



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**TESIS DOCTORAL**

**ASOCIACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA J A LAS  
LIPOPROTEÍNAS**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Autónoma de Barcelona

**María Martínez Bujidos**

**2015**



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Autónoma de Barcelona

## **ASOCIACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA J A LAS LIPOPROTEÍNAS**

Memoria presentada por la licenciada en Química María Martínez Bujidos para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona en el programa de doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

La presente tesis ha sido realizada en el grupo de Bioquímica Cardiovascular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, dirigida por el Dr. José Luis Sánchez-Quesada y el Dr. Jordi Ordóñez Llanos.

Los directores de la tesis:

Dr. José Luis Sánchez Quesada

Grupo de Bioquímica Cardiovascular  
Institut de Recerca Sant Pau

Dr. Jordi Ordóñez Llanos

Grupo de Bioquímica Cardiovascular  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Universidad Autónoma de Barcelona

La doctoranda:

María Martínez Bujidos

Grupo de Bioquímica Cardiovascular  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

**Barcelona, 2015**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi director, el Dr. José Luis Sánchez Quesada, por haberme guiado en todo el trabajo de esta tesis, por haberme transmitido parte de sus conocimientos sobre el tema y por su optimismo ante las dificultades.

Al Dr. Jordi Ordóñez Llanos, codirector de esta tesis, por aceptarme en su grupo, por las aportaciones al trabajo realizado y porque sin su apoyo y confianza esta tesis no habría sido posible.

A mis dos compis de grupo, las brujis Montse Pérez y Anna Rull, porque sin ellas nada hubiese sido lo mismo... Anna Rull no puedo tener hacia ti más que buenas palabras por tu ayuda constante, tus consejos, tu optimismo, tu dedicación y por todos los momentos que hemos pasado juntas... espero que tengas mucha suerte a partir de ahora porque tú lo vales! Y a Montse Pérez porque siempre está dispuesta a ayudar, por tus consejos y por los grandes momentos de risas. Se te ha echado de menos en esta última recta de tesis pero espero que en tu nueva feina te vaya genial!

A todos los autores de los artículos por sus aportaciones para que los artículos salieran adelante.

A todos mis compañeros del prefabricado de lípidos, que en algún u otro momento me han ayudado. Ha sido un placer teneros como compañeros.

A toda la gente del Servicio de Bioquímica del Hospital de Sant Pau que me ayudado y enseñado tanto estos años y en especial a mis compañeros resis, que han sido el mayor apoyo que se puede tener durante la residencia, y que han vivido conmigo la evolución de esta tesis.

A mis padres porque sin ellos no habría llegado hasta aquí, por su apoyo incondicional cada día de mi vida y enseñarme que con esfuerzo y trabajo se puede conseguir cualquier meta. Y a Jorge por estar siempre ahí, incluso cuando ha habido kilómetros de distancia.







<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>1- ARTERIOSCLEROSIS .....</b>	<b>23</b>
1. 1 Origen y evolución de la placa de ateroma .....	23
<b>2- ARTERIOSCLEROSIS Y LIPOPROTEINAS PLASMÁTICAS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Lipoproteínas plasmáticas.....	26
2.2 Metabolismo de las lipoproteinas .....	27
2.3 Transporte reverso colesterol.....	29
<b>3- IMPLICACIÓN DE LA LDL EN LA ARTERIOSCLEROSIS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Características generales de la LDL .....	31
3.2 Acumulación intracelular de colesterol .....	32
3.2.1 Receptor de LDL .....	32
3.2.2 Receptores scavenger (SR) .....	34
3.3 Papel de la LDL en la arteriosclerosis .....	35
3.4 Modificaciones de la LDL .....	36
3.4.1 Oxidación .....	36
3.4.2 Agregación y/o fusión.....	38
3.4.2.1 Lipólisis .....	39
3.4.2.2 Proteólisis.....	41
3.4.3 Modificación enzimática .....	42
3.4.4 Glicosilación .....	43
3.5 Propiedades aterogénicas de las LDL modificadas .....	43
<b>4- LDL ELECTRONEGATIVA .....</b>	<b>45</b>
4.1 Propiedades de la LDL(-) .....	45
4.2 Mecanismos inflamatorios de la LDL(-) .....	47
4.3 Agregación de la LDL(-).....	48

5- APOLIPOPROTEINA J O CLUSTERINA .....	50
5.1 Generalidades.....	50
5.2 Función de la apoJ como chaperona .....	53
5.3 Relevancia fisiopatológica.....	55
6- IMPLICACIÓN DE LA apoJ EN LA ARTERIOSCLEROSIS .....	57
6.1- Asociación de la apoJ a lipoproteínas .....	58
6.1.1 Estudios en modelos animales.....	58
6.1.2 Estudios in vitro de asociación de apoJ a LDL .....	59
6.1.3 Estudios en pacientes con elevado riesgo cardiovascular .....	60
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
1. OBTENCIÓN DE LIPOPROTEÍNAS .....	67
1.1 Aislamiento preparativo de LDL a partir de un pool de plasmas. ....	67
1.2 Aislamiento de lipoproteínas a partir de 1 ml de plasma.....	70
1.3 Aislamiento de LDL electronegativa .....	72
1.4 Separación de fracciones LDL agregada y no agregada.....	73
1.5 SEPARACIÓN DE FRACCIONES LDL CON Y SIN APO J.....	73
1.5.1 Preparación columna NHS con anticuerpo apoJ .....	73
1.5.2 Fraccionamiento LDL con y sin apoJ por cromatografía de afinidad.....	74
2. CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS .....	75
2.1 Composición .....	75
2.2 Cuantificación de apoJ.....	76
2.3 Caracterización electroforética .....	78
2.3.1 Electroforesis en gradiente de acrilamida (GGE).....	78
2.3.2 Electroforesis SDS-PAGE .....	79
2.3.3 Transferencia electroforética .....	81
2.3.4 Western Blot.....	81
2.4 Monitorización de la agregación.....	82

2.4.1 Inducción de la agregación de la LDL.....	82
2.4.2 Métodos para monitorizar la agregación.....	83
2.4.2.1 Absorbancia .....	83
2.4.2.2 Precipitación de lipoproteínas.....	83
2.4.2.3 Cromatografía de gel filtración (CGF).....	83
2.4.2.4 Electroforesis en gradiente de acrilamida (GGE).....	83
2.4.2.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	83
2.4.2.6 Dicroísmo circular (CD):.....	84
2.4.2.7 ATR-FTIR:.....	84
3. AISLAMIENTO DE APOLIPOPROTEINA J.....	84
3.1 Cromatografía con la columna blue sepharosa .....	84
3.2 Cromatografía con la columna NHS-apoJ .....	85
3.3 Comprobación de la pureza de la apoJ .....	85
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>87</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
1. ARTÍCULO 1: PAPEL DE LA APOJ EN LA AGREGACIÓN DE LA LDL .....	115
1.1 Contenido de apoJ en las subfracciones de la LDL .....	115
1.2 Características físico-químicas de la LDL que contiene apoJ (LDL/J+).....	116
1.3 Papel de la apoJ en la agregación de la LDL. Depleción de LDL/J+. .....	118
1.4 Papel de la apoJ en la agregación de la LDL. Adición de apoJ. ....	119
1.5 Función antiaterogénica de la apoJ asociada a la LDL. ....	119
2. ARTÍCULO 2: DISTRIBUCIÓN DE apoJ EN SUERO Y LIPOPROTEÍNAS.....	122
2.1 Concentración de apoJ en suero de pacientes normolipémicos e hiperlipémicos.....	122
2.2 Distribución de la apoJ en cada lipoproteína y en el suero libre de lipoproteínas (LPDS).....	122
2.3 Efecto del perfil lipoproteico en la distribución de la apoJ en las lipoproteínas. .....	123

## ÍNDICE

---

3. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	126
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>





## ABREVIATURAS

---

$\alpha$ -CT	$\alpha$ -quimiotripsina
A $\beta$	péptido amiloide $\beta$
ACAT	enzima colesterol aciltransferasa
agLDL(-)	LDL(-) agregada
apo	apolipoproteína
APS	persulfato de amónio
BSA	albumina sérica bovina
CD	dicroísmo circular
CEasa	colesterol esterasa
CETP	proteína transferidora de ésteres de colesterol
CLU	clusterina
CMLs	células musculares lisas
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGF	factor del crecimiento epidérmico
E-LDL	LDL modificada enzimáticamente
ELISA	ensayo por inmovilización ligada a enzimas
FFA	ácidos grasos libres
FPLC	cromatografía líquida rápida de proteínas
GFC	cromatografía de gel filtración
GGE	electroforesis en gradiente de archilamida
gLDL	LDL glicada
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HF	hipercolesterolemia familiar monogénica
HMG-CoA reductasa	enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa
IDL	lipoproteínas de densidad intermedia
LCA	complemento activador de la lesión
LCAT	lecitina:colesterol aciltransferasa
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LDL(-)	LDL electronegativa
LDL(+)	LDL electropositiva
LDL/J-	LDL que no contiene apoJ
LDL/J+	LDL que contiene apoJ
LH	lipasa hepática
LPDS	suero libre de lipoproteínas
LpL	lipoproteína lipasa
Lp-PLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas
MM-LDL	LDL mínimamente modificada

## ABREVIATURAS

---

nagLDL(-)	LDL(-) no agregada
NASH	esteatohepatitis no alcohólica
nCLU	forma nuclear de clusterina
NEFAs	ácidos grasos no esterificados
NHS	N-hidroxisuccinamida
oxLDL	LDL oxidada
PAF-AH	acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas
PC	fosfatidilcolina
PCR	proteína C reactiva
PG	proteoglicanos
PLC	fosfolipasa de tipo C
PON	paraoxonasa
Qm	quilomicrones
rLDL	receptor de LDL
SDS-PAGE	geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SM	esfingomielina
SMasa	esfingomielinasa
sPLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A <sub>2</sub> secretora
SR	receptor Stavanger
sSMasa	esfingomielinasa secretora
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TEMED	tetrametiletildiamida
TG	triglicéridos
VEGF	factores vasculares de crecimiento endotelial
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad







La apolipoproteína J (apoJ) o clusterina (CLU) es una chaperona extracelular que forma parte del sistema de control que actúa para estabilizar las proteínas agregadas. Hay evidencias que muestran la existencia de una relación entre la apoJ y el desarrollo de arteriosclerosis ya que se ha visto que la expresión y la deposición de apoJ están aumentadas en zonas de lesión arteriosclerótica mientras que está ausente en la pared arterial sana. Una porción importante de la apoJ se asocia a las lipoproteínas en plasma, siendo más abundante en la HDL pero también hay una pequeña parte unida a la LDL y VLDL.

La primera parte de la presente tesis se centra en el papel de la apoJ sobre las propiedades aterogénicas de la LDL. Hemos visto que la apoJ se une en la circulación plasmática preferentemente a las partículas de LDL agregadas. Experimentos llevados a cabo con LDL deplecionada de apoJ muestran que es más susceptible a agregarse que la LDL total. Por otro lado, la adición de apoJ purificada previene la agregación de la LDL. Estos datos demuestran un papel protector de la apoJ en la inhibición de la agregación de la LDL, que es un proceso clave en el desarrollo de la arterioesclerosis.

La segunda parte analiza la distribución relativa de la apoJ entre las diferentes lipoproteínas y en forma libre. Nuestros datos muestran que un 20% de la apoJ circulante en plasma está asociado a las lipoproteínas y el 80% en forma libre. Clasificando a los pacientes por el perfil lipídico se observó que en los individuos hiperlipémicos presentan una concentración mayor de apoJ que los normolipémicos. Esto indica que la concentración de apoJ en suero es dependiente del perfil lipoproteico, y está asociada positivamente con la concentración de colesterol y triglicéridos. En pacientes normolipémicos un 30% de la apoJ está asociada a lipoproteínas, mientras que en pacientes hiperlipémicos el porcentaje disminuye a un 17% en hipercolesterolémicos y un 15% en hipertrigliceridémicos.







### **1- ARTERIOSCLEROSIS**

La arteriosclerosis es una patología inflamatoria caracterizada por un engrosamiento de la capa íntima de la pared arterial [1, 2]. Esto causa el estrechamiento progresivo de la luz vascular que puede evolucionar hasta la oclusión del vaso impidiendo el flujo sanguíneo por la arteria afectada.

La lesión arteriosclerótica, o placa ateromatosa, está formada por diferentes tipos celulares, que incluyen principalmente células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y linfocitos, junto con tejido conjuntivo, restos necróticos, calcio y lípidos, principalmente colesterol oxidado y fosfolípidos degradados.

La arteriosclerosis se da principalmente en las arterias de gran y medio tamaño y puede conducir a la isquemia del tejido. La manifestación clínica dependerá de la arteria afectada, infarto agudo de miocardio en el caso de arterias coronarias, accidente vascular cerebral en el caso de las arterias que irrigan el cerebro, etc.

#### **1. 1 ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA PLACA DE ATEROMA**

La formación de la placa de ateroma tiene lugar de forma progresiva. En este proceso se pueden distinguir varias etapas: inicio de la lesión, formación de la estría grasa, formación de la placa fibrosa (lesiones avanzadas) y trombosis (figura 1).

El primer acontecimiento que tiene lugar en la arteriosclerosis es la acumulación del colesterol, principalmente proveniente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), en la matriz subendotelial. Cuando existe un exceso de LDL circulante, aumenta el transporte y la retención de las mismas en los lugares dónde la permeabilidad endotelial es mayor. Las LDL difunden a través del endotelio y quedan retenidas debido a la interacción entre la molécula de la apolipoproteína B (apoB) de las LDL y los proteoglicanos de la matriz subendotelial [3]. La acumulación de partículas de LDL

## INTRODUCCIÓN

estimula en el endotelio la producción de moléculas proinflamatorias; esto ocasiona la llegada de monocitos y linfocitos a la pared arterial, que mediante sus receptores scavenger reconocen y captan las lipoproteínas modificadas y otras partículas. La captación indiscriminada de lípidos por parte de los macrófagos produce su acumulación en el interior de la célula transformándose en lo que se conoce como células espumosas. (Figura 1a).

