



Akademie věd České republiky

Teze disertace  
k získání vědeckého titulu "doktor věd"  
ve skupině  
**Molekulárně biologické a lékařské vědy**

## **Gen pro apolipoprotein A5 a kardiovaskulární onemocnění**

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru  
**Genetika a genomika**

**ing. Jaroslav Hubáček, CSc**

**Institut klinické a experimentální medicíny**

Praha, 2010

## Obsah

1. Summary	3
2. Souhrn	4
3. Úvod	5
4. Popis a funkce genu pro apolipoprotein A5	7
5. DNA varianty v lidském <i>APOA5</i> genu	8
6. Asociace mezi <i>APOA5</i> a hladinami lipidů v populačních vzorcích	10
7. Asociace mezi variantami <i>APOA5</i> a extrémními hladinami triglyceridů v plazmě	13
8. Asociace mezi <i>APOA5</i> variantami a infarktem myokardu	15
9. Varianty genu pro <i>APOA5</i> a vnější intervence –	16
i/ nutrigenetika	
ii/ aktigenetika	
iii/ farmakogenetika	
10. Konfirmační analýzy vztahů mezi <i>APOA5</i> variantami a různými biochemickými či antropometrickými parametry	18
11. Struktura, sekvence a exprese ApoA5 genu u Pražského hereditárně hypertriglyceridemického potkana	20
12. Závěry	21
13. Publikace autora použité pro disertaci	23
14. Další citovaná literatura	26
15. Vybrané publikace autora nesouvisející přímo s tématem disertační práce.	29
16. Poděkování	32

## 1. Summary

Submitted thesis summarizes the results from the long research focused on the apolipoprotein A5 gene (*APOA5*).

Collected results show, that this gene is one of the key regulators of plasma triglyceride levels and their variants affect not just plasma TG levels but also risk of myocardial infarction development.

In functional studies we have proved, that human recombinant *APOA5* binds to plasma lipoproteins and affect their interactions with cell receptors. Further these interactions are partially dependent on gene mutations/variants. However, in the inbred model of hypertriglyceridemic rat, *APOA5* plays no role in TG determination.

The major focus of the *APOA5* research was concentrated on fields with potential impact on predictive genetic and personalized medicine.

Firstly, the gene was sequenced in ~500 individuals of different ethnic groups and almost twenty variants were detected. Selected polymorphisms and mutations were than analyzed in details on groups of patients (most importantly patients with extreme levels of plasma triglycerides, patients with myocardial infarction, patients treated with statins) and controls (large groups of volunteers selected either on population based background, or according the defined primary criteria and intervention). The importance of some common variants in determination of plasma triglycerides and myocardial infarction was proved. In contrast, detected rare mutations exhibit content dependent effect (but, we did not have a possibility to analyze them in homozygous state) on plasma lipids. Most importantly, we have detected significant gene-gene and gene-environment interactions.

Common variants within the *APOA5* gene could be in the future used in personalized medicine, especially like a factor in primary prevention of cardiovascular diseases and a factor influencing the interventional (acti-and nutri-genetic) and treatment (pharmacogenetic) strategies.

## 2. Souhrn

Předkládané teze souhrnným způsobem představují výsledky několikaletého výzkumu úlohy genu pro apolipoprotein A5 (*APOA5*) v determinaci kardiovaskulárních onemocnění.

Výsledky ukazují, že tento gen je jedním z klíčových regulátorů hladin plazmatických triglyceridů a že jeho varianty ovlivňují i riziko vzniku infarktu myokardu.

Funkční analýzy prokázaly, že lidský rekombinantní *APOA5* se váže na plazmatické lipoproteiny a ovlivňuje jejich interakce s buněčnými receptory. Tyto interakce do určité míry závisí na genetických mutacích/variantách.

Oproti tomu, u inbredního modelu hypertriglyceridemických potkanů *APOA5* funguje normálně a nehraje roli v determinaci hladin TG.

Hlavní směr výzkumu genu pro *APOA5* byl soustředěn na potenciální využití analýz variant genu v prediktivní genetice a personalizované medicíně.

Gen byl sekvenován u téměř pěti set jedinců různých etnik a detekovali jsme téměř dvacet jeho variant. Vybrané polymorfismy a mutace byly analyzovány na různých skupinách pacientů (především u pacientů s extrémními hladinami TG, pacientů s infarktem myokardu a u pacientů léčených statiny) a kontrol (skupiny reprezentativně vybraných dobrovolníků – populační vzorky; a skupiny úzce vybrané na základě předem daných kritérií). Prokázal se významný vliv některých běžných variant v determinaci plazmatických triglyceridů a infarktu myokardu. Vzácné mutace genu neměly na hladiny sledovaných parametrů jednoznačný vliv - nicméně, nepodařilo se nám nalézt nositele mutací v homozygotním stavu. A nakonec, podařilo se detekovat významné gen – gen a gen – prostředí interakce.

Běžné varianty genu pro *APOA5* jsou do budoucna kandidátem pro využití v personalizované medicíně, především v primární prevenci kardiovaskulárních onemocnění a jako bod v algoritmech rozhodujících o typu intervenčních strategií (akti-, nutri- a farmako- genetika).

### 3. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou v průmyslových zemích nejčastější příčinou úmrtí a jedním z nezávislých rizikových faktorů rozvoje KVO jsou i vysoké hladiny triglyceridů (TG) v krevní plazmě (Austin *et al.* 1987, Forester 2001). Je známo, že hladiny triglyceridů v plazmě jsou výsledkem působení faktorů vnějších (mezi ně patří především dietní zvyklosti, konzumace alkoholu, kouření a tělesná hmotnost) a vnitřních - genetických. Podobně jako u ostatních rizikových faktorů KVO je známo, že genetické a environmentální faktory se podílí na výsledné hladině plazmatických TG přibližně stejně.

Genetické predispozice k vysokým hladinám plazmatických TG byly během posledních dvaceti let intenzivně analyzovány. Až dosud byly analyzovány stovky polymorfizmů v různých genech, které by mohly mít vliv na hladiny plazmatických TG (například - Gehrisch 1999, Cohen *et al.* 1999, Talmud and Humphries 2001, Hubacek *et al.* 2003a, Hubacek *et al.* 2007a, Vrablik *et al.* 2008, Vrablik and Hubacek 2010).

Nejslibnější výsledky se jsou spojeny s variantami apolipoproteinů (APO) v genovém klastru *APOA1/APOC3/APOA4*. Zejména *APOC3* Sstl (rs5128, záměna C → G) polymorfismus (Talmud and Humphries 2001) byl popisován jako významný genetický determinant plazmatických hladin TG. Popsané výsledky však nejsou zcela konzistentní (viz. např. Buzza *et al.* 2001, Hubáček *et al.* 2001, Russo *et al.* 2001), a tento polymorfismus je navíc umístěn v nepřekládaném 3' konci *APOC3* genu; takže mechanismus jeho působení není jasný. Jednou z diskutovaných možností bylo, že tato varianta je v částečné vazebné nerovnováze s jinou funkční variantou ve stejné oblasti, která je ve skutečnosti za determinaci plazmatických TG odpovědná.

