

# Genetic dissection of familial combined hyperlipidemia : gene expression in adipose tissue and candidate gene analysis

## Citation for published version (APA):

Eurlings, P. M. H. (2003). *Genetic dissection of familial combined hyperlipidemia : gene expression in adipose tissue and candidate gene analysis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030605pe>

## Document status and date:

Published: 01/01/2003

## DOI:

[10.26481/dis.20030605pe](https://doi.org/10.26481/dis.20030605pe)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL) is the most common genetic hyperlipidemia in man. FCHL is characterized by familial clustering of hyperlipidemia and clinical manifestations of premature coronary heart disease (CAD), i.e. before the age of 60 years. FCHL may present itself in a family with elevated very low-density lipoprotein cholesterol, elevated low-density cholesterol, or both. In addition, subjects affected with FCHL are characterized by elevated triglycerides (TG) and insulin resistance. The seriously increased risk of fatal and non-fatal CAD in relatives of Dutch FCHL probands is 5.1.

Defects in adipose tissue function are believed to contribute to the FCHL phenotype, but the exact mechanisms are poorly understood. FCHL patients have an abnormal free fatty acid (FFA) metabolism resulting in reduced clearance of FFA from the circulation in the postprandial state. Moreover, it has been suggested that adipocytes as well as fibroblasts from FCHL patients exhibit an impaired response to the acylation stimulating activity of the acylation-stimulatory protein (ASP) that stimulates the peripheral synthesis of TG, and thus clearance of FFA from the circulation. In addition, FCHL patients are characterized by impaired insulin-mediated glucose uptake in peripheral tissues, and impaired insulin-mediated suppression of FFA. High levels of FFA in the circulation may in turn lead to a decrease in insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, as well as an increase in hepatic lipoprotein synthesis. Moreover, more FFA will be incorporated into non-adipose tissues such as liver and muscle.

Although FCHL was delineated about 30 years ago, the FCHL phenotype and its complex genetics are not fully understood yet. Initially, the familial aggregation of high plasma total cholesterol (TC) and TG, and bimodal distribution of plasma TG concentrations, was taken as evidence of a dominant mode of inheritance. However it is now clear that the genetics of FCHL is more complex and it has been suggested that FCHL is heterogeneous.

**Chapter 1** gives an introduction into the (patho)physiology of FCHL and an overview of the genetic approaches that can be used to identify and determine the role of (candidate) genes in the (patho)physiology. In particular, genetic linkage studies, association studies, and differential gene expression studies are discussed.

Moreover, a summary is given of the results from genetic linkage and association studies in FCHL until now.

In **chapters 2 and 3** we have characterized genes that showed a significant difference in the level of expression between subcutaneous adipose tissue from FCHL subjects and unrelated, age, gender and BMI matched controls.

**Chapter 2** reports on the identification of differentially expressed genes in FCHL subcutaneous tissue using commercially available macro-arrays. Human cDNA expression array analyses, in which adipose tissue from five FCHL patients was compared to that from four unrelated, age, gender and BMI matched controls, resulted in the identification of 22 up-regulated and 3 down-regulated genes. The up-regulation of cell-cycle genes such as c-Myc, c-Jun, and G1/S-specific cyclin D1 (CCDN1), and down-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A; p21) implies activation of the adipocyte cell cycle genes. Furthermore, the differential expression of the genes coding for tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1), support a role for adipose tissue in insulin resistance and inflammation in FCHL subjects. Whether the observed changes represent a primary genetic defect or an adaptive response remains the question, but either way support a role for adipose tissue in FCHL.

The search towards new candidate genes responsible for, or related to, adipose tissue dysfunction by a combination of suppression subtractive hybridization (SSH) and macroarray technology is described in **chapter 3**. Comparison of subcutaneous adipose tissue from five unrelated hyperlipidemic FCHL subjects with adipose tissue from five unrelated, normolipidemic, age and BMI matched control subjects resulted in the identification of 129 differentially expressed genes and gene products. These 129 genes represent: 57 unique genes, of which 1 was up-regulated and 56 were down-regulated. In addition, 35 unique ESTs were found, of which 3 were up-regulated and 32 down-regulated, and 37 sequences of unknown identity, of which 2 were up-regulated and 35 down-regulated. The genes differentially expressed implied inactivation of pro-apoptotic genes, thus favoring the balance towards an active cell cycle. Moreover, differential gene expression of genes involved in insulin signaling and fatty acid beta-oxidation, support the theory that FFA metabolism in FCHL adipose tissue is altered.