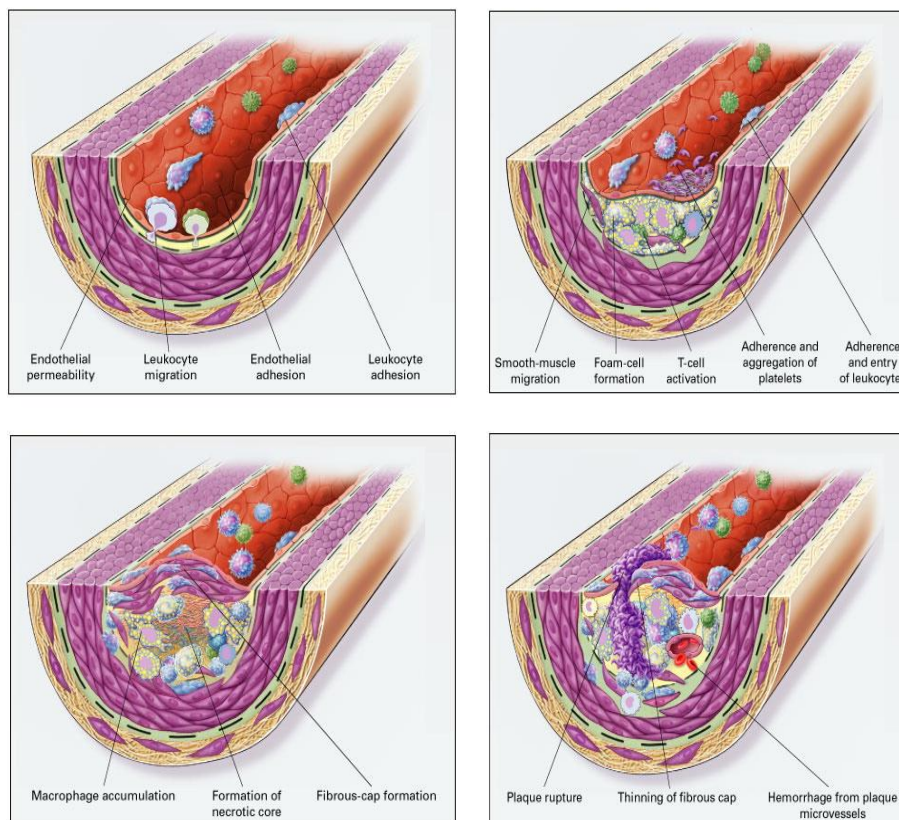


Figura 1: Progresión de la lesión arteriosclerótica. a) inicio de la lesión b) formación de la estria grasa c) lesión avanzada o placa fibrosa d) ruptura de la placa/trombosis [2].

El siguiente paso en el desarrollo de la arteriosclerosis es la formación de la placa fibrosa que se caracteriza por un aumento de la masa lipídica extracelular, principalmente colesterol y ésteres de colesterol, la proliferación de células musculares lisas (CMLs) y la formación de una cubierta proteica de matriz extracelular producida por las CMLs [4]. La placa fibrosa se inicia con la migración de las CMLs desde la



capa media hacia la matriz subendotelial. Allí las células proliferan y captan las lipoproteínas modificadas contribuyendo así, junto con las células espumosas derivadas de los macrófagos, al engrosamiento del núcleo lipídico. Las CMLs secretan proteínas de la matriz extracelular, como colágeno y proteoglicanos, conduciendo al desarrollo de la placa fibrosa [5] (Figura 1b).

La respuesta proliferativa de las CMLs y de las células inflamatorias hace que la estría grasa evolucione a una placa arteriosclerótica más compleja llevando la lesión a estadios más avanzados que implican muerte celular, rotura de las placas, calcificación y procesos trombóticos. (Figura 1c). Las placas ateromatosas más avanzadas presentan un núcleo necrótico que consiste en un gran núcleo lipídico rodeado por una delgada cubierta fibrosa.

La ruptura de la placa (Figura 1d) provoca trombosis y ocurre generalmente en sitios donde la cubierta fibrosa es más delgada. Este adelgazamiento de la cubierta es debido a la activación de los macrófagos, que liberan metaloproteinasas y otras enzimas proteolíticas. Estas enzimas provocan la degradación de la matriz y con ello la ruptura del endotelio, lo que puede provocar la formación del trombo y la oclusión de esta arteria. Las placas más complejas también pueden presentar depósitos de calcio lo que ocasiona un cambio en las características mecánicas del tejido arterial, contribuyendo a la inestabilidad de la placa y limitando la flexibilidad de los vasos sanguíneos. Los componentes internos de la placa y el factor tisular inician la cascada de la coagulación que provoca la adhesión de las plaquetas circulantes y que, a su vez, pueden producir trombosis por oclusión de la luz vascular [5]. El estrechamiento progresivo de la luz arterial puede acarrear síntomas isquémicos tales como infarto de miocardio o enfermedad cerebrovascular.

## 2- ARTERIOSCLEROSIS Y LIPOPROTEINAS PLASMÁTICAS

Las alteraciones de las lipoproteínas plasmáticas y los trastornos del metabolismo de los lípidos se encuentran entre los factores de riesgo de arteriosclerosis más firmemente establecidos y mejor conocidos. La relación existente entre la hipercolesterolemia y el riesgo de enfermedad cardiovascular ha sido descrita extensamente en la literatura científica [6-9].

### 2.1 LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Los lípidos son transportados en la circulación en forma de lipoproteínas, que son unos complejos con una parte lipídica y otra proteica. La fracción proteica constituye entre el 1 y el 60% de la masa total y está compuesta por una o más proteínas denominadas apolipoproteínas (apos) y por una fracción lipídica formada por lípidos apolares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y lípidos polares (fosfolípidos y colesterol no esterificado).

Las lipoproteínas presentan una enorme heterogeneidad (figura 2), con estructuras y composiciones que dependen de su origen y función.

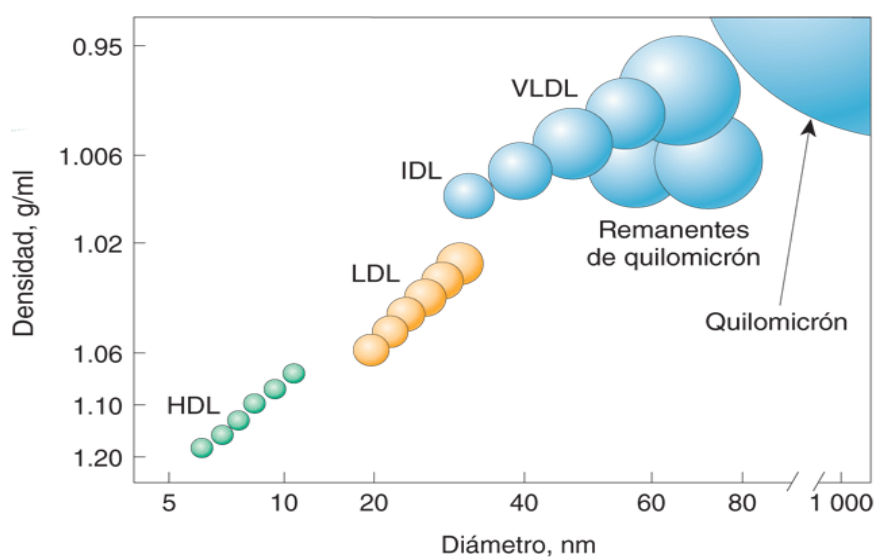


Figura 2: Distribución por densidad y tamaño de las principales clases de partículas de lipoproteína [10].

## INTRODUCCIÓN

Se clasifican según su densidad y tamaño, características que guardan una relación inversa. De esta manera se distinguen los quilomicrones (Qm), las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Además la lipoproteína (a) (Lp(a)) presenta una densidad que oscila entre la de la LDL y la HDL aunque presenta unas características diferenciales a estas. La Tabla 1 muestra las características principales de las diferentes lipoproteínas.

**Tabla 1:** Características principales de las lipoproteínas

Lipoproteína	Qm	VLDL	IDL	LDL	Lp(a)	HDL
<i>Densidad (g/L)</i>	<0,96	0,96-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,050-1,100	1,063-1,210
<i>Tamaño (nm)</i>	80-2000	30-80	28-35	20-28	21-28	5-12
<i>Función</i>	Transporte lípidos dieta	Transporte TG		Transporte CT a tejidos periféricos		Transporte reverso CT
<i>Síntesis u origen</i>	Intestinal	Hepático	Catabolismo VLDL	Catabolismo IDL hepática	Hepático	Hepático, intestinal, catabolismo VLDL y Qm
<i>Principales apolipoproteínas</i>	B-48,Cs,E, A-I,A-II,A-IV	B-100,Cs,E	B-100,C,E	B-100	B-100, apo(a)	A-I,A-II, A-IV,Cs,E
<i>% Proteína</i>	1-2	10	15	18	35	40-60
<i>% Colesterol</i>	5	15	35	50	37	20-30
<i>% Triglicéridos</i>	85	55	25	6	7	4-5
<i>% Fosfolípidos</i>	8	20	25	26	21	20-30

## 2.2 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS

**Quilomicrones:** están compuestos mayoritariamente por triglicéridos, se sintetizan en el intestino y tienen como función el transporte de los lípidos de la dieta hasta la circulación sanguínea, lo que se denomina transporte exógeno de los lípidos. Tienen una vida media muy corta ya que se metabolizan rápidamente por la lipoproteína

lipasa (LpL), que hidroliza los triglicéridos, dando lugar a quilomicrones residuales con menos triglicéridos, que se aclaran de la circulación mediante un receptor hepático específico para la lipoproteína E (apoE) [11].

**VLDL:** se sintetiza en el hígado y su función es el transporte de triglicéridos endógenos desde el hígado hacia los tejidos periféricos. Por acción de la LpL se hidrolizan los triglicéridos de esta lipoproteína. Además, mediante la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) se transfieren triglicéridos desde la VLDL a la HDL y ésteres de colesterol desde la HDL a la VLDL. Este proceso da lugar a una disminución del tamaño y su transformación en IDL, también denominada VLDL residual o remanente.

**IDL:** Esta partícula ha perdido la mayor parte de sus apo Cs, por lo que no puede ser degradada por la LpL y se degrada por la lipasa hepática (LH) que tiene actividad triglicérido lipasa, además de fosfolipasa A1, y no necesita apo C-II como cofactor. De esta manera se degradan más triglicéridos y se pierde la apoE, generándose así la LDL.

**LDL:** Esta partícula es muy rica en colesterol y su función es la liberación del colesterol procedente del hígado a las células de los tejidos periféricos, que se produce al ser reconocida la apolipoproteína B de la LDL (apo B-100) por su receptor específico, el receptor de LDL (también conocido como receptor apoB,E), que internaliza la partícula de LDL en su interior celular y permite la captación de colesterol.

**Lp(a):** Es una partícula de LDL que contiene además una apolipoproteína específica, la apo(a), que se sintetiza en el hígado. No se conoce exactamente el mecanismo de eliminación de Lp(a) del torrente sanguíneo, aunque parece que el receptor de VLDL podría estar involucrado.

**HDL:** Tienen una alta proporción de proteína en relación a su contenido lipídico. Son las responsables del transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, donde es transformado y excretado en forma de ácidos biliares. Las HDL se sintetizan en forma de HDL naciente bien a nivel hepático, o bien a partir de la liberación del material de la superficie de quilomicrones y VLDL. El colesterol libre es captado desde los macrófagos y otras células periféricas y esterificado por la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), formando HDL maduras.

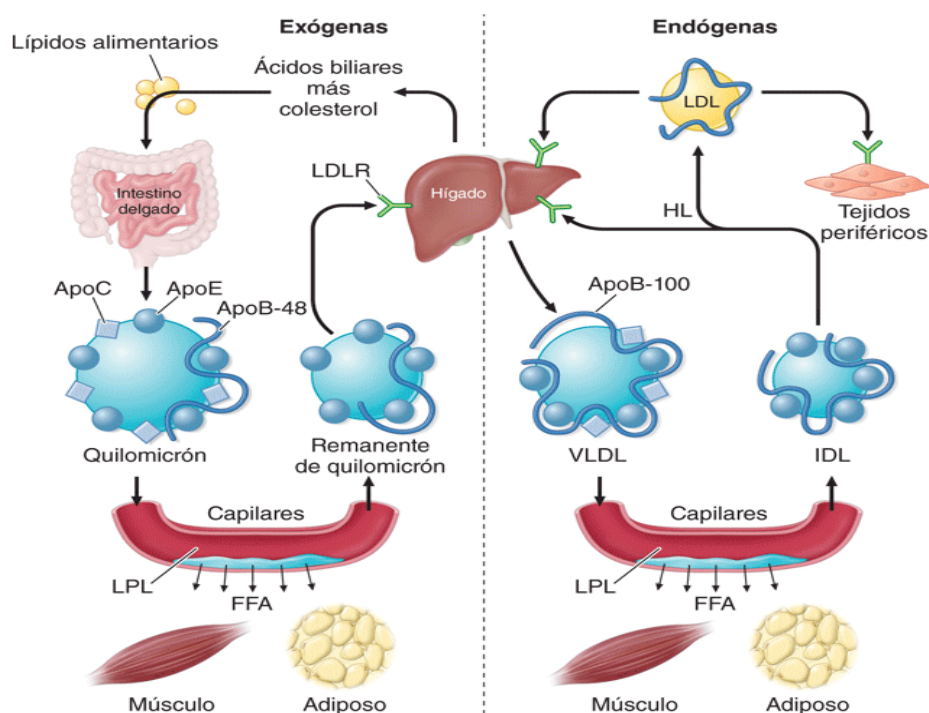


Figura 3: Las vías metabólicas exógenas y endógenas de las lipoproteínas [10]. La vía exógena transporta lípidos alimentarios a los tejidos periféricos y al hígado. La vía endógena transporta lípidos hepáticos a los tejidos periféricos.

### 2.3 Transporte reverso colesterol

El colesterol procedente de la LDL puede depositarse en grandes cantidades en algunas estirpes celulares, por lo que es necesaria la existencia de algún mecanismo

## INTRODUCCIÓN

que permita la eliminación del exceso de colesterol celular y su transporte hacia el hígado, que es el único tejido capaz de eliminar netamente el colesterol del organismo.

El transporte reverso de colesterol es el proceso mediante el cual el colesterol captado por las partículas HDL de las células periféricas, llega al hígado y desde allí es eliminado por las vías biliares.

El hígado y el intestino producen HDL nacientes. El colesterol libre es adquirido por macrófagos y otras células periféricas y esterificado por LCAT, formando HDL maduras. Los ésteres de colesterol resultantes pueden ser captados por el hígado, ovario y glándulas adrenales mediante el receptor SR-BI. También pueden ser transferidos mediante la CETP a las partículas de VLDL, IDL, LDL donde son reconocidos por receptores de LDL y LRP hepáticos que reconocen la apoB-100 y la apoE.

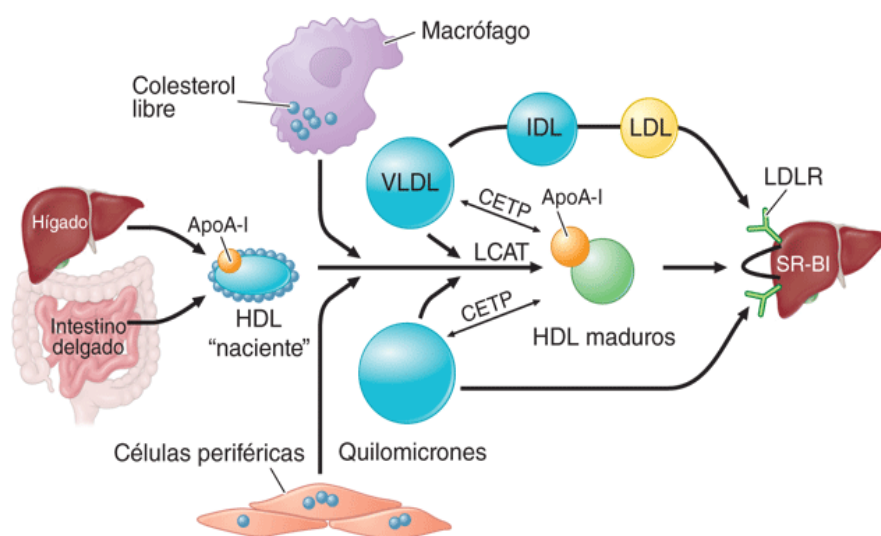


Figura 4: Metabolismo de las HDL y transporte inverso de colesterol [10].