To vedlo k intenzivní analýze DNA sekvence genového klastru *APOA1/APOC3/APOA4*. Neznámé sekvence myší a lidské DNA tohoto lokusu (jednalo se zhruba 20% z cca. 200 000 bp) byly sekvenovány a zkompletovány. Porovnání lidské sekvence se specifickou myší sekvencí vedlo k identifikaci mezidruhově vysoce

konzervované DNA sekvence obsahující putativní gen (překládaná sekvence byla nalezena i v databázi mRNA sekvencí, bez informací o potenciální funkci proteinu) pro protein s výraznou afinitou k lipidům – a tak byl v genovém klastru *APOA1/APOC3/APOA4* identifikován další gen - gen pro apolipoprotein A5 (*APOA5*) (Pennacchio *et al.* 2001).

Vytvoření apoA5 transgenních a knock-out myši potvrdilo význam tohoto genu pro determinaci plazmatických TG v animálním modelu. Transgenní myši vykazovaly snížené hladiny plazmatických TG a knock-out myši naopak zvýšené hladiny TG, ale hladiny cholesterolu v plazmě nebyly u těchto zvířat významně ovlivněny (Pennacchio *et al.* 2001).

#### 4. Popis a funkce genu pro apolipoprotein A5

Celá sekvence lidského genu pro *APOA5* byla kompletně a podrobně přečtena. Lidský gen pro *APOA5* se skládá celkem ze 4 exonů a kóduje 369 aminokyselinový protein, který je téměř výhradně exprimován v játrech (Pennacchio *et al.* 2001).

ApoA5 je vázán především na částice bohaté na TG (chylomikrony a lipoproteiny o velmi nízké hustotě - VLDL) a na lipoproteinových částicích o vysoké hustotě (HDL). Plazmatická koncentrace apoA5 je (v porovnání s jinými apolipoproteiny) u lidí nízká – pohybuje se okolo 100 µg/l (O'Brien *et al.* 2005). Dále bylo popsáno, že se apoA5 váže na lipoproteinovou lipázu (LPL) a zvyšuje její aktivitu (Fruchart-Najib *et al.* 2004, Schaap *et al.* 2004). U myši exprese lidského apoA5 vede ke snížení hladin TG v částicích VLDL. Exprese lidského apoA5 vedla u myši k omezení produkce VLDL-TG, avšak koncentrace vlastních VLDL částic byla stejná jako u kontrolních myši (Fruchart-Najib *et al.* 2004, Schaap *et al.* 2004). Dalším krokem k upřesnění znalostí o funkci apoA5 bylo studium pacientů s mutacemi v genu pro *APOA5* (Priore-Oliva *et al.* 2005), které způsobují předčasný vznik stop-kodonů (Gln145 → Stop a Gln139 → Stop). Mutace Gln145 → Stop byla přítomna v homozygotní formě a bylo zjištěno, že plazma tohoto pacienta aktivuje LPL *in vitro* se signifikantně menší účinností než plazma kontrolních subjektů. V heterozygotní formě se tyto mutace projevovali spíše recesivně. Souhrnně - tyto výsledky potvrzují, že apoA5 hraje roli v aktivaci LPL. Dorfmeister *et al.* (2008), zcela nedávno prokázali i/ že rekombinantní APOA5 interagují s proteiny skupiny LDL receptorů a ii/ ukázali, že mutované APOA5 se liší ve svých interakcích k těmto receptorům. Výsledky naznačily, že koncentrace APOA5 v plazmě nemusí nutně být spolehlivým ukazatelem jeho funkce a nebude mít podstatný význam. Je tedy jisté, že apolipoprotein A5 neplní v lipoproteinech funkci strukturální, ale spíše funkci jakéhosi bio-katalyzátoru.

## 5. DNA varianty v lidském *APOA5* genu

Ve spolupráci s ostatními skupinami jsme podrobně sekvenovali gen pro apoA5 u téměř 500 osob několika etnik (bělošského, černošského a hispánského původu, zahrnuto byli muži i ženy, jednalo se pouze o dospělé jedince). V genu jsme detekovali téměř 20 různých variant (Pennacchio *et al.* 2002, shrnuto Hubáček 2004a a Hubáček 2005a, Tabulka č. 1), z nichž řada byla zjištěna a detailně analyzována také u české populace.

Ve studiích s různým designem jsme sledovali, zda zjištěné *APOA5* varianty (polymorfismy i mutace; varianty měnící aminokyselinové složení proteinu a varianty umístěné v genovém promotoru) mají vliv na:

- 1) hladiny lipidů v plazmě (triglyceridů, zbytkových/remnantních částic, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu, non-HDL cholesterolu) u různých skupin osob obou pohlaví
- 2) vývoj extrémní hypertriglyceridémie
- 3) vývoj infarktu myokardu
- 4) interakce s vnějšími změnami – úprava životního stylu (dieta, fyzická intervence) a farmakologické intervence u různých skupin obyvatelstva - nutrigenetika, aktigenetika a farmakogenetika
- 5) provedli jsme i potvrzující analýzy vztahů mezi *APOA5* variantami a různými biochemickými či antropometrickými parametry, které byly popsány jinými skupinami.

Kromě uvedených humánních studií jsme analyzovali strukturu, sekvenci a expresi genu pro apoA5 u Pražského hereditárně - hypertriglyceridemického potkana.



**Tabulka č. 1 Seznam variant v genu pro lidský apolipoprotein A5 sledovaných v české populaci.**

N	<i>APOA5</i> varianta	Populační frekvence variantní alely	Asociace s hladinami TG
1	T-1131>C	~ 8.5 %	+++
2	A-3C	~ 8.5 %	+++
3	Ser19>Trp (C56>G)	~ 7.2 %	+++
4	Val153>Met (G457>A)	~ 3.8 %	-
5	Gly185>Cys (G553>C)	Nedetekováno	
6	Ala315>Val (C944>T)	< 1 %	?
7	His321>Leu (A962>T)	< 1 %	?

## 6. Asociace mezi *APOA5* a hladinami lipidů v populačních vzorcích

Do první studie bylo zahrnuto 501 osob (zdraví jedinci, euro-amerického původu, nekuřáci a bez hypolipidemické medikace) a byla zjištěna asociace mezi polymorfizmem T-1131 → C (rs662799), jakož i variantou Ser19 → Trp (C56 → G, rs3135506) a hladinami plazmatických TG bez ohledu na to, zda jedinci konzumovali potravu s vysokým či s nízkým obsahem tuků (Pennacchio *et al.* 2001). Podobné, i když ne tak výrazné a do určité míry sex-dependentní asociace jsme detekovali i v černošské (afro-američané) a hispánské populaci (Pennacchio *et al.* 2002). Ve všech případech měli jedinci s alespoň jednou méně běžnou alelou (C-1131 a Trp19) vyšší hladiny TG než ostatní.