**Chapter 4** reports on the association between genetic variants in the *PPARG* gene and FCHL traits related to adipocyte lipid metabolism, dyslipidemia and insulin resistance. In a case-control panel consisting of 79 FCHL probands and 124 spouse controls, polymorphic marker D3S1259 and 3 intragenic *PPARG* variants, i.e. C161T, Pro12Ala, and Pro115Gln, were studied. The Pro115Gln variant was not found in any of the subjects. Allele frequencies of the C161T, Pro12Ala variants and D3S1259 did not differ significantly between FCHL probands and spouses. In FCHL probands, carriers of the 12Ala allele had lower concentrations of plasma apoA1 ( $P<0.05$ ) and glycerol ( $P<0.05$ ) compared to non-carriers, and 161T allele carriers had lower plasma concentrations of FFA ( $P<0.05$ ) and glycerol ( $P<0.01$ ). No significant associations were found in spouses. These data suggest an insulin sensitizing action of *PPARG* variants specifically in FCHL cases, but not in controls. Moreover, these findings illustrate that in FCHL genetic predisposition, such as variants in *PPARG*, can significantly affect adipose tissue related insulin resistance.

**Chapter 5** reports on the genetic contribution of the *PPARA* locus to the pathophysiology of FCHL. Mutation detection analyses of the six coding *PPARA* exons resulted in the identification of four novel variants, [C/T] intron 3, S234G, [G/A] intron 5, and [C/A] 3' UTR in three FCHL probands, whereas no novel variants were identified in spouses. In a case-control study, markers D22S275 and D22S928 were shown not to be associated with FCHL. However, D22S928, mapped within 1 Mb of the *PPARA* gene, was shown to have a modifying effect on plasma apoCIII concentrations ( $P=0.011$ ) and the combined hyperlipidemic FCHL phenotype ( $P=0.038$ ). Analyses of two intragenic *PPARA* polymorphisms, in intron 2 and 7, revealed no association of these variants with FCHL. The V162 allele, from the L162V variant, was present in 1.98% (95% CI 0.042-3.88) of the probands and in 4.84% (95% CI 2.15-7.55%) of the spouses ( $P=0.10$ ). These data show that the *PPARA* locus influences plasma apoCIII concentrations and the combined hyperlipidemic phenotype in FCHL subjects, but not in spouses, indicating that this gene modifies the expression instead of contributing to the FCHL phenotype in a direct manner.

In the final chapter of this thesis, **chapter 6**, the major findings have been discussed and suggestions for further research are given. The first part discusses the role of adipose tissue in the (genetic) pathophysiology of FCHL. The second part

discusses the role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in FCHL.

## Samenvatting

### Genetische dissectie van Familiair Gecombineerde Hyperlipidemie Gen expressie in vetweefsel en kandidaat gen analyse

Familiair Gecombineerde Hyperlipidemie (FGH) is een familiale aandoening die gekenmerkt wordt door wisselend verhoogde cholesterol en triglyceride waarden in het bloed. Daarnaast worden mensen met deze aandoening gekenmerkt door de aanwezigheid van insuline resistentie en een abnormaal vetzuur metabolisme na een maaltijd. Aangedane personen uit een FGH familie hebben een sterk verhoogd risico op het ontwikkelen van cardiovasculaire aandoeningen voor het 60<sup>e</sup> levensjaar. In vergelijking met de algemene Nederlandse bevolking hebben aangedane personen binnen een FGH familie een 5x verhoogd risico op een fataal of niet fatale cardiovasculaire ziekte.

