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123:2292–2333.
- Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009;10:109–121.
- Santamarina-Fojo S. The familial chylomicronemia syndrome. *Lipidol Metab Clin North Am*. 1998;27:551–567 viii.
- Priore Oliva C, Carabbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the *APOA5* gene. *J Intern Med*. 2008;263:450–458.
- Rahalkar AR, Giffen F, Har B, et al. Novel *LPL* mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87:151–160.
- Talmud PJ, Yiannakouris N, Humphries SE. Lipoprotein association studies: taking stock and moving forward. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22:106–112.
- Topol EJ, Frazer KA. The resequencing imperative. *Nat Genet*. 2007; 39:439–440.
- Khor CC, Goh DL. Strategies for identifying the genetic basis of dyslipidemia: genome-wide association studies vs. the resequencing of extremes. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:123–127.
- Collen JC, Kiss RS, Persemliadis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*. 2004;305:869–872.
- Wang J, Cao H, Ban MR, et al. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2450–2455.
- Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIIIBP1* and *LMFI* in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272:185–196.
- Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nat Genet*. 2010;42:687–687.
- Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:66–72.
- Wright WT, Young JS, Nicholls DP, Graham CA. Genetic screening of the *LPL* gene in hypertriglyceridaemic patients. *Atherosclerosis*. 2008; 199:187–192.
- Brunham LR, Singuraja RR, Pape TD, Kejaritwal A, Thomas PD, Hayden MR. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the *ABCA1* gene. *PLoS Genet*. 2005;1:e83.
- Bland JM, Altman DG. Statistics notes. The odds ratio. *BMJ*. 2000; 320:1468.
- Chan LY, Lam CW, Mak YT, et al. Genotype-phenotype studies of six novel *LPL* mutations in Chinese patients with hypertriglyceridemia. *Hum Mutat*. 2002;20:232–233.
- Chan L, Mak Y, Tomlinson B, et al. Compound heterozygosity of Leu252Val and Leu252Arg causing lipoprotein lipase deficiency in a Chinese patient with hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:35–40.
- Ma Y, Ooi TC, Liu MS, et al. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possible association with apolipoprotein E2 isoform. *J Lipid Res*. 1994;35:1066–1075.
- Yang T, Pang CP, Tsang MW, et al. Pathogenic mutations of the lipoprotein lipase gene in Chinese patients with hypertriglyceridemic type 2 diabetes. *Hum Mutat*. 2003;21:453.
- Xie SJ, Chen TZ, Huang XL, et al. Genetic variants associated with gestational hypertriglyceridemia and pancreatitis. *PLoS One*. 2015; 10:e0129488.
- Evans D, Arzer J, Aberle J, Beil FU. Rare variants in the lipoprotein lipase (*LPL*) gene are common in hypertriglyceridemia but rare in Type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2011;214:386–390.
- Previano L, Guardamagna O, Dugi KA, et al. A novel missense mutation in the C-terminal domain of lipoprotein lipase (Glu410→Val) leads to enzyme inactivation and familial chylomicronemia. *J Lipid Res*. 1994;35:1552–1560.
- Gilbert B, Rouss M, Griglio S, de Larnay L, Laplaud P. Lipoprotein lipase (*LPL*) deficiency: a new patient homozygote for the

- preponderant mutation Gly188Glu in the human LPL gene and review of reported mutations: 75 % are clustered in exons 5 and 6. *Ann Genet.* 2001;44:25-32.
26. Ma Y, Liu MS, Chitayat D, et al. Recurrent missense mutations at the first and second base of codon Arg243 in human lipoprotein lipase in patients of different ancestries. *Hum Mutat.* 1994;3:52-58.
27. Evans D, Aberle J, Bell FU. Resequencing the apolipoprotein A5 (APOA5) gene in patients with various forms of hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 2011;219:715-720.
28. Kao JT, Wen HC, Chien KL, Hsu HC, Lin SW. A novel generic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2533-2539.
29. Pullinger CR, Acuzerat BE, Movsesyan I, et al. An apolipoprotein A-V gene SNP is associated with marked hypertriglyceridemia among Asian-American patients. *J Lipid Res.* 2008;49:1846-1854.
30. Dorfmeister B, Zeng WW, Diehlberger A, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1866-1871.
31. Plengpetch W, Young SG, Khovidhunkit W, et al. Multimerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) and familial chylomicronemia from a serine-to-cysteine substitution in GPIHBP1 Ly6 domain. *J Biol Chem.* 2014;289:19491-19499.

Appendix

Sequence primer information

APOC2 gene.

ApoC2_E2F; 5' ACC AGA GTG GGG CGT GAC CA 3'

ApoC2_E3R; 5' GCA GTC GGT GGT ATG GGC CAG 3'

ApoC2_E4F; 5' GCC GCC CAG AAC CTG TAC GA 3'

ApoC2_E4R; 5' ACT GGG AAG GGG GAG CTC AGT 3'

LPL gene.

LPL_E1F; 5' GGC GAC TTG CTC AGC GCC AA 3'

LPL_E1R; 5' GAG TCC CTG GGC GCA TCC AC 3'

LPL_E2F; 5' AGC ATC AGC GGT GGT TGC CT 3'

LPL_E2R; 5' TGT GGG GTG CGG ACC CAT CA 3'

LPL_E3F; 5' ACT CAA CTC AAT GCC TTC CTG
GCT 3'

LPL_E3R; 5' ACA GCC GGT TTT CTG GCT CCA 3'

LPL_E4F; 5' GGC AGA ACT GTA AGC ACC TT 3'

LPL_E4R; 5' GAA TGA CAG TCT TTT CAC CTC 3'

LPL_E5F; 5' AGC CAT CCT GAG TGG AAA CTG CT 3'

LPL_E5R; 5' GGC TGT CTG CCT GGC TCT AAG G 3'

LPL_E6F; 5' TGA AGG TGG GTG GGC CGC TA 3'

LPL_E6R; 5' TAC AGG GGA GGG CAG CGA GC 3'

LPL_E7F; 5' TCC AAG CCA CAC CAG TGG TTC C 3'

LPL_E7R; 5' GTG CCA TGA TGA CCG CCC CC 3'

LPL_E8F; 5' GGG GGC AGG GAG AGC TGA TCT 3'

LPL_E8R; 5' AGG CCC CTG AAA TAC AGC CCC T 3'

LPL_E9F; 5' TGC TCT AGG CTG TCT GCA TGC C 3'

LPL_E9R; 5' CCT GGG TTG AAG GTC CGG GC 3'

APOA5 gene.

APOA5_E2F; 5' GAG CCC CAA CAG CTC TGT GC 3'

APOA5_E2R; 5' GGC CCT CTG GCC AGC CTC CA 3'

APOA5_E3F; 5' GGG AGG AGA GCC CAG GCC CT 3'

APOA5_E3R; 5' GAG GTT GAG GCA GCA GAG GC 3'

APOA5_E4.1F; 5' CGG CCT GGA TAT CTG TCC CC 3'

APOA5_E4.1R; 5' CCC AGT GCC TGC AAA GGC
TC 3'

APOA5_E4.2 F; 5' GGT GCT CTC CCG GAA GCT
CA 3'

APOA5_E4.2 R; 5' GCC TCT CCC TCC CTA CTC CC 3'