Tento primární nález jsme potvrdili na reprezentativně vybrané etnicky homogenní skupině Čechů (1191 mužů a 1368 žen o průměrném stáří  $48,0 \pm 10,7$  let), u kterých jsme během dvou různých vyšetření dvakrát nezávisle analyzovali hladiny plazmatických TG (v letech 1997/8 a 2000/1; Hubáček *et al.* 2003b, Hubáček *et al.* 2004b, Triglyceride Coronary Disease Genetic Consortium... 2010).

Varianta T-1131 → C ovlivňuje triglyceridy v plazmě ve smyslu vyšší hladiny u nositelů C-1131 než u homozygotů T/T-1131. Tato asociace byla pozorována během obou let (uveden je pouze rok 2000/1) u mužů ( $2,40 \pm 1,63$  mmol/l oproti  $2,06 \pm 1,66$  mmol/l) ( $p < 0.001$ ) i u žen ( $1,57 \pm 0,85$  mmol/l oproti  $1,43 \pm 0,85$  mmol/l) ( $p < 0.001$ ). Stejná varianta působí na non-HDL cholesterol v plazmě - vyšší koncentrace jsme našli u nositelů alely C-1131 než u T-1131T homozygotů. Tato asociace byla pozorována u mužů ( $4,61 \pm 1,09$  mmol/l oproti  $4,47 \pm 1,07$  mmol/l,  $p < 0.01$ ) stejně jako u žen ( $4,46 \pm 1,22$  mmol/l oproti  $4,24 \pm 1,17$  mmol/l,  $p < 0.01$ ). Je zajímavé, že při analýze LDL cholesterolu (vypočítaného podle Friedewaldova vzorce, Friedewald *et al.* 1972) a HDL cholesterolu nebyly zjištěny žádné významné asociace (Hubáček *et al.* 2008a). Lze to vysvětlit skutečností, že sice relativně malá, ale přesto významná část

cholesterolu se nachází na VLDL částicích.

Plazmatické triglyceridy jsou ovlivněny v české populaci i *APOA5* Ser19 → Trp polymorfizmem. Nositelé alely Trp19, a to jak muži ( $2,40 \pm 1,97$  mmol/l oproti  $2,07 \pm 1,60$  mmol/l) tak i ženy ( $1,65 \pm 1,02$  mmol/l oproti  $1,43 \pm 0,82$  mmol/l), mají statisticky významně vyšší koncentraci triglyceridů ( $p < 0,001$  v obou případech, opět uvedeny výsledky pouze z vyšetření z let 2000/2001) než homozygoti Ser19Ser. Všechny tyto výsledky se shodují s asociacemi zjištěnými u jiných bělošských populací, kde všechny studie zjistily významné vztahy mezi koncentracemi TG a *APOA5* polymorfismy, i když je třeba zmínit, že síla těchto asociací v jednotlivých studiích se liší (revidováno Hubáček 2005a, Tai and Ordovas 2008).

Je zajímavé, že třetí běžná varianta *APOA5* (Val153 → Met, G457 → A, rs3135507), která byla podrobněji sledována jen u České populace, nemá u žádný vliv na plazmatické TG. Nicméně u žen (nikoliv však u mužů) jsme zjistili (Hubáček *et al.* 2005b) asociaci mezi touto variantou a koncentrací HDL cholesterolu v plazmě s tím, že vyšší hladiny HDL cholesterolu byly nalezeny u Val/Val homozygotů ( $1,52 \pm 0,37$  mmol/l v porovnání s nositeli Met  $1,39 \pm 0,35$  mmol/l,  $p < 0,01$ ).

Remnantní lipoproteiny (RLP) jsou produkty katabolizovaných částic bohatých na TG. Zvýšené hladiny RLP souvisejí s aterosklerózou a jsou prediktorem koronárních příhod u pacientů s onemocněním koronárních tepen (McNamara *et al.* 2001).

Hodnotili jsme vliv variant *APOA5* (T-1131 → C, Ser19 → Trp a Val153 → Met) na hladiny RLP-cholesterolu a RLP-TG ve vzorku 285 nepříbuzných jedinců (131 mužů a 154 žen) ve stáří 33 až 72 let. Hladiny RLP-cholesterolu a RLP-TG nebyly významně ovlivněny variantami *APOA5*, a to ani u celé populace, ani u mužů a žen, pokud byly provedeny separátní analýzy. Dospěli jsme k závěru, že varianty T-1131 → C, Ser19 → Trp a Val153 → Met v genu *APOA5* nemají vliv na hladiny remnantních částic v plazmě (Hubáček *et al.* 2004c).

U menší skupiny pacientů s diagnózou diabetes mellitus typu 1

a 2 (202 mužů a 167 žen) jsme analyzovali asociaci mezi variantami T-1131 → C, Ser19 → Trp a Val153 → Met *APOA5* a hladinami lipidů v plazmě. Na rozdíl od zdravé populace byla u těchto pacientů, a to u mužů i u žen, varianta T-1131 → C spojena nejen s hladinami triglyceridů v plazmě, ale i s hladinami LDL-cholesterolu v plazmě (LDL-cholesterol u těchto jedinců nebyl vypočítán, ale byl v plazmě přímo změřen). U homozygotů T-1131T byly významně vyšší hladiny LDL cholesterolu ( $3,31 \pm 0,07$  mmol/l oproti  $2,98 \pm 0,14$  mmol/l u žen a  $3,21 \pm 0,06$  mmol/l oproti  $2,95 \pm 0,16$  mmol/l u mužů,  $p < 0,05$  v obou případech) a významně nižší hladiny TG ( $1,78 \pm 0,10$  mmol/l oproti  $2,31 \pm 0,14$  mmol/l u žen a  $2,04 \pm 0,26$  mmol/l oproti  $3,03 \pm 0,73$  mmol/l u žen, s  $p < 0,05$  u obou analýz) než u nositelů alely C-1131 (Hubáček *et al.* 2005c) a nebyl rozdíl mezi diabetem typu 1 a 2.

## 7. Asociace mezi variantami *APOA5* a extrémními hladinami triglyceridů v plazmě

Jelikož jsou běžné varianty genu *APOA5* asociovány s hladinami TG v plasmě, analyzovali jsme je také u jedinců s extrémně vysokými hladinami ( $>10$  mmol/l; průměr  $20,4 \pm 12,8$  mmol/l;  $n = 83$ ). U těchto pacientů jsme sekvenovali celý *APOA5* gen, abychom detekovali nové varianty *APOA5*, potenciálně odpovědné za extrémní hladiny TG.