### 3- IMPLICACIÓN DE LA LDL EN LA ARTERIOSCLEROSIS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LDL

La LDL es el mayor transportador de colesterol en plasma en forma de ésteres de colesterol. Las LDL son un grupo heterogéneo de partículas que varían en tamaño, composición y estructura. El diámetro de estas partículas de LDL oscila entre 20 y 28 nm. Tienen un núcleo hidrofóbico que contiene lípidos no polares (principalmente ésteres de colesterol y triglicéridos) y la superficie formada por una monocapa que contiene fosfolípidos, colesterol no esterificado y una única molécula de apoB-100 [12]. Cada partícula de LDL contiene unas 1600 moléculas de colesterol esterificado, 700 moléculas de fosfolípidos, 600 moléculas de colesterol no esterificado y 170 moléculas de triglicéridos [12]. Los principales fosfolípidos son fosfatidilcolina (70%) y esfingomiolina (25%) [13].

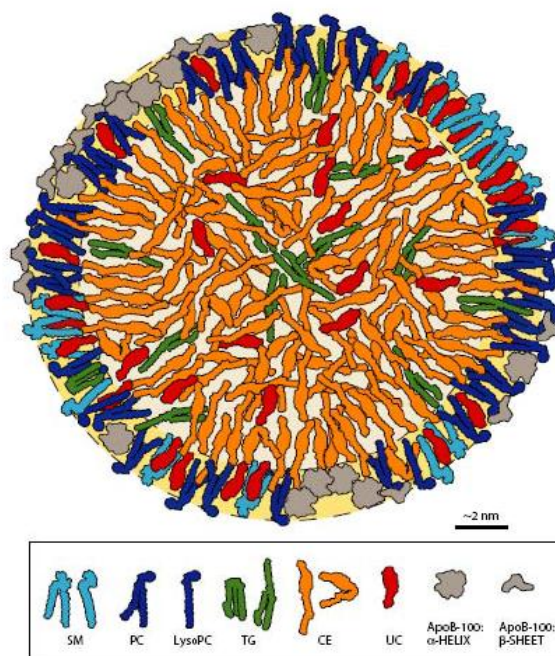


Figura 5: Esquema de una molécula de LDL [14].

La proteína principal de estas partículas, la apo B-100, es una de las proteínas monoméricas más grandes. Está situada rodeando la superficie de la lipoproteína y tiene una estructura pentapartita constituida por dominios con hélice  $\alpha$  y hoja  $\beta$  [15].

### **3.2 ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE COLESTEROL**

#### ***3.2.1 Receptor de LDL***

La función fisiológica de la LDL en el plasma es transportar el colesterol a los tejidos periféricos, proceso mediado por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) [16].

EL receptor de LDL (rLDL) es una proteína transmembrana de una única cadena peptídica con 839 aa 164 kD de peso molecular y que consta de 5 dominios (Figura 6):

1. Dominio de unión rico en cisteínas
2. Dominio de homología con el precursor del factor del crecimiento epidérmico (EGF)
3. Dominio rico en carbohidratos
4. Dominio transmembrana
5. Dominio intracitoplasmático.

[17-19]

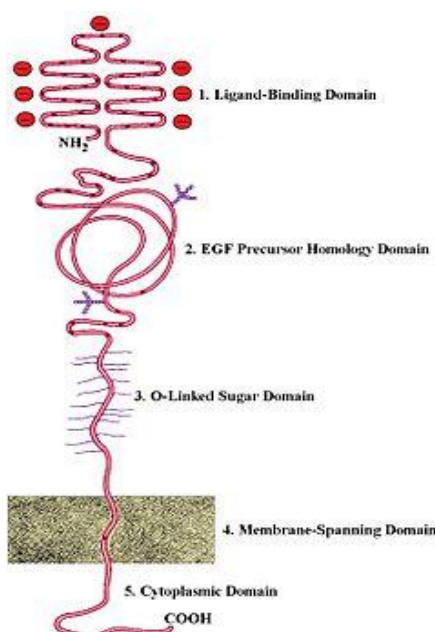


Figura 6: Estructura del receptor de LDL

Se sintetiza en el retículo endoplasmático [20] y tras ser sintetizado, es transportado al



## INTRODUCCIÓN

aparato de Golgi, donde se glicosila y pasa a la membrana. Allí se desplaza transversalmente hasta situarse en unas zonas denominadas “hoyos recubiertos” formados por la proteína clatrina, que sirve de anclaje.

El rLDL reconoce específicamente la apoB-100 y la apoE. Las lipoproteínas que contienen varias copias de la apo E (VLDL, IDL y varias subclases de HDL) se unen al receptor con más afinidad que la LDL que sólo tiene una copia de apoB-100.

El LDL reconoce la apoB de la LDL e internaliza la partícula. Una vez internalizada hay una degradación lisosomal de la LDL que da lugar a la hidrólisis de ésteres de colesterol y a la degradación de la apoB-100. En este proceso se generan aminoácidos, que son reutilizados para la síntesis de nuevas proteínas, y colesterol que es utilizado para la formación de membranas.

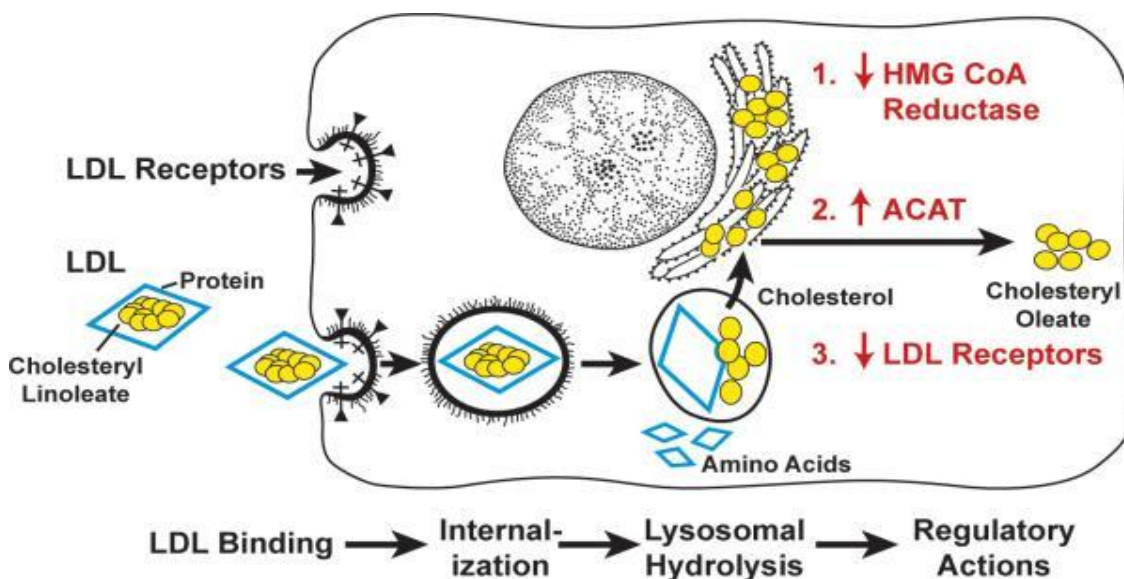


Figura 7: Mecanismo del rLDL [21].

El aporte de colesterol proveniente de la LDL suprime la actividad del enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), que regula la síntesis del colesterol y activa el enzima colesterol aciltransferasa (ACAT) que reesterifica el colesterol. Este colesterol esterificado se almacena en el citoplasma

[22]. Por otra parte se inhibe la transcripción del gen de rLDL, lo que permite a las células regular el número de rLDL para que haya el colesterol suficiente para las necesidades metabólicas [22].

Es fundamental el aclaramiento de la LDL a través del rLDL para mantener su concentración en plasma en unos niveles adecuados. Para que la interacción entre el rLDL y la LDL sea adecuada es importante que esta última no tenga su estructura alterada.

El colesterol de LDL captado por las células a través del rLDL es no aterogénico porque éste regula negativamente la síntesis celular endógena de colesterol. [21].

### **3.2.2 Receptores scavenger (SR)**

Comprenden un diverso grupo de proteínas diferentes estructuralmente. Fueron identificados por Brown y Goldstein que definieron su capacidad para unirse a LDLs modificadas, incluyendo la LDL acetilada y la LDL oxidada, además de un amplio número de ligandos que presentan la característica común de ser electronegativos. Sin embargo la carga negativa no es el único determinante de la unión de moléculas al receptor sino que se necesitan ciertos requerimientos estructurales para una unión efectiva.

Clásicamente se han descrito tres tipos o clases de SR, los receptores tipo A, los tipo B y los C, pero también se han encontrados otros como los de clase E (LOX 1), los de clase F (SREC-I SREC-II), los de clase G (SR-PSOX), Clase D (CD 68). Están presentes en diferentes tejidos vasculares y tipos celulares que van desde macrófagos, a monocitos, plaquetas, células espumosas y células endoteliales. Además están presentes en tejido adiposo y esteroideogénico.

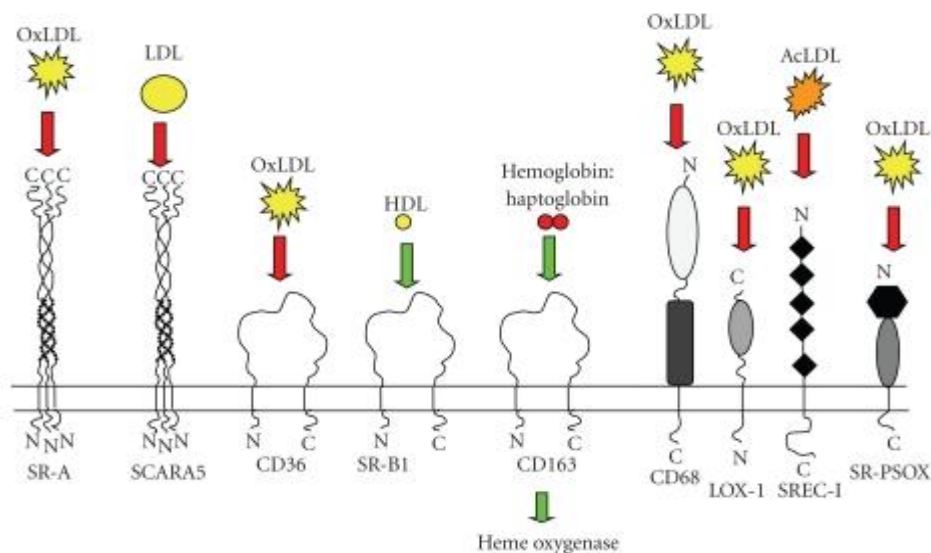


Figura 8: SR implicados en la arteriosclerosis [23].

### **3.3 PAPEL DE LA LDL EN LA ARTERIOSCLEROSIS**

La arteriosclerosis está caracterizada por la acumulación de colesterol en la pared arterial y se ha demostrado que el descenso de la concentración plasmática de colesterol reduce la aparición de eventos cardiovasculares [24]. El colesterol es transportado por la LDL principalmente, que contiene aproximadamente el 70% del colesterol circulante.

El colesterol es el lípido mayoritario que se acumula en las placas de ateroma, además se han aislado lipoproteínas similares a la LDL en lesiones arterioscleróticas, lo que indica que la LDL es la lipoproteína más aterogénica. Esto se pone de manifiesto en el caso de la hipercolesterolemia familiar monogénica (HF) que cursa con concentraciones elevadas de LDL en plasma debido a una alteración en el receptor de la LDL, con el consecuente riesgo arteriosclerótico.

La LDL nativa no presenta características aterogénicas pero en el microambiente del espacio subendotelial tienen lugar diversos procesos que modifican las propiedades biológicas de la LDL. Estos procesos incluyen la lipoperoxidación, la lipólisis, la proteólisis y la unión a componentes de la matriz extracelular. La modificación de la

LDL en la pared arterial juega un papel clave en la iniciación y progresión de la arteriosclerosis, ya que las LDL modificadas tienen la capacidad de promover la acumulación subendotelial de colesterol y desencadenan la respuesta crónica inflamatoria característica de las lesiones ateromatosas [25]. Además, las LDL modificadas se unen más a los proteoglicanos de la matriz extracelular de la pared arterial y favorecen la retención subendotelial de lipoproteínas, que se considera el proceso inicial de la arteriosclerosis [26].

### **3.4 MODIFICACIONES DE LA LDL**

#### ***3.4.1 Oxidación***

La modificación más estudiada que causa la acumulación de colesterol es la modificación oxidativa que produce numerosas modificaciones químicas en las fracciones lipídicas y proteicas. Las propiedades aterogénicas de la LDL oxidada (oxLDL) se atribuyen a su capacidad para contribuir en la formación de células espumosas así como al reclutamiento de los monocitos circulantes a la intima arterial, induciendo la agregación plaquetaria y otros efectos pro-inflamatorios y pro-trombóticos [27]. Las bases moleculares de estos efectos son difíciles de establecer debido a la complejidad de la oxidación de la LDL, que envuelve un número inmenso de modificaciones posibles de las fracciones lipídicas y proteicas. Esto es debido a la heterogeneidad de la LDL y sus productos de oxidación. Estos productos dependen de los oxidantes utilizados, la extensión de la oxidación la composición de la LDL y otros muchos factores.

La reacción de oxidación es un proceso continuo, pero se pueden distinguir varias etapas (Figura 9). Primero la oxidación de la LDL ataca al doble enlace de los ácidos grasos insaturados y genera oxisteroles, lisofosfatidilcolina, hidroperóxidos, aldehidos y cetonas [28] y se genera la LDL mínimamente modificada (MM-LDL), que aún tiene afinidad por el rLDL. Cuando estos productos reaccionan con la apoB se modifican las

propiedades de la LDL, eliminando la carga positiva de los residuos de lisina y arginina de la apoB. Esto provoca un incremento de la carga negativa de la partícula y por tanto aumenta el reconocimiento por los SR de los macrófagos. Así, estos receptores internalizan la oxLDL y esta es degradada.