Op dit moment wordt aangenomen dat vetweefsel bijdraagt aan de expressie van FGH, maar de onderliggende mechanismen zijn nog onduidelijk. Het vetweefsel functioneert afwijkend in FGH. Mensen met FGH worden gekenmerkt door een verstoord vetzuur metabolisme na de maaltijd wat leidt tot een langere circulatietijd van deze vetzuren in de bloedbaan. Tevens zijn er aanwijzingen dat de activiteit van het acylation stimulatory protein (ASP), dat ervoor zorgt dat vetzuren in de vorm van triglyceriden in de perifere weefsels worden opgeslagen, verstoord is in fibroblasten en adipocyten (vetcellen) van FGH patiënten. FGH patiënten worden ook gekenmerkt door een verstoorde insuline gemedieerde glucose opname in de perifere weefsels, mede als gevolg van een verstoorde insuline gemedieerde suppressie van vetzuren. Hierdoor is de concentratie circulerende vetzuren hoog wat tot gevolg kan hebben dat de insuline gemedieerde glucose opname in de skeletspieren daalt, maar ook de productie van lipoproteïnen door de lever toeneemt. Tevens is er meer vetzuur inbouw en opslag in andere organen zoals spier en lever.

Alhoewel FGH voor het eerst werd beschreven in 1975, is het tot op heden nog niet volledig duidelijk hoe de aandoening genetisch in elkaar steekt en hoe het fenotype het best omschreven moet worden. In eerste instantie werd gedacht, op grond van een familiale clustering van verhoogde plasma cholesterol en triglyceride

waarden en een bimodale distributie van plasma triglyceride concentraties, dat het een dominant overervende aandoening was. Echter, tegenwoordig is het duidelijk dat de genetica van FGH veel complexer is dan in het begin werd aangenomen. Tevens wordt nu gedacht dat het waarschijnlijk ook een heterogene aandoening betreft.

In **hoofdstuk 1** wordt een introductie gegeven in de (patho)fysiologie van FGH. Verder wordt er een overzicht gegeven van de verschillende genetische strategieën die kunnen worden toegepast om meer inzicht te kunnen krijgen in de genetica en (patho)fysiologie van FGH. Zo worden genetisch koppelingsonderzoek, associatie studies en differentiële gen expressie studies besproken en worden de reeds geboekte resultaten met de eerste twee strategieën in relatie tot FGH besproken.

De **hoofdstukken 2 en 3** handelen over gen expressie studies in subcutaan vetweefsel van patiënten met FGH in vergelijking met dat van controle personen. FGH patiënten werden vergeleken met ongerelateerde controle personen met hetzelfde geslacht, dezelfde leeftijd en body mass index (BMI).

De identificatie van differentiële tot expressie komende genen in subcutaan vetweefsel van FGH patiënten met behulp van commerciële macroarrays wordt beschreven in **hoofdstuk 2**. Vetweefsel van vijf FGH patiënten werd vergeleken met dat van 4 ongerelateerde controle personen met hetzelfde geslacht, dezelfde leeftijd en BMI. Een vijftal macroarray analyses resulteerde in de identificatie van 22 opgereguleerde en 3 down-gereguleerde genen. Opregulatie van de cel cyclus genen c-Myc, c-Jun en G1/S-specific cyclin D1 (CCDN1) en de down-regulatie van cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A; p21) wijzen in de richting van activatie van de cel cyclus. Dit betekent overigens niet dat de adipocyten daadwerkelijk tot celdeling komen. De differentiële expressie van het tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukine 6 (IL-6) en intracellulair adhesie molecuul 1 (ICAM1) gen, duiden op een rol van het subcutane vetweefsel in insuline resistentie en ontsteking in patiënten met FGH.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de zoektocht naar nieuwe kandidaat genen voor verstoorde vetweefsel functie met behulp van een combinatie van suppression subtractive hybridization (SSH) en macroarray technologie. In totaal werd het gen expressie profiel van vijf FGH patiënten vergeleken met dat van vijf ongerelateerde controle personen met hetzelfde geslacht, dezelfde leeftijd en BMI, waarbij 129