Frekvence nositelů méně četných alel C-1131 a Trp19 byla více než dvakrát vyšší ( $p < 0.0001$  pro obě varianty) u pacientů s hypertriglyceridémií (32,5 % a 30,1 %) než u kontrolní populace (15,4 % a 14,1 %) (Hořínek *et al.* 2003, Vrablík *et al.* 2003). Ve stejné skupině pacientů nebyla zjištěna žádná asociace mezi variantou Val153  $\rightarrow$  Met a extrémními hladinami plazmatických TG (frekvence nositelů Met153 činila 6,5 % u kontrolní populace a 9,6 % u pacientů). Z toho vyplývá, že polymorfismus Val153  $\rightarrow$  Met v genu *APOA5* nepředstavuje významný rizikový faktor pro vývoj extrémních hladin TG (Hubáček *et al.* 2004d).

Další sekvenování těchto jedinců odhalilo přítomnost dvou vzácných mutací *APOA5*.

Zprvé byli mezi pacienty s hypertriglyceridémií detekováni tři nositelé varianty Ala315  $\rightarrow$  Val (C944  $\rightarrow$  T). Nicméně v reprezentativním vzorku 3 302 zdravých jedinců bylo zjištěno dalších 22 nositelů této alely, z nichž 19 mělo normální hladiny triglyceridů, zatímco zvýšené hladiny triglyceridů měli jen tři jedinci. Proto jsme dospěli k závěru, že tato varianta sama o sobě nehraje důležitou roli v genetické determinaci hypertriglyceridémie (Hubáček *et al.* 2008b).

Dále byl detekován jeden pacient s mutací His321  $\rightarrow$  Leu (A962  $\rightarrow$ T), a i když tato varianta nebyla nalezena u 282 kontrolních jedinců (Dorfmeister *et al.* 2008) a dal se tedy předpokládat kauzální vztah k hyperTG, podrobná analýza však neukázala na klíčovou důležitost této změny pro metabolismus TG.

Nezávisle na tom byla detekována varianta *APOA5* Cys185  $\rightarrow$  Gly u čínského obyvatelstva (Kao *et al.* 2003). Nositele alely Gly185

jsme nenašli mezi 83 jedinci s vysokými hladinami TG, ani mezi 420 zdravými jedinci. Tato varianta pravděpodobně není přítomna v bělošské populaci nebo je její frekvence příliš nízká, aby měla detekovatelný vliv na hladiny plazmatických TG (Hubáček *et al.* 2004d).

## 8. Asociace mezi *APOA5* variantami a infarktem myokardu

Rovněž jsme analyzovali frekvence genotypů tří obvyklých polymorfismů *APOA5* u pacientů (mužů) mladších 65 let, kteří přežili svůj první infarkt myokardu (MI), v porovnání s kontrolní zdravou populací.

Ve skupině pacientů s MI je frekvence vzácných homozygotů minimálně pro jednu variantu *APOA5* (C/C-1131 a/nebo Trp/Trp19) významně vyšší (7,4 % oproti 2,0 %,  $p < 0.00001$ ) než v populačním vzorku ( $n = 1\ 191$ ) (Hubáček *et al.* 2003, Hubáček *et al.* 2004b).

Naopak frekvence nositelů Met153 se v těchto dvou skupinách významně nelišila (6,5 % oproti 6,4 %) (Hubáček *et al.* 2005b).

## 9. Varianty genu pro *APOA5* a intervence – nutrigenetika, aktigenetika a farmakogenetika

Možné interakce mezi variantami *APOA5* a environmentálními/ vnějšími/negenetickými faktory byly analyzovány ve čtyřech studiích různého zaměření.

Nejprve jsme hodnotili vliv běžných variant genu *APOA5* na hladiny lipidů v plasmě u 117 mužů, u nichž během osmileté studie došlo k výrazné změně diety (Poledne and Škodová, 2000) a ke snížení celkového cholesterolu (z  $6,2 \pm 1,3$  mmol/l v roce 1988 na  $5,4 \pm 1,1$  mmol/l v roce 1996). Varianty *APOA5* T-1131 → C a Val153 → Met během uvedené doby neměly vliv na uvedené změny hodnot. Naopak polymorfismus Ser19 → Trp v tomto osmiletém časovém úseku ovlivnil pokles celkového cholesterolu v plasmě. U homozygotů Ser19Ser byl cholesterol v plasmě relativně stabilní ( $6,1 \pm 1,2$  mmol/l v roce 1988 a  $5,6 \pm 1,0$  mmol/l v roce 1996, -8 %). Pokles cholesterolu v plasmě byl u nositelů Trp19 více než 25% ( $6,5 \pm 1,6$  mmol/l v roce 1988 a  $5,1 \pm 1,0$  mmol/l v roce 1996) ( $p < 0.005$ ). Změny ostatních lipidových parametrů (HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceridy) nebyly asociovány s jinými variantami *APOA5* (Hubáček *et al.* 2006, Hubáček *et al.* 2007b).

Dále bylo sledováno 98 nepříbuzných Češek/mediabetiček s nadváhou či obezitou (BMI více než  $27,5$  kg/m<sup>2</sup>), které procházely devítitýdenním programem změny životního stylu, zahrnujícím omezení příjmu energie a aerobní cvičení. Nebyly zjištěny žádné asociace mezi poklesem BMI a variantami *APOA5*, ale nositelky T-1131T genotypu měly významně vyšší tělesnou hmotnost před i po této intervenci ( $p < 0.05$ ,  $p = n. s.$  pro BMI). Navíc se snížily hladiny plazmatických TG u homozygotů Ser19Ser, avšak zvýšily se u nositelek Trp19 ( $1,42 \pm 0,62$  mmol/l oproti  $1,28 \pm 0,48$  mmol/l v porovnání s  $1,15 \pm 0,47$  mmol/l oproti  $1,41 \pm 0,80$  mmol/l,  $p < 0,05$ ). Podobně nedošlo ke snížení hladin LDL-cholesterolu u nositelek alespoň jedné méně obvyklé alely *APOA5* ( $n = 26$ ), jak tomu bylo u nositelek T-1131T/Ser19Ser ( $3,11 \pm 0,70$  mmol/l oproti  $3,27 \pm 0,81$  mmol/l v porovnání s  $3,39 \pm 0,81$  mmol/l oproti  $3,16 \pm 0,86$  mmol/l,  $p < 0.05$ ) (Suchánek *et al.* 2008).