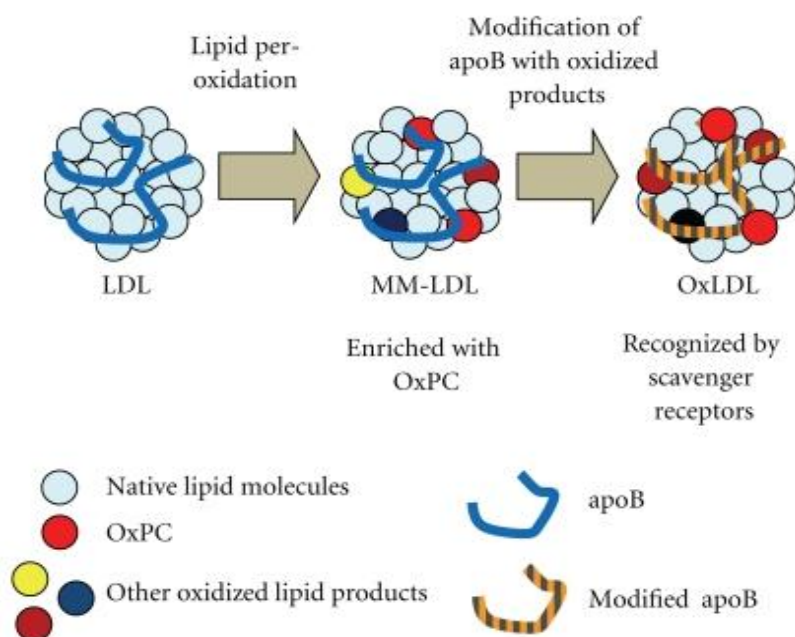


Figura 9: Diferencia entre la OxLDL y la minimamente modificada MM-LDL. [29].

Otro de los mecanismos responsables del aumento de la captación de las LDL oxidadas por macrófagos es su mayor tendencia a la agregación [30] ya que se observa un aumento de la captación por macrófagos después de la acción de agentes oxidantes como el cobre, radicales libres o hipoclorito que promueven la agregación de la LDL. En contrapartida, otros autores han descrito que la fusión de la LDL inducida por calor disminuye gradualmente tras la oxidación progresiva con varios agentes debido a la fragmentación de la apoB [31]. Los aspectos relacionados con la aterogenicidad de los procesos de agregación y/o fusión de la LDL se comentan más extensamente en los siguientes apartados.

En los mecanismos de oxidación hay que considerar que concurren factores adicionales que actúan paralelamente a la oxidación *in vivo*, como la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA<sub>2</sub>, también conocida como acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, PAF-AH) que puede generar ácidos grasos libres (FFA), los cuales son agentes inductores de fusión de lipoproteínas [32].

### 3.4.2 Agregación y/o fusión

Modificaciones de la estructura de la superficie de la LDL pueden provocar una pérdida de su estabilidad que afectará a las interacciones entre las partículas y provocará su agregación y consiguiente fusión. La modificación extensiva de un solo componente de la superficie de la LDL es suficiente para provocar su agregación y/o fusión. La agregación de la LDL pone en contacto la superficie de diferentes partículas de LDL pero produce la fusión de estas partículas, por ello se puede considerar que la agregación no modifica el tamaño de las partículas individuales. Sin embargo, si esta modificación es suficientemente extensa la energía de estabilización provocará la fusión de las partículas, que es un proceso irreversible, a diferencia de la agregación que es reversible [30].

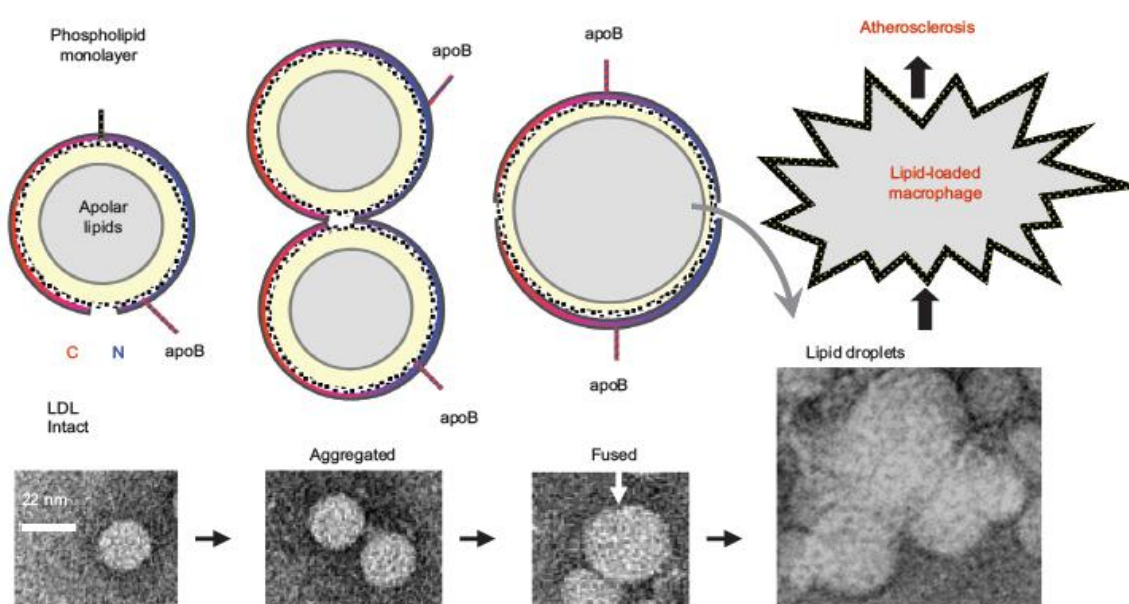


Figura 10: Agregación y fusión de la LDL [33].

La agregación de las lipoproteínas es importante en la aterogénesis por al menos dos razones. La primera es que la LDL agregada es un potente inductor de la formación de células espumosas, y la segunda que la agregación de las lipoproteínas en el espacio subendotelial incrementa la cantidad de lipoproteína retenida [34].

La desintegración de las lipoproteínas y liberación de los lípidos apolares del núcleo confluyen en la formación de gotas lipídicas o *lipids droplets*. El incremento de la captación de las partículas de LDL agregadas, fusionas y los *lipid droplets* por los macrófagos permite la formación de células espumosas e inicia la arteriosclerosis [33].

### 3.4.2.1 Lipólisis

#### Modificación de la LDL por esfingomielinasa

Se conocen varios tipos de SMasa, aunque la relacionada con la agregación de la LDL es la SMasa secretora (sSMasa). Este enzima se hiperexpresa en la intima arterial lesionada y es secretado por macrófagos y células del músculo liso. La sSMasa es una enzima dependiente de zinc que hidroliza la esfingomielina (SM) generando fosfocolina y ceramida, es por tanto una fosfolipasa de tipo C (PLC). Tras la hidrólisis, la fosfocolina (polar) se libera de la superficie mientras que la ceramida, que es apolar, queda retenida en la LDL, por lo que hay un incremento de los lípidos apolares en la superficie de la partícula. El aumento de ceramida, a través de las interacciones hidrofóbicas de estas moléculas para protegerse del entorno polar, induce la agregación de la LDL, y estos agregados inducen la formación de células espumosas *in vitro*.

Las LDLs agregadas que se han aislado de lesiones arterioscleróticas están enriquecidas en ceramida, mientras que las partículas no agregadas no [35]. Este dato sugiere que la ceramida y, por tanto, la SMasa, están directamente involucradas en la agregación y fusión de la LDL *in vivo*.

### **Modificación de la LDL por la Fosfolipasa C (PLC)**

La PLC hidroliza la fosfatidilcolina (PC) para generar fosfocolina y diacilglicerol. La fosfocolina se libera a la superficie mientras que el diacilglicerol al ser apolar se redistribuye desde la superficie hasta el núcleo de la LDL lo que genera un desequilibrio hidrofóbico que promueve la agregación y fusión de la LDL. Es un proceso similar al de la lipólisis mediante SMasa, con la diferencia que, al ser la cantidad de PC mucho mayor que la de SM (70% de los fosfolípidos de la LDL vs 20%) el efecto de inducción de agregación es mucho más drástico. Se ha demostrado que la agregación y fusión provocadas por la PLC puede prevenirse por las apolipoproteínas intercambiables polares que tienen elevada afinidad por la superficie de la LDL [36], lo que corrobora la idea de que la fusión de la LDL después de la hidrólisis por PLC es debida a la exposición en la superficie de zonas hidrofóbicas. Sin embargo, no hay evidencias de que la PLC se exprese de forma aumentada en la lesión arteriosclerótica.

No obstante, se ha detectado una actividad de tipo fosfolipasa C en una fracción minoritaria electronegativa de la LDL presente en plasma, lo que podría contribuir al aumento de las propiedades pro-aterogénicas de estas partículas [37]. Los aspectos relacionados con esta actividad de tipo PLC (PLC-like) asociada a la LDL electronegativa son comentados en mayor detalle más adelante.

### **Modificación de la LDL por la Fosfolipasa A<sub>2</sub> secretora (sPLA<sub>2</sub>)**

La sPLA<sub>2</sub> se secreta a la circulación bajo condiciones inflamatorias, similares a las que se dan en la lesión arteriosclerótica, e hidroliza los fosfolípidos en la posición sn-2 liberando FFA insaturados y lisofosfolípidos. Una hiperexpresión de la sPLA<sub>2</sub> puede contribuir a la aterogénesis induciendo la agregación de la LDL, fusión y retención por proteoglicanos.



### **Modificación de la LDL por la Fosfolipasa A<sub>2</sub> asociada a lipoproteínas (Lp-PLA<sub>2</sub>)**

La sPLA<sub>2</sub> es diferente a la actividad Lp-PLA<sub>2</sub> que se ha comentado en el apartado de oxidación de lipoproteínas. La Lp-PLA<sub>2</sub> es un enzima asociado a lipoproteínas, principalmente a LDL y HDL. El contenido de Lp-PLA<sub>2</sub> está aumentado en las LDL que se consideran más aterogénicas, las LDLs pequeñas y densas y la LDL electronegativa. Esto sugiere que la Lp-PLA<sub>2</sub> contribuye al aumento de las propiedades pro-aterogénicas de las LDL pequeñas y densas y las LDL electronegativas. Sin embargo, en este caso la acción aterogénica de la Lp-PLA<sub>2</sub> no sería mediante la estimulación de la agregación de LDL, sino mediante la generación de lípidos inflamatorios y estaría principalmente relacionada con los procesos inflamatorios característicos de la lesión arteriosclerótica.

#### **3.4.2.2 Proteólisis**

Se ha visto que la degradación proteolítica de la apoB-100 de la LDL provoca agregación y fusión de las partículas de LDL. Para que se induzca la fusión es necesario que fragmentos de los péptidos de la apoB-100 se liberen de la partícula para que se generen zonas hidrofóbicas que sean lo suficientemente inestables como para iniciar la fusión de la LDL. [38]. La apoB-100 es un componente importante de la superficie de la LDL y por lo tanto, cualquier pérdida parcial de apoB-100 de la superficie de la partícula de LDL es probable que produzca la reorganización de la superficie y, como consecuencia, también de los lípidos del núcleo.

La modificación de la LDL por proteólisis ha sido ampliamente estudiada *in vitro* usando  $\alpha$ -quimotripsina y se ha observado que el tratamiento de la LDL con  $\alpha$ -quimotripsina provoca la inestabilidad de la partícula y conduce a la formación de partículas de mayor tamaño y que se unen con mayor fuerza a los proteoglicanos. [39].

### **3.4.3 Modificación enzimática**

Las modificaciones comentadas anteriormente son enzimáticas, Sin embargo el término de LDL modificada enzimáticamente se aplica generalmente a una combinación de modificaciones enzimáticas realizadas *in vitro* que ha sido estudiado principalmente por Bhakdi y colaboradores [40-42]. Estos autores observaron que la LDL, al contrario de la HDL y VLDL, puede transformarse *in vitro* por tratamiento con enzimas, y en ausencia de oxidación, a una forma modificada de LDL con propiedades similares al complemento activador de la lesión (LCA).

Esta LDL modificada enzimáticamente con proteasas (generalmente tripsina), colesterol esterasa y neuraminidasa tiene propiedades similares a la LDL encontrada en lesiones arterioscleróticas y se ha denominado genéricamente como E-LDL [40].

La E-LDL se une a la proteína C reactiva (PCR) y es reconocida por uno o varios SR de macrófagos, por lo que es un potente inductor de la formación de células espumosas. De esta manera, la E-LDL activa la vía del complemento por dos mecanismos, uno dependiente de PCR que tiene lugar a bajas concentraciones de E-LDL, y el otro independiente de PCR que ocurre a concentraciones altas de E-LDL [41] [42].

Concentraciones elevadas de E-LDL son citotóxicas. Puesto que la E-LDL activa la vía del complemento y la LDL oxidada no, y además es un potente inductor de la formación de células espumosas, la modificación enzimática de la LDL podría ser clave en su aterogenicidad.

El ataque enzimático de la LDL expone uno o varios epítomos, que pueden ser detectados con anticuerpos. Con estos anticuerpos se pueden localizar depósitos extracelulares de partículas similares a la E-LDL en las lesiones tempranas arterioscleróticas. Estos depósitos se han detectado en colocación con los

complejos del complemento C5b-9 [43]. Ratones deficientes de C6 están protegidos contra el desarrollo de la arteriosclerosis inducida por dieta, lo que demuestra que la activación del complemento por la E-LDL juega un papel importante en la aterogénesis [44].

### **3.4.4 Glicosilación**

La LDL glicada (gLDL) se forma por la interacción de la glucosa con los grupos amino libres de los residuos de lisina y arginina de la molécula de apoB de la LDL, esto provoca una pérdida de carga positiva que disminuye la afinidad por el rLDL, y por tanto aumenta su vida media en plasma [45]. Además promueve su aclaramiento por los receptores scavenger conduciendo a la formación de células espumosas [46]. La glicosilación aumenta la afinidad de la LDL por los PGs, incluyendo el aumento de la susceptibilidad a la oxidación y promueve la agregación *in vitro* [47].

La gLDL esá presente en suero de todos los individuos, en pacientes normolipémicos alrededor del 2-17% de las lisinas están glicadas. Esta proporción está aumentada en pacientes diabéticos [48]. Se ha visto que las LDLs pequeñas y densas, que son consideradas aterogénicas, están más glicadas tanto *in vitro* como *in vivo* que el resto de LDL. Esta glicosilación diferencial puede deberse a la diferente conformación de la apoB en estas partículas, lo cual contribuye al aumento de las propiedades aterogénicas de las LDLs pequeñas y densas.

### **3.5 PROPIEDADES ATEROGÉNICAS DE LAS LDL MODIFICADAS.**

Hay una estrecha relación entre las modificaciones de la LDL que aumentan la carga negativa y el riesgo arteriosclerótico. La LDL se aclara por el rLDL cuya expresión está regulada por la concentración de colesterol intracelular, lo que provoca un control estricto de la concentración de colesterol esterificado en el citoplasma [49]. Sin embargo las lesiones arterioscleróticas están caracterizadas por la presencia de

células espumosas que acumulan colesterol intracelular de forma masiva [50]. Esta contradicción se denominó paradoja del colesterol, e indicaba la existencia de una vía de entrada de colesterol al interior celular, diferente del rLDL.