differentieel tot expressie komende genen en/of genproducten werden geïdentificeerd. Onder deze 129 differentiële sequenties bevonden zich: 1) 57 bekende gen producten, waarvan er 1 was opgereguleerd en 56 downgereguleerd, 2) 35 expressed sequence tags (ESTs), waarvan er 3 opgereguleerd en 32 downgereguleerd waren, en 3) 37 onbekende gen producten, waarvan er 2 waren opgereguleerd en 35 downgereguleerd. Met name genen die betrokken zijn bij de inductie van geprogrammeerde celdood bleken verlaagd tot expressie te komen. Dit duidt op een balans in de cel die progressie door de cel cyclus bevordert. Daarnaast kwamen genen betrokken bij insuline signalering en vetzuur beta-oxidatie differentieel tot expressie. Deze laatste bevinding steunt de hypothese dat vetzuur metabolisme verstoord is in vetweefsel van personen met FGH.

De associatie tussen genetische variatie in het *PPARG* gen en FGH kenmerken gerelateerd aan vetcel lipid-metabolisme, dyslipidemie en insuline resistentie wordt beschreven in **hoofdstuk 4**. In een case-control panel bestaande uit 79 FGH probands en 124 controle personen, werden de polymorfe marker D3S1259 en drie intragene *PPARG* polymorfismen C161T, Pro12Ala en Pro115Gln bestudeerd. The Pro115Gln variant was in geen van de individuen aanwezig. In de FGH proband groep hadden dragers van het 12Ala allel een lagere plasma apoA1 ( $P < 0.05$ ) en glycerol ( $P < 0.05$ ) concentratie dan probands met alleen het 12Pro allel. FGH probands met een 161T allel hadden lagere plasma vetzuur ( $P < 0.05$ ) en glycerol ( $P < 0.05$ ) concentraties ten opzichte van probands die dit allel niet hadden. In de controle groep werden geen significante associaties gevonden. De gevonden associaties suggereren een rol voor genetische variatie in het *PPARG* gen in insuline resistentie met name in FGH probands, maar niet in controles. Daarnaast illustreren de data dat in FGH genetische aanleg, zoals de beschreven varianten in het *PPARG* gen, een significant effect kan hebben op vetweefsel gerelateerde insuline resistentie.

**Hoofdstuk 5** handelt over de genetische bijdrage van het *PPARA* locus aan FGH. Mutatie analyse van de zes coderende exonen van het *PPARA* gen resulteerde in de identificatie van vier nieuwe varianten in het gen, te weten, [C/T] intron 3, S234G, [G/A] intron 5, and [C/A] 3' UTR. Deze waren aanwezig in drie FGH probands, terwijl in de controles geen nieuwe varianten werden gevonden. In een case-control studie werd er geen associatie gevonden tussen de markers D22S275 en D22S928 en FGH. Daarentegen werd met marker D22S928, gelegen op 1Mb van



het *PPARA* gen, wel een associatie werd gevonden met plasma apoCIII concentraties ( $P=0.011$ ) en gecombineerde hyperlipidemie ( $P=0.038$ ). Analyse van twee varianten gelegen in intron 2 en 7 leverde geen associaties op met FGH of gerelateerde lipiden waarden. De L162V variant was aanwezig in het case-control panel met een frequentie van het 162V allel van 1.98% (95% CI 0.042-3.88) in de probands en 4.84% (95% CI 2.15-7.55) in de controles ( $P=0.10$ ). Op grond van deze bevindingen is geconcludeerd dat het *PPARA* locus in FCHL probands plasma apoCIII concentraties en het hebben van gecombineerde hyperlipidemie beïnvloedt. Tevens laten deze bevindingen zien dat *PPARA* niet het primaire genetische defect van FGH is, maar de expressie van FGH modificeert.

**Hoofdstuk 6** plaatst bovenstaande bevindingen verder in perspectief en draagt mogelijkheden aan voor verder onderzoek. In het eerste deel wordt de rol van vetweefsel in het ontstaan van FGH bediscussieerd. Het tweede deel gaat dieper in op de rol van de peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in FGH.