U 188 dospělých jedinců jsme zkoumali eventuální asociaci mezi *APOA5* polymorfizmy (T-1131 → C, Ser19 → Trp a Val153 → Met) a účinností tříměsíční aplikace nízkých (téměř ekvipotentních) dávek statinů (v dávkách 10 - 20 mg, simvastain, atorvastatin, lovastatin). Nositelé genotypu *APOA5* TT-1131 měli větší prospěch z léčby statiny ve srovnání s nositeli alely C-1131 ( $\Delta$  LDL-C  $-36,3 \pm 15,1$  % oproti  $\Delta$  LDL-C  $-29,9 \pm 12,5$  %;  $p < 0.005$ ) (Hubáček *et al.* 2009a). Účinnost hypolipidemické léčby statiny nebyla ovlivněna variantami Ser19 → Trp a Val153 → Met.

Konečně, jedince (3071 mužů a 3567 žen) ze studie HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Easter Europe) jsme rozdělili dle přítomnosti méně četných alel *APOA5* do tří skupin (přítomno 0, 1, a alespoň 2 alely) a dle energetického příjmu (podle 143 položkového dotazníku) rozdělili do tří skupin s nízkým (spodních 25%), středním (25-76 percentil) a vysokým (horních 25%) celkovým energetickým příjmem. Zjistili jsme významnou interakci mezi celkovým energetickým příjmem a *APOA5* haplotypy. Nárůst hladin TG u jedinců s 2 a více rizikovými alelami se lišil (v porovnání s nejběžnějším haplotypem,  $P = 0.034$  po adjustaci na BMI a pohlaví) dle energetického příjmu od  $0.57 \pm 0.27$  mmol/L (nízký energetický příjem), přes  $0.86 \pm 0.15$  mmol/L (střední energetický příjem) k  $1.28 \pm 0.25$  mmol/L (vysoký energetický příjem) (Hubacek a Bobak, připravováno k publikaci).

## 10. Konfirmační analýzy vztahů mezi *APOA5* variantami a různými biochemickými či antropometrickými parametry

Asociaci mezi alelou C-1131 a výškou matky, jakož i větší porodní délkou plodu naznačil Ward *et al.* (2003). Tuto asociaci vysvětluje hypotéza, podle níž může zvýšení hladin plazmatických TG vést k lepší nitroděložní výživě plodu.

U 1 305 žen ve stáří 28 až 67 let a minimálně s jedním dítětem jsme analyzovali putativní asociaci mezi variantou *APOA5* T-1131 → C a tělesnou výškou matky. Tělesná výška matek se u homozygotů T/T ( $n = 1\,093$ ;  $162,5 \pm 6,5$  cm) a nositelek alely C ( $n = 212$ ;  $162,1 \pm 6,4$  cm) nelišila. Nepodařilo se tak potvrdit, že matky s alelou *APOA5* C-1131 jsou vyšší než homozygoti T/T-1131 (Hubáček *et al.* 2004e).

Asociace mezi variantou T-1131 → C *APOA5* s koncentrací C-reaktivního proteinu u mladých neobézních Korejců popsal Jang *et al.* (2004). U nositelů alespoň jedné alely C-1131 byly v porovnání s T-1131T homozygoty zaznamenány vyšší hladiny C-reaktivního proteinu v plazmě. U 1 119 mužů evropského původu (ve stáří  $49,2 \pm 10,8$  let) jsme analyzovali putativní asociaci mezi obvyklými variantami *APOA5* a koncentracemi C-reaktivního proteinu (po logaritmické transformaci). Hladiny C-reaktivních proteinů u homozygotů T/T-1131 ( $n = 946$ ;  $0,33 \pm 0,24$  mg/l) a nositelů alely C ( $n = 173$ ;  $0,33 \pm 0,23$  mg/l) se nelišili. Tedy, na rozdíl od Korejců, neměla ve velké skupině bělošských mužů varianta T-1131 → C *APOA5* žádný vliv na koncentrace C-reaktivního proteinu v plazmě a ani další varianty *APOA5* (Ser19 → Trp a Val153 → Met) neměly vliv na koncentrace C-reaktivního proteinu v plazmě (Hubáček *et al.* 2005d).

Ve dvou studiích byla analyzována interakce mezi běžným polymorfismem (E2, E3 a E4) genu *APOE*, variantou *APOA5* Ser19 → Trp a výskytem hypertriglyceridémie.

Schaefer *et al.* (2004) našli sedm *APOE2/E2* mezi 170 jedinci se zvýšenými hladinami TG (nad 2,3 mmol/l). Šest z nich také bylo nositeli *APOA5* alely Trp19. U zdravých normolipidemických jedinců se jim nepodařilo tuto kombinaci detekovat.

Naopak my jsme neprokázali žádnou významnou interakci mezi *APOE2/E2* a přítomností alely Trp19 v genu *APOA5* u hypertriglyceridemických jedinců (Hubáček *et al.* 2005e). Nicméně ze 111 pacientů s extrémními hladinami TG (>10 mmol/l) mělo více než 50 % jedinců s alelou Trp19 také alelu *APOE4*, zatímco podíl těchto jedinců v běžné populaci činil pouze 13 % ( $p < 0.001$ ).

U reprezentativního vzorku 2 500 osob (1 168 mužů a 1 332 žen) jsme dále zjišťovali interakce mezi variantami genů *APOA5* a *APOE* v závislosti na pohlaví (Hubáček *et al.* 2008c). U žen (nikoliv však u mužů) jsme upozorovali asociaci mezi polymorfismem *APOE* a celkovým cholesterolem (TC) v přítomnosti běžného haplotypu *APOA5* (TT-1131/SerSer19) – nositelé *APOE2* mají nejnižší ( $5,12 \pm 1,15$  mmol/l) a nositelé *APOE4* nejvyšší ( $6,05 \pm 1,06$  mmol/l) hladiny TC v plasmě ( $p < 0,001$ ). Pokud je přítomna alespoň jedna alela *APOA5* C-1131 nebo Trp19, *APOE* nevykazuje významný vliv na TC v plasmě. *APOA5* nemá vliv na hladiny TG v plasmě, pokud je přítomna alela *APOE4*. V přítomnosti *APOE2* nebo *APOE3* jsou u nositelů alel *APOA5* C-1131 nebo Trp19 vyšší hladiny TG ( $1,64 \pm 1,05$  mmol/l) než u ostatních ( $1,37 \pm 0,75$  mmol/l) ( $p < 0.01$ ). U mužů nebyly podobné interakce pozorovány.

## 11. Struktura, sekvence a exprese ApoA5 genu u Pražského hereditárního hypertriglyceridemického potkana

Pražský hereditární hypertriglyceridemický (HTG) potkan je užitečným modelem lidské hypertriglyceridémie a dalších symptomů metabolického syndromu (Vrána and Kazdová, 1990). Proto jsme na této linii studovali gen pro *apoA5* a jeho expresi za normálních podmínek i po dlouhodobé zátěži fruktózou.