Se hipotetizó que la aterogenicidad de la LDL es debida a que ésta se modifica e internaliza por una vía alternativa a la del aclaramiento por el rLDL. Las LDL modificadas son fagocitadas por los macrófagos, que las reconocen mediante SR específicos cuya expresión no está regulada por el colesterol intracelular. En consecuencia, los macrófagos se convierten en células espumosas, favoreciendo el desarrollo de la placa de ateroma. Mediante numerosos estudios *in vitro* comprobó que las LDL modificadas por diferentes procesos no son reconocidas por el rLDL pero si por los SR.

Por otra parte, estas LDL modificadas pueden ser más fácilmente retenidas por la matriz extracelular de la pared vascular, adquirir propiedades inflamatorias y aumentar su potencial aterogénico [51].

La LDL se oxida y agrega en zonas lesionadas de la pared arterial, pero no en zonas sanas, por lo que la existencia en el plasma de estas LDL modificadas podría ser indicativa de la presencia de lesiones arterioscleróticas. Por este motivo se ha planteado la cuantificación de la LDL modificada como un marcador de riesgo cardiovascular y su uso para estimar la extensión y evolución de las lesiones arterioscleróticas [52].

### **4- LDL ELECTRONEGATIVA**

Las formas modificadas de LDL tienen como característica común un incremento de la carga electronegativa respecto a la LDL nativa, no modificada. Por esta razón se considera que la LDL electronegativa es un pool de formas modificadas de LDL en circulación [53]. La carga negativa de la LDL aumenta con la oxidación, la glicosilación no enzimática, lipólisis, o la unión de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) a la LDL, además de mediante otros mecanismos fisiopatológicos.

La concentración de la LDL(-) suele ser inferior al 5-6% en sujetos sanos y está aumentada en patologías asociadas a un alto riesgo cardiovascular, tales como hiperlipemia, diabetes [54-57], enfermedad renal severa [58], estatohepatitis no alcohólica (NASH) o pacientes con síndromes coronarios; y también en otras situaciones que no son necesariamente patológicas como la lipemia postprandial o después de ejercicio intenso [59].

#### **4.1 PROPIEDADES DE LA LDL(-)**

La LDL(-) es heterogénea en tamaño y densidad, dependiendo del mecanismo por el que se forme. En sujetos normolipémicos está compuesta principalmente por partículas pequeñas y densas, en pacientes hipercolesterolémicos mayoritariamente por partículas grandes y en hipertriglicéridémicos puede estar formada por partículas tanto densas como ligeras [57]. También es heterogénea en su composición de lípidos y proteínas. Respecto a estas últimas, la LDL(-) tiene un contenido incrementado de apoE, apoCIII, apoAI, apoAII, apoD, apoF y apoJ respecto a la LDL nativa [60, 61], además de una mayor actividad de la Lp-PLA2 (o PAF-AH) respecto a la LDL(+) [62].

Una característica única de la LDL(-) es la presencia de una actividad fosfolipasa de tipo C (PLC-like) que podría ser la causante de una elevada tendencia a la agregación [63]. Esta actividad, que no se encuentra en la LDL(+), es mucho más alta en una fracción de LDL(-) agregada (agLDL(-)) que en la fracción de LDL(-) no agregada. Hidroliza la cabeza polar de la colina generando monoacilglicerol, ceramida y diacilglicerol [63]. El origen de esta actividad fosfolipolítica se desconoce por el momento, aunque se ha sugerido que podría ser debido a cambios conformacionales del extremo N-terminal de la apoB [64].

Respecto al contenido lipídico, la LDL(-) se caracteriza por mayor contenido en triglicéridos y NEFAs [61, 65]. El aumento de NEFAs es debido a que cuando la concentración de NEFA en sangre excede la capacidad de unión de la albúmina, la cantidad de NEFAs asociada a la LDL aumenta favoreciendo la formación de LDL(-). Este aumento de la concentración de NEFAs altera las propiedades de la superficie y favorece la agregación de la partícula [32].

La LDL(-) presenta una serie de propiedades aterogénicas, en parte relacionadas con una conformación anómala de la apoB, que presenta una pérdida parcial de estructura secundaria que da como resultado un alto contenido de estructura  $\beta$  y bajo contenido de estructura  $\alpha$ -hélice [66]. Esto genera una pérdida de afinidad por el rLDL que puede impedir su captación por el hígado o tejidos periféricos. Esto unido a que la carga eléctrica de la LDL(-) no es suficientemente elevada como para ser reconocida por los SR de los monocitos [67] sugiere una disminución en su aclaramiento en plasma lo que prolongaría su vida media en circulación.

Otra propiedad aterogénica es el aumento de la unión a proteoglicanos debida a la alta susceptibilidad de la LDL(-) a la agregación, que aumenta la retención subendotelial. De hecho es la fracción agregada de la LDL(-) la responsable de la unión a los PG [68]. Esta subfracción tiene una conformación anormal que pone a la exposición un

epitopo de la apoB, conocido como Ib, que es un sitio de unión a los PGs alternativo [69]. (Figura 11)

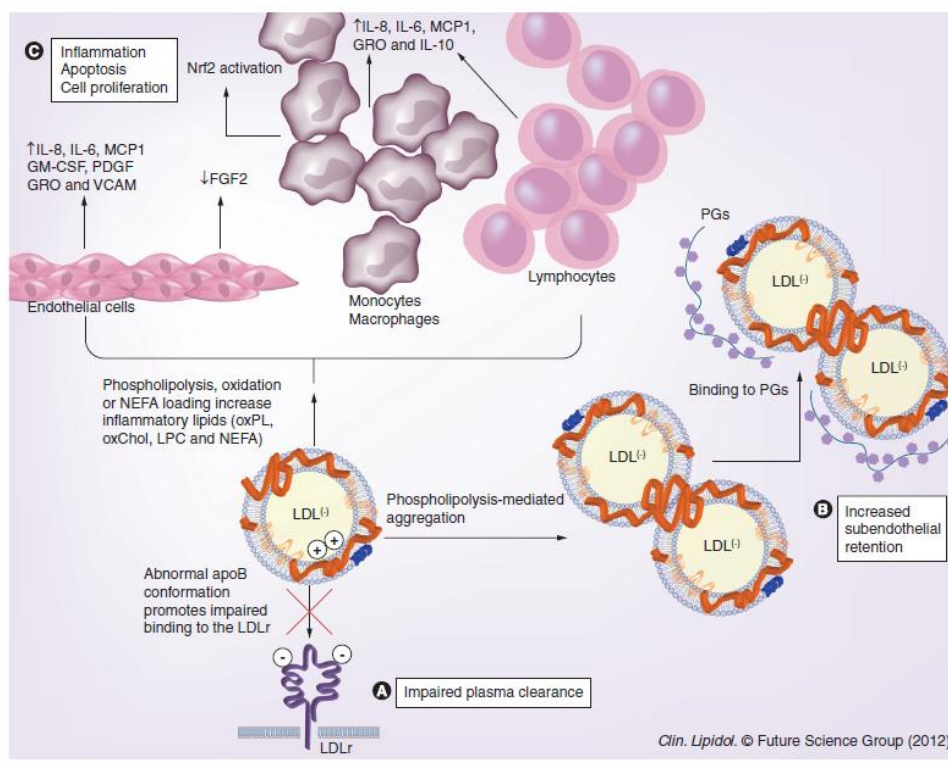


Figura 11: Propiedades aterogénicas de la LDL (-). [64]

#### **4.2 MECANISMOS INFLAMATORIOS DE LA LDL(-)**

La LDL(-) tiene la capacidad de activar factores de transcripción NF-κB, AP-1 y PPAR, induciendo la expresión de un número elevado de moléculas inflamatorias que incluyen citoquinas (IL6), quimioquinas (IL8, MCP-1, GRO), moléculas de adhesión vascular (VCAM) y factores de crecimiento (GM-CSF, PDGF) [53]. Además, tiene un papel en la modulación de la angiogénesis estimulando la expresión de los factores vasculares de crecimiento endotelial (VEGF) e inhibiendo la liberación de metaloproteinasas MMP2 y MMP9. Este potencial inflamatorio se ha demostrado en diversos tipos celulares incluyendo células endoteliales, linfocitos, monocitos y macrófagos [70, 71].

Se desconoce qué componentes de la LDL(-) son los responsables de sus propiedades inflamatorias. La lisofosfatidilcolina (LPC) y los NEFA se encuentran aumentados en la LDL(-) [72] ambos son mediadores de la inflamación [73] por lo que podrían ser responsables de su efecto inductor de la liberación de quimioquinas en células endoteliales. Recientemente se ha descrito que la generación de ceramida, quizás generada por la actividad PLC-like, también puede tener un papel en la acción inflamatoria. Existen varios mecanismos enzimáticos que al actuar sobre la LDL originan un aumento en su carga negativa y en el contenido de LPC y NEFA: sPLA<sub>2</sub>, SMasa, colesterol esterasa (CEasa) o Lp-PLA<sub>2</sub> (PAF-AH). Además, estas modificaciones enzimáticas afectan a la conformación de la LDL [14] y pueden ser responsables de su menor afinidad por el rLDL y mayor agregabilidad.

### **4.3 AGREGACIÓN DE LA LDL(-)**

La LDL(-) agrega espontáneamente formando estructuras de tipo amiloide, estas estructuras están compuestas de una alineación de partículas de LDL(-) no fusionadas que se amontonan. Además de auto-agregarse, la LDL(-) tiene la capacidad de inducir la agregación de la LDL nativa, lo que sugiere que la LDL(-) tiene propiedades amiloidogénicas. Se ha sugerido que esta propiedad es debida a la conformación anormal de la apoB en la LDL(-) con mayor contenido proporcional en estructuras beta, que induce el cambio estructural de la apoB en partículas de LDL nativas.

Sin embargo, su actividad PLC intrínseca también parece estar implicada en este proceso. La actividad PLC-like hidroliza los fosfolípidos, generando lipoproteínas agregadas (agLDL(-)) que pueden detectarse en circulación plasmática y que representan el 0,25-0,5% de la LDL total. Análisis de microscopía electrónica de agLDL(-) aislada del plasma han revelado que esta subfracción se encuentra agregada pero no fusionada. Por tanto, estas partículas pueden atravesar la íntima de la pared arterial. En áreas de lesión arteriosclerótica hay una hiperexpresión de proteasas y



## INTRODUCCIÓN

lipasas implicadas en la agregación de la LDL. Estos enzimas junto a la actividad PLC-like intrínseca pueden acelerar la fusión de la agLDL(-). Estas lipoproteínas fusionadas tienen mayor unión a los proteoglicanos y por tanto quedan fácilmente retenidas en el espacio subendotelial. La Figura 12 esquematiza la posible implicación de la agLDL(-) en el desarrollo de la arteriosclerosis.

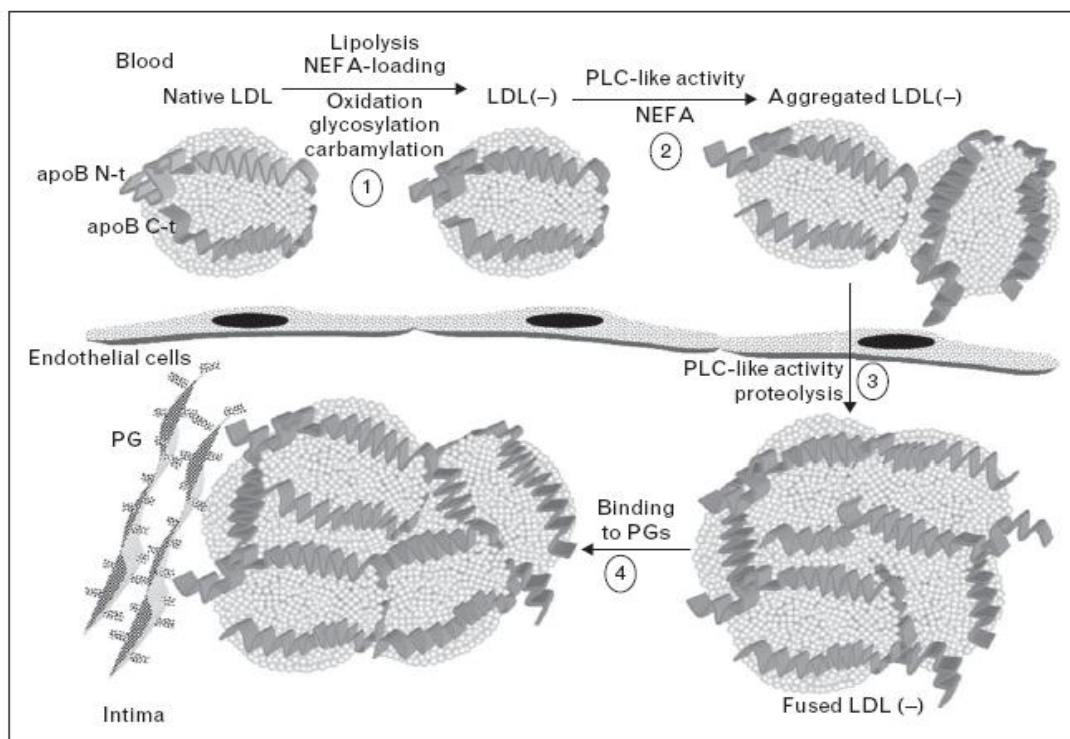


Figura 12: Mecanismo de formación de LDL(-), agregación y unión a proteoglicanos.

[64]

## 5- APOLIPOPROTEINA J O CLUSTERINA

### 5.1 GENERALIDADES

La apolipoproteína J, (apoJ), también conocida como clusterina (CLU), está codificada en humanos por un único gen de nueve exones, localizado en el cromosoma 8p21-p12. La apoJ se puede presentar de acuerdo a su localización en dos isoformas diferentes, la forma nuclear de clusterina (nCLU) y la forma secretora (sCLU o apoJ). Las dos isoformas tienen diferentes funciones como resultado de un mecanismo de “splicing” alternativo que genera cadenas polipeptídicas de diferente longitud. Además, la apoJ sufre una serie de modificaciones post-traduccionales, como son la unión entre las dos subunidades por puentes disulfuro, glicosilación, fosforilación y oxidación de los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína (Figura 13).[74]

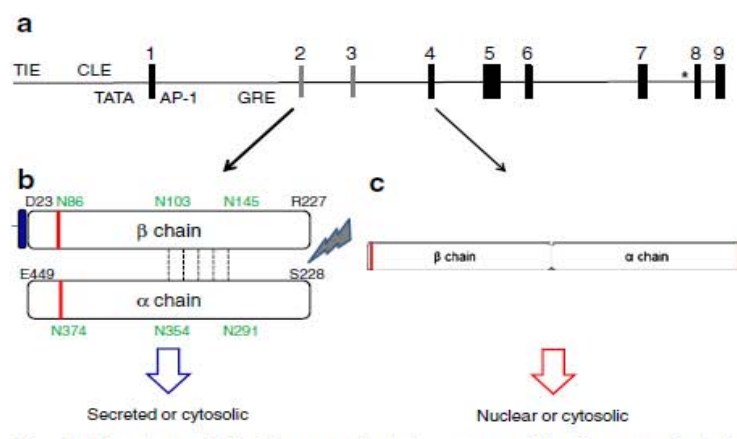


Figura 13: Estructura del gen de la apoJ [74].