Sekvenovali jsme celý gen *apoA5* těchto potkanů a potkani kmenů Lewis a Whistar nám posloužili jako normotriglyceridemické kontroly. Mezi potkany uvedených kmenů neexistovaly rozdíly v genové struktuře ani v genové sekvenci (polymorfizmy a mutace). Analogicky se mezi těmito zvířaty neprojevily významné rozdíly v expresi *apoA5*, poté co jim byla podávána fruktóza (která stimuluje rozvoj hypertriglyceridémie) (Kadlecová *et al.* 2006). U tohoto modelu tudíž *apoA5* nehraje důležitou roli při určování plazmatických triglyceridů.

## 12. Závěry

Gen pro apolipoprotein A5 a vliv jeho variant na různé biochemické a antropometrické parametry byly v odlišných podmínkách podrobně analyzovány u různých jedinců českého původu (Hubáček *et al.* 2009b). Důkladná analýza potvrdila, že některé z jeho variant měly významný vliv na koncentraci triglyceridů v plazmě a mohou také ovlivnit riziko vzniku infarktu myokardu.

- 1) Alely C-1131 a Trp19 jsou u mužů i u žen spojeny se zvýšenými hladinami TG v plazmě. Podobně jako u zdravých osob, jsou hladiny TG (a LDL-cholesterol) v plazmě ovlivněny variantou APOA5 T-1131 → C také u pacientů s diabetem mellitus. Nositelé alely Met153 mají nižší hladinu HDL cholesterolu v plasmě, ale tato asociace je závislá na pohlaví a platí pouze u žen. Koncentrace remnantních částic u osob evropského původu s variantami APOA5 nesouvisí.
- 2) U hypertriglyceridemických pacientů jsou frekvence alel C-1131 a Trp19 významně vyšší než u kontrolní populace. Nebyla zjištěna asociace extrémně vysokých hladin TG s variantou Val153 → Met. U pacientů a kontrol (společně ~ 500 osob) jsme nenalezli v čínské populaci detekovanou alelu Cys185 – je tedy pravděpodobné, že je přítomnost této alely je rasově specifická. Zbývá podrobně vyjasnit přesnou roli identifikovaných mutací (Ala315 → Val a His321 → Leu) a vzniku hypertriglyceridémie.
- 3) U nositelů minimálně jednoho genotypu C-1131C nebo Trp19Trp je vyšší riziko vzniku infarktu myokardu.
- 4) Muži nositelé alespoň jedné alely Trp19 lépe reagují na změny ve stravování než homozygoti Ser19Ser. Rovněž kombinovaná dietní a cvičební intervence může být prospěšnější pro některé podskupiny definované variantami APOA5. APOA5 haplotyp ovlivňuje plazmatické TG v interakci s celkovým energetickým příjmem
- 5) Pilotní studie ukázala, že z léčby statiny nejvíce profitují nositelé APOA5 genotypu T-1131T.

- 6) Nepodařilo se nám potvrdit předpokládané asociace variant *APOA5* s výškou matek ani s hladinami C-reaktivního proteinu u mužů.
- 7) Je možná určitá, nikoliv však zcela jasná interakce mezi hypertriglyceridemií a genotypy *APOE* a *APOA5*.

Gen *APOA5* a jeho varianty jsou, nehledě na nízkou koncentraci proteinu v plazmě, dosud nejsilnějším známým determinantem hladin plazmatických triglyceridů u lidí.

### 13. Publikace autora použité pro disertaci (citovanost uvedena bez autocitací k 27.6. 2010)

Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, **Hubacek JA**, Merkel 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: 1866-1871.

Citováno: 6x

Hořínek A, Vráblík M, Češka R, Adámková V, Poledne R, **Hubacek JA**: T-1131 → C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals. *Atherosclerosis* 2003; 167: 369-370.

Citováno: 21x

**Hubacek JA**, Waterworth DM, Poledne R, Pitha J, Skodová Z, Humphries SE, Talmud PJ: Genetic determination of plasma lipids and insulin in the Czech population. *Clin. Biochem.* 2001; 34: 113-118.

Citováno: 6x

**Hubáček JA**, Pitha J, Adámková V, Skodová Z, Lánská V, Poledne R. Apolipoprotein E and apolipoprotein CI polymorphisms in the Czech population: almost complete linkage disequilibrium of the less frequent alleles of both polymorphisms. *Physiol. Res.* 2003a; 52: 195-200.

Citováno: 11x

**Hubáček JA**, Škodová Z, Adámková V, Vrablik M, Horinek A, Lanska V, Ceska R, Poledne R: *APOAV* polymorphisms (T-

1131/C and Ser19/Trp) influence plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Exp. Clin. Cardiol.* 2003b; 8: 151-154.

Citováno: 0

**Hubacek JA:** Apolipoprotein AV a triglyceridemie. *Cas Lek Cesk.* 2004a; 143: 799-803.

Citováno: 0

**Hubáček JA, Škodová Z, Adámková V, Lánská V, Poledne R:** The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin. Genet.* 2004b; 65: 126-130.

Citováno: 32x

**Hubacek JA, Kovar J, Skodova Z, Pit'ha J, Lanska V, Poledne R:** Genetic analysis of APOAV polymorphisms (T-1131/C, Ser19/Trp and Val153/Met): no effect on plasma remnant particles concentrations. *Clin. Chim. Acta* 2004c; 348: 171-175.

Citováno: 1x

**Hubáček JA, Adámková V, Češka R, Poledne R, Hořínek A, Vráblík M:** New variants in the apolipoprotein AV gene in individuals with extreme triglyceride levels. *Physiol. Res.* 2004d; 53: 225-228.

Citováno: 9x

**Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Bobkova D, Poledne R:** APOAV (T-1131>C) variant has no effect on mother's height in a large population study. *Lipids Health Dis.* 2004e; 3: 10.

Citováno: 0x



**Hubacek JA.** Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005a; 43: 897-902.

Citováno: 12x

**Hubacek JA,** Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R: Sex-specific effect of APOAV variant (Val153>Met) on plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol. *Metabolism* 2005b; 54: 1632-1635.

Citováno: 5x

**Hubacek JA,** Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Vlasakova Z. APOA5 variant T-1131C and risk of diabetes development. *J. Cor. Artery. Dis.* 2005c; 6: 14-15 (abstract).

Citováno: 0

**Hubacek JA,** Skodova Z, Lanska V, Stavek P, Adamkova V, Poledne R: Apolipoprotein AV variants do not affect C-reactive protein levels in Caucasian males. *Physiol. Res.* 2005d; 54: 687-689.

Citováno: 0

**Hubacek JA,** Horinek A, Skodova Z, Adamkova V, Ceska R, Zlatohlavek L, Vrablik M: Hypertriglyceridemia: interaction between APOE and APOAV variants. *Clin. Chem.* 2005e; 51: 1311-1313.

Citováno: 5x

**Hubacek JA,** Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Pitha J: APOA5 variant Ser19Trp influences a decrease of the total cholesterol in a male 8 year cohort. *Clin. Biochem.* 2006; 39: 133-136.

Citováno: 0

**Hubacek JA**, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Vlasakova Z. No association between CD14 (C-260 → T) variant and plasma triglycerides or body mass index in non-diabetic Caucasians. *Diabet. Med.* 2007a; 24: 99-100.

Citováno: 0

**Hubacek JA**, Bohuslavova R, Skodova Z, Pitha J, Bobkova D, Poledne R: Polymorphisms in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and cholesterol responsiveness to dietary change. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007b; 45: 316-320.

Citováno: 2x

**Hubacek JA**, Skodová Z, Lánská V, Adámková V: Apolipoprotein A-V variant (T-1131>C) affects plasma levels of non-high-density lipoprotein cholesterol in Caucasians. *Exp. Clin. Cardiol.* 2008a; 13: 129-132.

Citováno: 0

**Hubacek JA**, Wang WW, Skodová Z, Adámková V, Vráblík M, Horínek A, Stulc T, Ceska R, Talmud PJ: APOA5 Ala315>Val, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, is a common mutation with no major effects on plasma lipid levels. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008b; 46: 773-777.

Citováno: 2x

**Hubacek JA**, Lanska V, Skodova Z, Adamkova V, Poledne R: Sex-specific interaction between APOE and APOA5 variants and determination of plasma lipid levels. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008c; 16: 135-138.

Citováno: 1x

**Hubacek JA**, Adamkova V, Prusikova M, Snejdrlova M, Hirschfeldova K, Lanska V, Ceska R, Vrablik M: Impact of

apolipoprotein A5 variants on statin treatment efficacy. *Pharmacogenomics* 2009a; 10: 945-950.

Citováno: 2x

**Hubacek JA**, Adamkova V, Vrablik M, Kadlecova M, Zicha J, Kunes J, Pitha J, Suchanek P, Poledne R. Apolipoprotein A5 in health and disease. *Physiol. Res.* 2009b; 58(Suppl. 2): S101-S109.

Citováno: 0x

Kadlecova M, Hojna S, Bohuslavova R, **Hubacek JA**, Zicha J, Kunes J: Apolipoprotein A5 and hypertriglyceridemia in Prague hypertriglyceridemic rats. *Physiol. Res.* 2006; 55: 373-379.

Citováno: 2x

Pennacchio LA, Olivier M, **Hubacek JA**, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM: An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001; 294: 169-173.

Citováno: 371x

Pennacchio LA, Olivier M, **Hubacek JA**, Kraus RK, Rubin EM, Cohen JC: Two independent apolipoprotein AV haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 3031-3038.

Citováno: 166x

Suchanek P, Lorenzova A, Poledne R, **Hubacek JA**. Changes of plasma lipids during weight reduction in females depends on APOA5 variants. *Ann. Nutr. Metab.* 2008; 53: 104-108.

Citováno: 1x

Triglyceride Coronary Disease Genetic Consortium and Emerging Risk factors Collaboration. (**Hubacek JA** mezi spoluautory)

Triglyceride mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet* 2010; 375: 1634-1639.

Citováno: 0x

Vráblík M, Hořínek A, Češka R, Adámková V, Poledne R, **Hubacek JA**: Ser19 → Trp polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic people. *J. Med. Genet.* 2003; 40: e105.

Citováno: 13x

Vrablik M, Ceska R, Adamkova V, Peasey A, Pikhart H, Kubinova R, Marmot M, Bobak M, **Hubacek JA**: MLXIPL variant in individuals with low and high triglyceridemia in white population in Central Europe. *Hum. Genet.* 2008; 124: 553-555.

Citováno: 0x

Vrablík M, **Hubacek JA**: Genetic determination of triglyceridemia with special focus on apolipoprotein gene variants. *Clin Lipidol.* 2010 in press.

Citováno: 0x

#### 14. Další citovaná literatura

- Austin MA, King MC, Bawol RD, Hulley SB, Friedman GD: Risk factors for coronary heart disease in adult female twins. Genetic heritability and shared environmental influences. *Am. J. Epidemiol.* 1987; 125: 308-318.
- Buzza M, Fripp Y, Mitchell RJ: Apolipoprotein AI and CIII gene polymorphisms and their association with lipid levels in Italian, Greek and Anglo-Irish populations of Australia. *Ann. Hum. Biol.* 2001; 28: 481-490.
- Cohen JC, Vega GL, Grundy SM: Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr. Opin. Lipidol.* 1999; 10: 259-267.
- Forester JS: Triglycerides: risk factor or fellow traveler? *Curr. Opin. Cardiol.* 2001; 16: 261-264.
- Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of low density lipoprotein cholesterol without the use of the preparative centrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 54: 1632-1635.
- Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC: Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 319: 397-404.
- Gehrisch S: Common mutations of the lipoprotein lipase gene and their clinical significance. *Curr. Atheroscler. Rep.* 1999; 1: 70-78.
- Jang Y, Paik JK, Hyun YJ, Chae JS, Kim JY, Choi JR, Lee SH, Shin DJ, Ordovas JM, Lee JH. The apolipoprotein A5 -1131T>C promoter polymorphism in Koreans: association with plasma APOA5 and serum triglyceride concentrations, LDL particle size and coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta* 2009; 402: 83-87.

- Kao JT, Wen HC, Chien KL, Hsu HC, Lin SW. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12: 2533-2539.
- McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001; 154: 229-236.
- O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, Schultze AE, Konrad RJ. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin. Chem.* 2005; 51: 351-359.
- Poledne R, Skodová Z. Changes in nutrition, cholesterol concentration, and cardiovascular disease mortality in the Czech population in the past decade. *Nutrition.* 2000; 16: 785-786.
- Priore-Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, Catapano A, Tarugi P, Bertolini S, Calandra S: Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 411-417.
- Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otvos JD, Wilson PW, Lahoz C, Cucinotta D, Couture P, Mallory T, Schaefer EJ, Ordovas JM: Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study. *Atherosclerosis* 2001; 158: 173-181.
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrans C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW: ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating

- lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 27941-27947.
- Schaefer JR, Sattler AM, Hackler B, Kurt B, Hackler R, Maisch B, Soufi M. Hyperlipidemia in patients with apolipoprotein E 2/2 phenotype: apolipoprotein A5 S19W mutation as a cofactor. *Clin Chem* 2004; 50: 2214.
- Tai ES, Ordovas JM. Clinical significance of apolipoprotein A5. *Curr. Opin. Lipidol.* 2008; 19: 349-354.
- Talmud PJ, Humphries SE: Genetic polymorphisms, lipoproteins and coronary artery disease risk. *Curr. Opin. Lipidol.* 2001; 12: 405-409.
- Vrána A, Kazdová L. The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 2579.
- Ward KJ, Shields B, Knight B, Salzman MB, Hattersley AT, Frayling TM: Genetic variants in apolipoprotein AV alter triglyceride concentrations in pregnancy. *Lipids Health Dis.* 2003; 2: 9.