La forma predominante de apoJ es la secretora, que es una proteína glicosilada de 76-80 kDa heterodimérica unida por puentes disulfuro, con 449 aminoácidos, de los que los 22 primeros corresponden a la secuencia señal secretora hidrofóbica [75]. La cadena polipeptídica se rompe proteolíticamente para eliminar el péptido señal y entre los residuos 227/228 para generar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , que se unen antiparalelamente por cinco puentes disulfuro para formar la molécula heterodimérica [76]. (Figura 14).

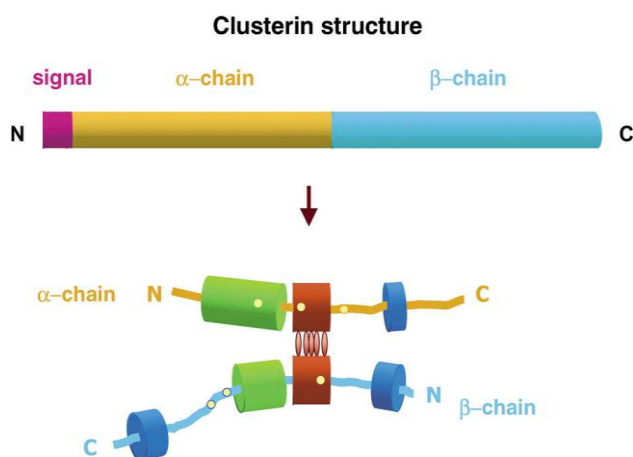


Figura 14: Estructura de la apoJ [76].

La clusterina se expresa en todos los tejidos y es una proteína abundante en fluidos biológicos incluyendo plasma, orina, fluido cerebroespinal y semen [77-79]. La forma nuclear está estrechamente relacionada con el cáncer y la regulación de la apoptosis, el ciclo celular y la reparación de DNA, mientras que la forma secretora (sCLU o apoJ) juega un papel importante en las enfermedades metabólicas asociadas con la inflamación y el estrés oxidativo como la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes y la arteriosclerosis.

Se ha demostrado que la apoJ es una chaperona extracelular, ya que tiende a unirse a proteínas parcialmente desnaturalizadas con dominios hidrofóbicos [80] inhibiendo la precipitación inducida por estrés de diferentes proteínas *in vitro* [81, 82]. Su acción podría ser protectora reduciendo la extensión de la progresión de enfermedades asociadas con la abundancia de precipitados protéicos.

### **Localización Extracelular/Intracelular de la apoJ**

La Figura 14 muestra el mecanismo mediante el cual la apoJ es excretada. El mRNA de la apoJ se dirige al retículo endoplasmático (ER) para la traducción (1), la proteína traducida se procesa en el aparato de Golgi y se secreta al espacio extracelular apical

(1') o basolateral (1''). En las células que tienen una vía de exocitosis regulada, la secreción de apoJ depende de la señal extracelular apropiada.

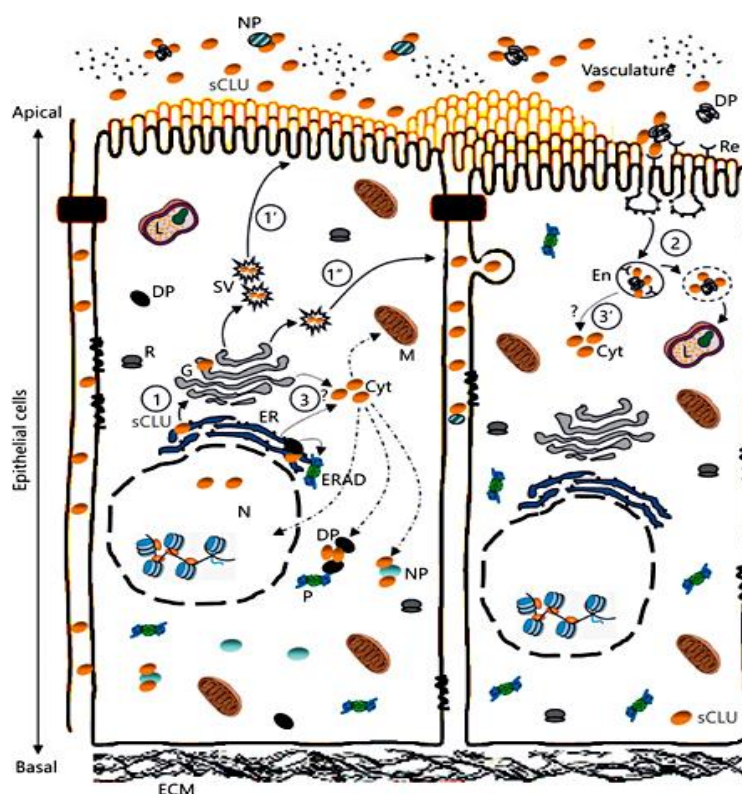


Figura 14: Mecanismo de excreción de la apoJ [83]. G:aparato de Golgi; NP:Proteínas normales; En: endocitosis; L:lisosoma; Cyt:citosol; DP:proteínas dañadas; Re: Receptor endocítico; M:Mitocondria; N: núcleo; ER:retículo endoplasmático; ERAD: degradación de proteínas asociadas al ER; R:ribosoma; SV:vesicula secretora; P: proteasomas.

En el espacio extracelular, la apoJ puede actuar como chaperona con proteínas normales (NP) o unirse a proteínas dañadas (DP) y dirigirlas a los lisosomas (L) por unión al receptor endocítico (Re) gp330/megalina/LRP2 o a otros receptores desconocidos.

En algunas células, la apoJ puede evitar la vía secretora (3, 3') y localizarse en compartimentos intracelulares: la mitocondria, el núcleo y el citosol (Figura 14).

## 5.2 FUNCIÓN DE LA apoJ COMO CHAPERONA

Las chaperonas moleculares son un grupo diverso de proteínas que interactúan con proteínas total o parcialmente desplegadas para estabilizarlas y prevenir su agregación y precipitación [83].

Condiciones como el estrés térmico y el oxidativo pueden causar el desplegamiento parcial de las proteínas y su agregación. Se ha propuesto que la apoJ es una de las abundantes chaperonas extracelulares que forman parte del sistema de control que actúa para estabilizar las proteínas agregadas y mediar su aclaramiento a través de endocitosis mediada por receptor y degradación lisosomal. [84, 85].

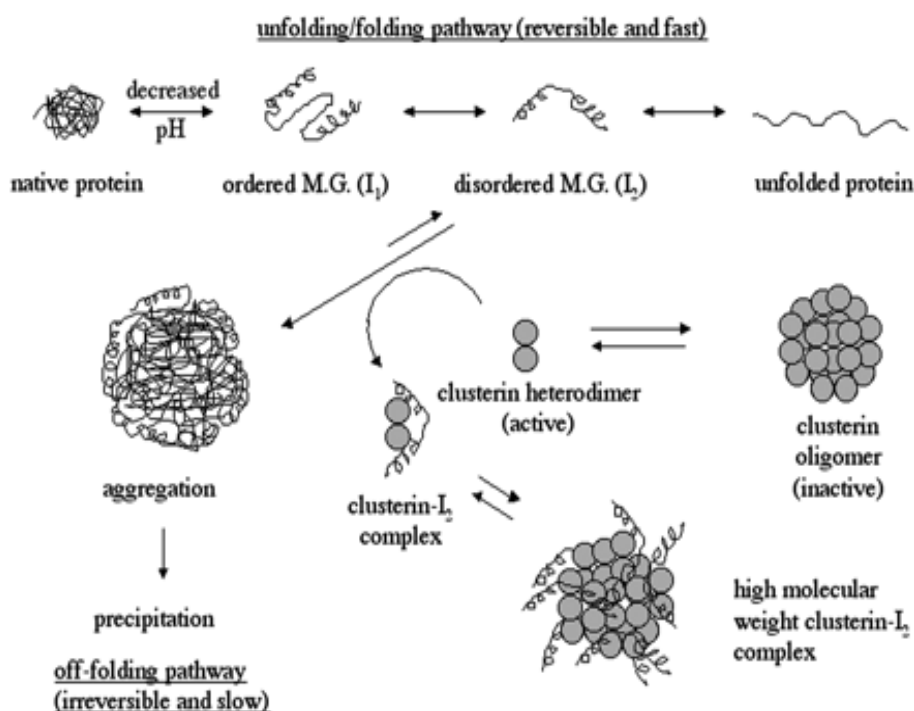


Figura 15: Mecanismo de acción de la apoJ [86].

Bajo condiciones de estrés, una proteína nativa comienza a desplegarse y adoptar una serie de estados intermedios plegados (I<sub>1</sub> y I<sub>2</sub>) (Figura 15). En este ejemplo, el intermediario I<sub>2</sub> tiene mayor exposición de zonas hidrofóbicas que facilitan su agregación mediante una vía irreversible. La apoJ en solución también forma agregados de varios tamaños y su forma activa es un heterodímero de 80kDa, que se

une al intermediario  $I_2$  y forman un complejo de alto peso molecular. Hay dos fases en el proceso de interacción de la apoJ y el estado  $I_2$ . En primer lugar,  $I_2$  se estabiliza y se previene su agregación y, a continuación, se forma un complejo de alto peso molecular con la apoJ. Se ha demostrado que durante situaciones de estrés la apoJ alarga la vida media del estado intermedio  $I_2$ , lo cual indica que la apoJ estabiliza la forma no agregada (probablemente monomérica) de este intermediario. Todo esto sugiere que la apoJ forma complejos con estados intermedios de agregación [87].

La distribución de la clusterina entre las diferentes formas agregadas es independiente de la temperatura en el rango 37-50°C. Además, la habilidad de la apoJ de unirse a las proteínas y su capacidad para prevenir la precipitación apenas muestra variación en este rango de temperaturas. Por el contrario, el estado de agregación si es sensible al pH, estando la formación de la forma de 80 kDa monomérica favorecida con una acidez media. Esto está correlacionado con el incremento de exposición de zonas hidrofóbicas de la apoJ y el aumento de su unión a la proteína nativa sin apenas ningún cambio en su estructura secundaria a este pH [88] [89].

Estudios de interacción de la apoJ con formas estructurales diferentes de  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\gamma$ -cristalina y lisozima muestran que la apoJ no se une a la forma nativa, sino que permanece estable en disolución como monómero. En cambio, sí que se une a la forma reducida de estas proteínas que agrega y precipita lentamente. Dado que las formas nativa y reducida de la proteína tienen la misma estructura secundaria, las diferencias de afinidad con la apoJ no se pueden explicar en base a esto, sino a pequeñas diferencias de su conformación que favorecen una mayor exposición de zonas hidrofóbicas de la forma reducida.

Esta mayor habilidad de la apoJ de interactuar con proteínas que tienen un proceso de agregación y precipitación lento, y su capacidad para prevenirlo, sugiere que los factores cinéticos son importantes para regular la eficacia de la acción de la

chaperona. La apoJ se une y estabiliza a proteínas que se agregan y precipitan lentamente pero no tiene la capacidad de estabilizar proteínas que se hayan agregado y precipitado muy rápidamente [87].

### **5.3 RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA**

La presencia de apoJ está asociada con depósitos de proteínas extracelulares incluyendo depósitos de inmunoglobulinas en enfermedad renal, depósitos de priones en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, placas amiloides en enfermedad de Alzheimer y placas arterioscleróticas. La presencia de apoJ en estos depósitos sugiere que está asociada con el desplegamiento de proteínas *in vivo*. La deposición patológica de estas proteínas puede ser consecuencia de que la capacidad de la apoJ de prevenir la acumulación de agregados de proteínas está sobrepasada por concentraciones elevadas de proteínas desplegadas. De acuerdo con estas observaciones, la expresión de la apoJ está aumentada en enfermedades caracterizadas por proteínas mal plegadas, agregación y precipitación, por ejemplo en el Alzheimer y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob [90].

La apoJ ha sido relacionada con diversas enfermedades incluyendo enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, enfermedades degenerativas, inflamación y cáncer [91-93]. Su concentración está aumentada durante la fase temprana del infarto de miocardio y el daño vascular [94], y se ha observado que, debido a su papel citoprotector, la administración intravenosa de apoJ reduce el tamaño del infarto de miocardio en ratas [95]. Atendiendo a la implicación de la apoJ en el síndrome metabólico, se ha encontrado que la glucosa ejerce una regulación positiva en la expresión de apoJ en hepatocitos [96] y los polimorfismos de su gen están asociados con la diabetes mellitus tipo 2 [97].

El papel de la apoJ durante la neurodegeneración es principalmente citoprotector, debido a su función como chaperona. Se ha identificado la apoJ como un determinante

genético significativo en la enfermedad de Alzheimer, y se cree que la asociación entre los péptidos amiloidogénicos y la apoJ contribuyen a limitar el mal plegamiento de las especies de péptido amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) facilitando su aclaramiento del espacio extracelular [98]. Además, el contenido de apoJ en plasma está asociado con la atrofia del córtex entorrinal, la severidad de la enfermedad y la progresión clínica del Alzheimer [99].

La concentración media de apoJ en plasma es de alrededor de 100  $\mu\text{g/ml}$ , y es 10 veces más alta en semen [100, 101]. La concentración plasmática aumenta en diabetes tipo 2 y durante el desarrollo de enfermedad coronaria o infarto de miocardio. En estudios más recientes, como el estudio de Kujiraoka et al. en población japonesa, han encontrado asociada la concentración de apoJ a la abundancia de lesiones en arterias coronarias en la enfermedad de Kawasaki. Su concentración en plasma está relacionada positivamente con la concentración de glucosa en sangre y se halla aumentada en pacientes con diabetes tipo 2 [102].

Otros estudios han encontrado que la concentración de apoJ está incrementada en pacientes con cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular no diferenciado y cáncer de vejiga. En este último también se han encontrado concentraciones de apoJ aumentadas en orina [103].



### **6- IMPLICACIÓN DE LA apoJ EN LA ARTERIOSCLEROSIS**

La primera evidencia de la relación de la apoJ en el desarrollo de arteriosclerosis es la identificación de apoJ en lesiones arterioscleróticas y el hecho de que su distribución en la pared arterial aumenta con la progresión de la arteriosclerosis [104, 105]. Esto se debe en parte a un aumento de la expresión de apoJ por parte de las células de la pared arterial, pero también probablemente a la filtración de las lipoproteínas del plasma. La apoJ muestra una distribución en la pared arterial similar a la de la apoA-I y apoE, lo que sugiere que la apoJ podría tener un papel protector en la arteriosclerosis favoreciendo el transporte de colesterol desde la pared arterial al hígado mediante la acción combinada de la apoJ y HDL que contienen apoA-I y apoE [105]. Esta posible acción protectora concuerda con estudios que han mostrado que la apoJ promueve el eflujo de colesterol de líneas celulares de macrófagos humanos THP-1 y U937 [106], lo que sugiere que la apoJ contribuye a remover el exceso de colesterol de las células espumosas en las lesiones arterioscleróticas.

Además, ya se ha comentado anteriormente que la concentración de apoJ está aumentada durante la fase temprana del infarto de miocardio [94], y se ha postulado que puede ser un importante agente citoprotector en cardiomiocitos isquémicos [107].

En un estudio *in vitro* con suero de ratón se ha descrito que la apoJ se une formando complejos a la leptina, una hormona producida por los adipocitos implicada en la regulación del peso corporal mediante el control del apetito. Estos complejos leptina/apoJ se han encontrado presentes tanto asociados a la HDL como en el suero sin lipoproteínas [108]. Esta unión sugirió que la apoJ podría actuar como un posible modulador de la acción de la leptina aunque posteriormente en un estudio en pacientes adolescentes obesos no se encontró correlación entre la apoJ y la leptina. [109]. Por otra parte, en otro estudio en pacientes con enfermedad coronaria, se ha mostrado una correlación negativa entre la apoJ y la leptina, de tal manera que

mientras que la apoJ aumenta en pacientes con estenosis coronaria la leptina disminuye, aunque el mecanismo de esta asociación se desconoce [110].

Se ha descrito una correlación positiva entre la concentración plasmática de apoJ y la de colesterol total y LDL [111]. Esta observación hace plantearse de qué manera se distribuye la apoJ entre las diferentes fracciones lipoproteicas.

### **6.1- ASOCIACIÓN DE LA apoJ A LIPOPROTEÍNAS**

Sin embargo, probablemente la principal función de la apoJ en el desarrollo de la arteriosclerosis está relacionada con su capacidad para modular la funcionalidad de las lipoproteínas. Una gran parte de la apoJ está presente en plasma en forma de complejos solubles constituidos únicamente por apoJ o asociada a proteínas como la albúmina, la leptina, el fibrinógeno o la ceruloplasmina, pero otra fracción importante se asocia a las lipoproteínas [112], siendo más abundante en la HDL [113]. Dentro de la HDL, se ha descrito una subclase (apoJ-HDL) de pequeño tamaño y pobre en lípidos, y que contiene apoA-I en un ratio constante de 5 moléculas de apoJ por apoA-I [114]. Durante bastante tiempo se consideró que, dentro de las lipoproteínas, la apoJ sólo se asociaba a la HDL, pero diversos análisis proteómicos han puesto de manifiesto que la apoJ también se encuentra asociada a la VLDL y la LDL, aunque en menor cantidad que en la HDL [60, 115-120]

#### ***6.1.1 Estudios en modelos animales***

En estudios *in vivo* con modelos animales se ha visto que la expresión de apoJ y paraoxonasa (PON), que es otra proteína asociada a la HDL, varían en función del grado de arteriosclerosis. Con arteriosclerosis avanzada el ratio apoJ/PON aumenta, lo que quiere decir que la apoJ aumenta cuando la PON disminuye.

Se ha especulado que el aumento de la expresión de apoJ puede constituir una reacción en condiciones patológicas para minimizar la progresión de la enfermedad.

La observación de que un ratio aumentado de apoJ/PON se correlaciona con una disminución de la actividad protectora de la HDL [121] concuerda con el consenso de que la PON contribuye de manera importante al efecto antioxidante de la HDL. En contrapartida, se considera que el aumento del contenido de apoJ asociada a la HDL en estos modelos animales es una respuesta fisiológica frente al desarrollo de arteriosclerosis.

La actividad beneficiosa de la apoJ se ha encontrado localizada en pequeños péptidos derivados de la secuencia madura de apoJ que forman hélices anfipáticas. Estos péptidos testados en experimentos *in vivo* mejoran el eflujo de colesterol de las células al plasma y las propiedades antiinflamatorias de la HDL [122, 123]

### **6.1.2 Estudios *in vitro* de asociación de apoJ a LDL**

Se ha descrito que la apoJ se une a la LDL modificada enzimáticamente (E-LDL), una forma de LDL modificada mediante colesterol esterasa y proteasas, caracterizada por un contenido muy elevado de ácidos grasos, un importante nivel de agregación y la exposición de dominios hidrofóbicos en su superficie. La E-LDL puede promover la formación de las células espumosas, es altamente inflamatoria y citotóxica y estimula la activación del complemento. Aunque la E-LDL se genera *in vitro*, análisis inmunohistológicos han puesto de manifiesto que depósitos que responden a las características de la E-LDL son abundantes en las lesiones arterioscleróticas [124].

La apoJ puede interferir con estos procesos aterogénicos por varias vías. Una sería la unión directa al factor C5b-9 del complemento inhibiéndolo su acción. La apoJ interactúa probablemente con la superficie hidrofóbica de los complejos C5b-9, previniendo su inserción en las bicapas lipídicas [125]. Otra posible vía sería uniéndose a la LDL modificada y protegiendo las células de los efectos citotóxicos de las lipoproteínas modificadas como la E-LDL [124]. La acción citotóxica de la E-LDL se observa a concentraciones de colesterol superiores a 100 µg/ml, que equivale al 10% de la LDL

presente en plasma. Los depósitos de E-LDL en la pared arterial lesionada son extensos y parece que estas concentraciones se alcanzan fácilmente en las lesiones arterioscleróticas.

### ***6.1.3 Estudios en pacientes con elevado riesgo cardiovascular***

Los estudios que relacionan la apoJ y la arteriosclerosis en pacientes con elevado riesgo cardiovascular son escasos. Trougakos et al fueron los primeros en describir que la concentración plasmática de apoJ está aumentada en pacientes con diabetes tipo 2 o con enfermedad coronaria [126].

Más tarde, se describió que la apoJ está aumentada en pacientes obesos, y se asocia positivamente con marcadores de inflamación como la PCR, la ferritina y el ácido úrico [102].

En cuanto a su contenido en las lipoproteínas, se ha descrito que la concentración de apoJ en la HDL se encuentra disminuida en pacientes con baja concentración de colesterol HDL, insulinoresistencia, obesidad y síndrome metabólico. Además se relaciona negativamente con la apoJ contenida en la LDL/VLDL. Existe una correlación directa entre la apoJ en las lipoproteínas que contienen apoB y la resistencia a la insulina, lo que se podría significar que en la resistencia a la insulina puede haber un intercambio de proteínas desde la HDL hacia la VLDL y LDL [127].

En pacientes con enfermedad coronaria se ha descrito que la HDL contiene menos apoJ y más apoC-III, mientras que en la fracción LDL/VLDL solo se observa el aumento en la concentración de apo C-III [128]. Esta alteración relativa del contenido de apoJ y apoC-III en la HDL produce una disminución del potencial anti-apoptótico en la HDL de pacientes con enfermedad coronaria.

Por otra parte, se ha visto que los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, que son beneficiosos en la prevención de la enfermedad cardiovascular, incrementan la concentración de apoJ en la HDL [129].

Se ha sugerido que la testosterona podría jugar un papel en promover la enfermedad cardiovascular, lo cual se apoya en los efectos de los esteroides sexuales en los lípidos plasmáticos. En pacientes en terapia de deprivación de andrógenos aumenta la concentración de colesterol HDL y la apoJ asociada a la HDL [130]. Esto concuerda con los estudios antes mencionados en los que una baja concentración de apoJ se asocia con enfermedad cardiovascular.

En cuanto al contenido de apoJ en la LDL solo hay dos estudios que lo analicen. El primero es un estudio con pacientes obesos y se muestra que las LDL de estos pacientes presentan una concentración aumentada de apoJ y apo CIII y disminuida la apo A-I [131]. El segundo estudio es en pacientes con diabetes tipo II y síndrome metabólico y describe que la apoJ está incrementada en las LDL con concentración aumentada de apoCIII y disminuida de colesterol total, características típicas de las LDL pequeñas y densas [132].









La apolipoproteína J es una chaperona extracelular que forma parte del sistema de control que actúa para estabilizar las proteínas agregadas y mediar su aclaramiento. Una fracción importante de la apoJ se asocia a las lipoproteínas en plasma, siendo más abundante en la HDL pero también hay una pequeña parte unida a la LDL y VLDL. Diversos estudios han descrito que el contenido de apoJ en la HDL de pacientes con alto riesgo cardiovascular se encuentra disminuido. También se ha descrito que la apoJ está aumentada en la LDL de pacientes con diabetes. Estas observaciones sugieren que probablemente la principal función de la apoJ en el desarrollo de la arteriosclerosis esté relacionada con su capacidad para modular la funcionalidad de las lipoproteínas. Sin embargo, su distribución exacta en cada lipoproteína no ha sido determinada con precisión, ni tampoco la proporción de apoJ que se encuentra asociada a las lipoproteínas o en forma libre.

Un aspecto que podría ser especialmente relevante es el papel que puede tener la apoJ que está unida a la LDL. Dado que la agregación de la LDL en la pared arterial es un proceso clave en el desarrollo de la arterioesclerosis y que la actividad chaperona de la apoJ regula la formación de agregados protéicos, se deduce fácilmente que la apoJ unida a la LDL podría tener un papel importante en el proceso de agregación y fusión de esta lipoproteína y, en consecuencia, podría modular la retención subendotelial de lipoproteínas.

Los objetivos que se han planteado en la presente Tesis Doctoral, agrupados en las dos publicaciones presentadas, son los que se exponen a continuación:

### **Publicación 1**

- 1- Determinar el contenido de apoJ en las subfracciones de LDL con mayor o menor aterogenicidad presentes en el plasma.

- 2- Comparar las características físico-químicas de la LDL que contiene apoJ con la LDL que no contiene.
- 3- Estudiar el papel que juega la apolipoproteína J en el proceso de agregación de la LDL.

### **Publicación 2**

- 4- Determinar la distribución de la apoJ en cada lipoproteína y en el suero libre de lipoproteínas.
- 5- Analizar el efecto del perfil lipoproteico en la distribución de la apoJ en las lipoproteínas.
- 6- Comparar la concentración en suero de apoJ y su distribución entre las lipoproteínas, entre sujetos normolipémicos e hiperlipémicos.

***MATERIAL Y MÉTODOS***



## 1. OBTENCIÓN DE LIPOPROTEÍNAS

### 1.1 AISLAMIENTO PREPARATIVO DE LDL A PARTIR DE UN POOL DE PLASMAS.

Este es el procedimiento que se ha utilizado en la primera parte de la tesis. Se recogieron plasmas de individuos normolipémicos en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante y se conservaron a -80°C. A partir de la mezcla de estos plasmas pueden aislarse las diferentes lipoproteínas basándose en su diferencia de densidades, de acuerdo con el siguiente rango: quilomicrones < 0,96 g/mL, VLDL 0,96-1,006 g/mL, IDL 1,006-1,019 g/mL, LDL 1,019-1,063 g/mL, Lp(a) 1,050-1,100 g/mL y HDL 1,063-1,210 g/mL. Con estas diferentes densidades se pueden separar las lipoproteínas utilizando un aislamiento secuencial mediante ultracentrifugación de flotación.

El plasma está a una densidad inicial de 1,006 g/mL, para llevarlo a la densidad deseada se añade la cantidad de KBr necesaria según la siguiente fórmula de Radding y Steinberg:

$$\text{Gramos KBr} = \frac{\text{Volumen (mL)} \cdot (\text{densidad final} - \text{densidad inicial})}{1 - (0,312 \times \text{densidad final})}$$

En nuestro caso, como queremos aislar la LDL trabajamos en un rango de densidad de 1,019-1,050 g/mL. Este rango se escogió para evitar contaminación con la Lp(a). En un primer paso se añade al plasma la cantidad necesaria de KBr para llegar a la densidad de 1,019 g/mL, se agita suavemente para evitar la agregación y se divide el volumen de plasma en tubos de policarbonato de pared rígida de 20 mL. Después se superpone a cada tubo una solución de la misma densidad, se equilibran los tubos por peso y se ponen en los rotores de ángulo fijo (TFT 70.38 o TFT 55.38, Kontron) para llevar a cabo la centrifugación a 100000 g (36000 rpm) durante 20 horas a 4°C.

Las lipoproteínas de densidad inferior a 1,019 g/ml (VLDL+IDL) flotan y quedan separadas del infranadante que contiene LDL, Lp(a) y HDL. Tras la aspiración de la fracción VLDL/IDL por aspiración, el infranadante se recoge en una probeta y se lleva al volumen que teníamos inicialmente de plasma total adicionando solución de densidad 1,019 g/mL. Para llevar el siguiente paso de este aislamiento secuencial necesitamos llevar el plasma a una densidad de 1,050 g/mL añadiendo la cantidad necesaria de KBr. Se vuelve a proceder igual que en el caso anterior y se someten los tubos a un proceso de ultracentrifugación a 36000 rpm durante 20 horas a 4°C.

La LDL flota tras la segunda ultracentrifugación y puede separarse por aspiración. Una vez aislada, se conserva a 4°C y se elimina el KBr dializándola en saco de diálisis con tampón A. Este tampón está compuesto de Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM (para prevenir la oxidación) a pH 7,4. Después de la diálisis se filtra la LDL por 0,2 µm para eliminar los agregados.

### **1.2 AISLAMIENTO DE LIPOPROTEINAS A PARTIR DE 1 ml DE PLASMA**

#### **Método KBr:**

Igual que en el apartado anterior basándose en las diferentes densidades de las lipoproteínas se pueden separar utilizando un aislamiento secuencial mediante ultracentrifugación de flotación.

Se utilizan tubos de ultracentrifuga de policarbonato de pared rígida de 2,5 ml en los que se coloca 1 ml de plasma. El primer paso es llevar el plasma que está a una densidad 1,006 g/mL a densidad 1,019, para ello utilizando la fórmula de Radding y Steinberg se calculan los gramos de KBr que se han de añadir. En vez de pesar el KBr, utilizamos las soluciones de densidad que están preparadas. Por tanto, se añaden 1,402 ml de solución 1,006 + 98 µl de solución 1,340, se agita suavemente y se pone en la ultracentrifuga a 36000 rpm durante 18 horas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

A continuación, se recogen por aspiración la VLDL que flota y después se recoge 1 ml del infranadante y se pasa a un tubo limpio de 2,5 ml. Para aislar la LDL, se lleva el plasma a una densidad de 1,063 g/ml añadiéndole 1,171 ml de solución 1,019 + 329  $\mu$ l de solución 1,340, se agita suavemente y se pone en la ultracentrifuga a 36000 rpm durante otras 18 horas.

La LDL flota tras la segunda ultracentrifugación y puede separarse por aspiración. Se recoge 1 ml del infranadante y se lleva a una densidad 1,210 añadiéndole 288  $\mu$ l de solución 1,063 + 1,212 ml de solución 1,340 y se vuelve a llevar a cabo la ultracentrifugación a 36000 rpm durante otras 18 horas.

Por último se recoge la HDL flotante por aspiración.

### **Método D<sub>2</sub>O/sacarosa:**

Utilizamos el método descrito por Stahlman [119] ligeramente modificado. Es similar al descrito para el KBr utilizando soluciones de densidad para llevar a la densidad necesaria para cada lipoproteína, pero en este caso las soluciones se preparan con D<sub>2</sub>O/sacarosa.