## 15. Vybrané publikace autora nesouvisející přímo s tématem disertační práce.

- Hubacek JA**, Buchler C, Aslanidis C, Schmitz G. The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bactericidal permeability increasing protein (BPI) is highly conserved. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236: 427-430.
- Hubacek JA**, Piřha J, Rothe G, Škodová Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G. C(-260) → T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 3218-3220.
- Vancura V, **Hubacek J**, Malek I, Gebauerová M, Piřha J, Dorazilová Z, Langová M, Želízko M, Poledne R. Does angiotensin converting enzyme polymorphism influence the clinical manifestation and progression of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 1999; 83: 461-462.
- Waterworth DM, **Hubacek JA**, Kovar J, Piřha J, Poledne R, Humphries SE, Talmud PJ. The plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the apoCIII gene insulin response element and the apoC1-apoE cluster. *J. Lipid Res.* 2000; 41: 1103-1109.
- Hubacek JA**, Stueber F, Froehlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, Rothe G, Schmitz G. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients – gender specific genetic predisposition to sepsis. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 557-561.
- Lapicka-Bodzioch K, Bodzioch M, Krull M, Kielar D, Probst M, Kiec B, Andrikovics H, Bottcher A, **Hubacek J**, Aslanidis C, Suttorp N, Schmitz G. Homogeneous assay based on 52 primer sets to scan for mutations of the ABCA1 gene and its application in genetic analysis of a new patient with familial high-density lipoprotein deficiency syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1537: 42-48.



- Hubacek JA**, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum. Mutat.* 2001; 18: 359-360.
- Hubacek JA**, Pitha J, Skodova Z, Poledne R. Angiotensin converting enzyme gene--a candidate gene for addiction to smoking? *Atherosclerosis* 2001; 159: 237-238.
- Červenka L, Horáček V, Vaněčková I, **Hubáček JA**, Oliviero MI, Coffman TH, Navar LG: Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension* 2002; 40: 735-741.
- Hubacek JA**, Pitha J, Skodova Z, Poledne R, Lanska V, Waterworth DM, Humphries SE, Talmud PJ; Czech MONICA Study. Polymorphisms in CYP-7A1, not APOE, influence the change in plasma lipids in response to population dietary change in an 8 year follow-up; results from the Czech MONICA study. *Clin. Biochem.* 2003; 36: 263-267.
- Hubacek JA**, Hyatt T. ARH missence polymorphisms and plasma cholesterol levels. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42: 989-990.
- Michalek J, Svetlikova P, Fedora M, Klimovic M, Klapacova L, Bartosova D, Hrstkova H, **Hubacek JA**. Interleukin-6 gene variants and the risk of sepsis development in children. *Hum. Immunol.* 2007; 68: 756-760.
- Michalek J, Svetlikova P, Fedora M, Klimovic M, Klapacova L, Bartosova D, Elbl L, Hrstkova H, **Hubacek JA**. Bactericidal permeability increasing protein gene variants in children with sepsis. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 2158-2164.
- Dufková B, Málek I, Vymetalová Y, Hosková L, Skalský I, Pirk J, Vrbská J, Marek T, Bohuslavová R, **Hubáček J**, Kautzner J. Myxoma of donor origin in a transplanted heart. *J. Heart Lung Transplant.* 2007; 26: 865-867.
- Hubacek JA**, Adamková V, Stavek P, Kubinova R, Peasey A, Pikhart H, Marmot M, Bobak M. Apolipoprotein E Arg136→Cys mutation and hyperlipidemia in a large central European population sample. *Clin. Chim. Acta.* 2008; 388: 217-218.

- Hribova P, Reinke P, Petrasek J, Brabcova I, **Hubacek JA**, Viklicky O. Heme oxygenase-1 polymorphisms and renal transplantation outcomes: balancing at the detection limit of allelic association studies. *Am. J. Transplant.* 2008; 8: 1077-1078.
- Vymetalova Y, Bohuslavova R, **Hubacek JA**, Dufkova B, Kocik M, Malek I, Kautzner J. High prevalence of microchimerism in female patients. *Transplant. Proc.* 2008; 40: 3685-3687.
- Hubacek JA**, Bohuslavova R, Kuthanova L, Kubinova R, Peasey A, Pikhart H, Marmot MG, Bobak M. The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16: 2764-2766.
- Hubacek JA**, Pitha J, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index in males and postmenopausal females but not in premenopausal females. *Czech post-MONICA and 3PMFs studies. Clin. Chem. Lab. Med.* 2009; 47: 387-390.
- Heid IM, Huth C, Loos RJF, Kronenberg F, Adamkova V, Anand SS, Ardlie K, Biebermann H, Bjerregaard P, Boeing H, Bouchard C, Ciullo M, Cooper JA, Corella D, Dina C, Engert JC, Fisher E, Frances F, Froguel P, Hebebrand J, Hegele RA, Hinney A, Hoehe MR, Hu FB, **Hubacek JA**, Humphries SE, Hunt SC, Illig T, Jarvelin MR, Kaakinen M, Kollerits B, Krude H, Kumar J, Lange LA, Langer B, Li S, Lyon HN, Meyre D, Mohlke KL, Mooser V, Nebel A, Nguyen TT, Paulweber B, Perusse L, Qi L, Rankinen T, Rosskopf D, Schreiber S, Sengupta S, Sorice R, Suk A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Völzke H, Vimalaswaran KS, Wareham NJ, Waterworth D, Yusuf S, Lindgren C, McCarthy MI, Lange C, Hirschhorn JN, Laird N, Wichmann HE. Meta-analysis of the INSIG2 Association with Obesity Including 74,345 Individuals: Does Heterogeneity of Estimates Relate to Study Design? *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000694.

## 16. Poděkování

Chtěl bych poděkovat všem, kteří mi pomohli při získání prezentovaných výsledků. Na prvním místě rodičům, kteří mě maximálně podporovali během studií. Dále bych chtěl poděkovat svým kolegům z University of Texas Southwestern Medical Center (prof. HH Hobbs a prof. JC Cohen), kde jsme gen pro apolipoprotein A5 začali analyzovat. Na mé vědecké dráze mě dále vedli a zkušenosti mi předávali prof. G Schmitz (University of Regensburg), prof. PJ Talmud a prof. SE Humphries (University College London) a prof. R. Poledne (IKEM, Praha). Poděkování patří i dalším bývalým a současným spolupracovníkům, zvláště klinikům, bez jejichž pomoci bych neshromáždil dostatečné množství studijního materiálu (za všechny alespoň dr. Adámkové z IKEM a dr. M. Vrablíkovi z VFN). V neposlední řadě pak paní laborantce E. Šimáčkové, která stála se mnou u zrodu Laboratoře molekulární genetiky v IKEM a po mnoho let byla v laboratoři mou pravou rukou.