Ejemplos de cantidades necesarias para preparar las soluciones de densidad a partir de solución 1,006 y Buffer A que contiene D<sub>2</sub>O/sacarosa [119]:

Vol (Buffer A, d = 1.006)	Dr	Di (Buffer A)	Dh (Buffer C)	Vh (Buffer C)
10.0	1.019	1.006	1.325	0.425
10.0	1.063	1.006	1.325	2.176
10.0	1.210	1.006	1.325	17.739

La VLDL/IDL (densidad <1.019 g/mL) y LDL (densidad 1.019 - 1.063 g/mL) se obtienen después de 18h de ultracentrifugación a 45.000 rpm. La fracción de HDL (1.063 - 1.210 g/mL) se obtiene centrifugando 96h a 45.000 rpm.

Las siguiente tabla [119] presenta las cantidades de cada solución que se han de emplear para llegar a las diferentes densidades:

Vi (Vol Bottom Fraction)	Dr	Di (Bottom Fraction)	Dh (Buffer C)	Vh (Buffer C)	Vol to 1.00 ml (Equal Density)
	<i>ml</i>		<i>g/ml</i>		
0.500	1.019	1.006	1.325	0.021	0.479
0.500	1.063	1.019	1.325	0.084	0.416
0.400	1.210	1.063	1.325	0.511	0.089

Dh, density of the densest solution; Dr, density desired; Vh, volume to add of the densest solution; Vi, volume of the initial less-dense solution.

### **1.3 AISLAMIENTO DE LDL ELECTRONEGATIVA**

La LDL(-) se separa de la LDL nativa (LDL(+)) mediante cromatografía de intercambio aniónico usando la columna HiLoad 26/10 Q-Sepharosa High Performance (Amersham Biosciences) adaptada a cromatógrafo ÄKTA-FPLC (“ÄKTA-Fast Protein Liquid Chromaography”, GE Healthcare). La columna nos permite trabajar con volumen de muestra de hasta 50 mL en cada cromatografía.

Como tampón de unión a la columna se utiliza el tampón A que empleamos para la diálisis de la LDL (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 7,4) y como tampón de elución se usa el tampón B (Tris-HCl 10 mM, NaCl 1 M, EDTA 1 mM pH 7,4).

Primeramente hay que hacer un lavado de bombas y el equilibrado de la columna con tampón A, con un mínimo de dos volúmenes de columna. Después ya se puede cargar la muestra en el loop de 50 mL e inyectar en el cromatógrafo.

La separación de las dos fracciones de LDL en función de la carga se realiza utilizando un gradiente de sal escalonado que se detalla a continuación.

Volumen (mL)	% tampón B
0-120	0
120-163	0-10 (continuo)
163-269	26
269-374	60
374-480	100
480-507	0



Con este método cromatográfico se consiguen aislar las fracciones LDL(+) y LDL(-) las cuales eluyen en los escalones de 26% (0,26 M NaCl) y 60% (0,6 M NaCl), respectivamente. Después se concentran por centrifugación utilizando filtros de 10 kDa de tamaño de poro (Amicon, Millipore).

### **1.4 SEPARACIÓN DE FRACCIONES LDL AGREGADA Y NO AGREGADA**

La LDL(-) agregada (agLDL(-)) se separa de la fracción no agregada (nagLDL(-)) mediante cromatografía de gel filtración usando la columna Superosa 6 adaptada a cromatógrafo ÄKTA-FPLC (GE Healthcare). Utilizamos un loop de 2 ml, para inyectar dicho volumen de LDL en el cromatógrafo a un flujo de 0,5 ml/min. Como tampón se utiliza una mezcla de tampón A (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH=7,4) y tampón B (Tris-HCl 10 mM, NaCl 1 M, EDTA 1 mM pH=7,4) al 50%. La separación de las dos fracciones se produce por tamaño, primero eluye la agLDL(-) a los 8-10 ml y después la nagLDL(-) a los 10-16 ml. Se recogen fracciones de 1 ml en eppendorfs y después se concentran en filtros de 10 kDa de tamaño de poro (Amicon, Millipore).

### **1.5 SEPARACIÓN DE FRACCIONES LDL CON Y SIN APO J**

#### ***1.5.1 Preparación columna NHS con anticuerpo apoJ***

El anticuerpo anti-apoJ (PAI-26903; Thermo Scientific) se acopla a una columna HiTrap NHS (GE Healthcare) para después subfraccionar la LDL en la que contiene apoJ y la que no. La resina que usa esta columna es la NHS-activated Sepharose High Performance, diseñada para unir covalentemente ligandos que contengan grupos amino a través de del grupo reactivo N-hidroxisuccinamida (NHS) que se une a la agarosa. Usamos 100 µg de anticuerpo anti-apoJ y columnas HiTrap de 1 ml cada columna.

Se prepara el tampón de unión (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 M NaCl; pH 8,3) y se disuelve el anticuerpo en este tampón (en el volumen total de las columnas que usemos).

Las columnas están en isopropanol para prevenir la desactivación de los grupos NHS; cuando vayamos a empezar el procedimiento se quita el tapón de abajo y de arriba y se acopla un adaptador a la parte superior de la columna, con la ayuda de una jeringa se añade HCl 1 mM a un flujo muy lento (1/2 gota/segundo) para evitar burbujas.

Inmediatamente, se añade el anticuerpo disuelto en el tampón de enlace al mismo flujo, se tapa la columna por los dos extremos y la dejamos 30 min a 25°C.

Una vez que el anticuerpo se ha unido a la columna, se desactivan los grupos NHS activos que no se hayan unido al anticuerpo y se eliminan las uniones no específicas siguiendo el siguiente procedimiento:

Tampón 1: 0,5 M etanolamina, 0,5 NaCl pH 8,3

Tampón 2: 0,1 M acetato; 0,5 M NaCl pH 4

1. Inyectar 3x2 ml (por columna HiTrap de 1 ml) de Buffer 1
2. Inyectar 3x2 ml (por columna HiTrap de 1 ml) de Buffer 2
3. Inyectar 3x2 ml (por columna HiTrap de 1 ml) de Buffer 1
4. Dejar la columna tapada por ambos extremos 15-30 min a temperatura ambiente
5. Inyectar 3x2 ml (por columna HiTrap de 1 ml) de Buffer 2
6. Inyectar 3x2 ml (por columna HiTrap de 1 ml) de Buffer 1
7. Inyectar 3x2 ml (por columna HiTrap de 1 ml) de Buffer 2

Finalmente, se añaden 2 ml de tampón A (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH=7,4) por cada columna de 1 ml que utilizemos para ajustar el pH.

### ***1.5.2 Fraccionamiento LDL con y sin apoJ por cromatografía de afinidad***

La LDL que contiene apoJ (LDL/J(+)) se separa de la que no contiene apoJ (LDL/J(-)) mediante cromatografía de afinidad, para ello utilizamos la columna HiTrap NHS con el anticuerpo anti-apoJ preparada como se ha indicado previamente, y acoplada al cromatógrafo ÄKTA-FPLC (GE Healthcare). Utilizamos un loop de 2 ml, para inyectar

con jeringa dicho volumen de LDL en el cromatógrafo. Como tampón de unión a la columna se utiliza el tampón A (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH=7,4). Y como tampón de elución glicina 0,1 M pH 2,5. Se equilibra la columna en tampón A y a continuación inyectamos la LDL a un flujo de 3ml/min. Se recogen fracciones de 1 ml en eppendorfs. La LDL/J(+) se une al anticuerpo de la columna, mientras que la LDL/J(-) eluye al principio del cromatograma. La LDL/J(+) eluye con el tampón glicina ácido. Como la LDL es sensible al pH ácido, éste se neutraliza con 100 µl Tris 1 M a pH 9 añadido a cada uno de los tubos en que se recolecta la muestra. Después se concentran ambas fracciones utilizando filtros de 50 kDa de tamaño de poro (Amicon, Millipore).

## 2. CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEINAS

### 2.1 COMPOSICIÓN

La composición de la LDL y sus sufracciones se midió por métodos comerciales adaptados a un autoanalizador Cobas 6000/c501, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la determinación de colesterol total, triglicéridos, apoB y apo A-I se utilizaron reactivos de Roche Diagnostics, para determinar fosfolípidos, NEFAS) y colesterol libre reactivos de Wako Chemicals y para la apoE, apoC-II y apo A-II reactivos de Kamiya Biomedicals.

Cada determinación se basa en los siguientes principios:

- **Colesterol total:** primero actúa la colesterol esterasa que provoca la ruptura de los ésteres de colesterol. A continuación el enzima colesterol oxidasa induce la oxidación del colesterol, se forma  $H_2O_2$  que reacciona con la 4-aminoantipirina y el 4-fenol por acción de la peroxidasa. Se forma quinoneimina que es detectable a 505 nm.
- **Triglicéridos:** Se hidrolizan por acción de la triglicérido lipasa dando lugar a glicerol, que por la acción de la glicerol quinasa y la glicerol-3P-oxidasa se

oxida y da dihidroxiacetona fosfato y  $H_2O_2$ . Este último reacciona con la peroxidasa, al igual que en el colesterol total.

- **Fosfolípidos:** La reacción con la fosfolipasa D origina colina, que reacciona con colina oxidasa para dar betaína y  $H_2O_2$  que reacciona con la peroxidasa.
- **NEFAS:** Reacciona con la coenzima A y ATP, generándose acilCoA que reacciona con la acilCoA oxidasa dando  $H_2O_2$  que a su vez reacciona con la peroxidasa.
- **Apolipoproteínas:** reaccionan con anticuerpos específicos para cada apo, generándose agregados insolubles que aumentan la turbidez la cual se mide ópticamente.

### **2. 2 CUANTIFICACIÓN DE apoJ**

El contenido de apoJ se cuantificó por ELISA usando un kit comercial, Duo Set kit (Clusterin Duo Set, R&D) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se usan placas de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc).

#### **Preparación de la placa:**

- 1- Se diluye el anticuerpo de captura a  $2 \mu\text{g/ml}$  con PBS, y se añaden  $100 \mu\text{l}$  por pozo en la placa. Se incuba toda la noche a temperatura ambiente.
- 2- Se lava con  $400 \mu\text{l}$  de tampón de lavado cada pozo (0,05% Tween 20 en PBS pH 7,2-7,4) tres veces.
- 3- Se bloquea con  $300 \mu\text{l}$  de "Reagent Diluent" (1% BSA en PBS, pH 7,2-7,4 filtrado previamente por  $0,2 \mu\text{m}$ ). Se incuba a temperatura ambiente 1 hora como mínimo.
- 4- Repetir el lavado del paso 2.

#### **Ensayo:**

1. Añadir  $100 \mu\text{l}$  de muestra o estándar por pozo e incubar 2 horas a temperatura

ambiente. Estándares: Partimos del estándar del kit de 380 ng/mL de apoJ diluido en Reagent Diluent. A partir de esta concentración preparamos una curva de 7 puntos de concentraciones entre 8000 y 62,5 pg/mL de apoJ diluyendo en PBS, y un blanco. Las muestras de LDL a una concentración de 3 mM de colesterol las diluimos 1:500 con PBS.

2. Lavar con 400  $\mu$ l de tampón de lavado cada pozo (0,05% Tween 20 en PBS pH 7,2-7,4) tres veces.
3. Añadir 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección (anti apoJ biotinilado de ratón) diluido con "Reagent Diluent" hasta una concentración de 180  $\mu$ g/mL.
4. Lavar con 400  $\mu$ l de tampón de lavado cada pozo tres veces.
5. Añadir 100  $\mu$ l del conjugado streptavidina-HRP por pozo (dilución 1/200 del vial que viene con el kit) e incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar la exposición a la luz.
6. Lavar con 400  $\mu$ l de tampón de lavado cada pozo tres veces.
7. Añadir 100  $\mu$ l de sustrato (mezcla 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tetrametilbencidina) por pozo e incubar 20 minutos a temperatura ambiente, vigilando la coloración azul para que no se sature la reacción. Evitar la exposición a la luz.
8. Añadir 50  $\mu$ l de la disolución stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) a cada pozo.
9. Lectura de la placa a 450 nm, con corrección a 570 nm, en un lector de placas automático (Beckman Coulter AD 340)

Para los cálculos se resta la densidad óptica del blanco a todas las la densidades ópticas de muestras y estándares. Se transforman los datos en logarítmicos y se hace una regresión no lineal 4PL con los estándares. A partir de esta curva se calculan la concentración de las muestras teniendo en cuenta la dilución hecha.

## **2. 3 CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA**

### ***2.3.1 Electroforesis en gradiente de acrilamida (GGE)***

Para determinar el nivel de agregación se usan geles en gradiente de acrilamida del 2 al 16% en condiciones no desnaturalizantes (GGE) que permiten la separación de lipoproteínas por carga eléctrica en la primera parte del gel, y después por tamaño ya que el tamaño de poro de acrilamida es restrictivo.

#### **Preparación de los geles:**

Se usan dos soluciones de acrilamida del 2% y 16% que forman un gradiente continuo.

<b>Reactivo</b>	<b>Solución 16 %</b>	<b>Solución 2 %</b>
Solución acrilamida 40%	8 ml	1,25 ml
Sacarosa 50%	984 µl	250 µl
Tampón borato*	Hasta 20 ml	Hasta 25 ml
Azul de bromofenol	-	200 µl
Persulfato de amonio (APS) 10%	200 µl	100 µl
TEMED	6,7 µl	16,5 µl

\*Tampón Borato: Tris-HCl 9mM; EDTA 0,3 M; ácido bórico 8 mM; pH 8,3.

Con un sistemas de dos bombas peristálticas se consigue que las dos soluciones de mezclen de forma gradual, de manera que la parte superior del gel es del 2% de acrilamida, la inferior del 16% y entre ellas hay un gradiente de acrilamida creciente.

#### **Electroforesis:**

- Se preincuban 15 µl de muestra con 5 µl de negro sudán (0,1% peso/volumen en etilenglicol) y 5 µl de sacarosa (50% peso/volumen) durante 15 minutos.
- Se cargan las muestras en los pocillos del gel y se lleva a cabo la electroforesis a 100 V en tampón borato durante unas 5 horas, aunque al cabo de 1 h puede pararse para ver su movilidad por carga eléctrica.

### 2.3.2 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis con geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) permiten la separación de las proteínas de acuerdo a su tamaño, el SDS desnatura las proteínas y les confiere carga negativa uniforme, de manera que las proteínas de menor tamaño son las que más corren.

#### Preparación de los geles:

Los geles se diferencian en dos fases: la superior de concentración y la inferior de separación. La fase de concentración sirve para que las proteínas corran sin limitación de tamaño y se igualen, y la fase de separación tiene un mayor contenido en poliacrilamida por lo que las proteínas se van separando en función del tamaño.

Fase de separación al 10%	
Acrilamida-Bisacrilamida 40% Biorad	3,8 ml
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	3,75 ml
SDS 10 %	0,17 ml
H2O Milli-Q	7,17 ml
Tetrametiletilendiamida (TEMED)	10 µl
Persulfato de amonio (APS) al 10%	0,1 ml

Fase de apilamiento al 5%	
Acrilamida-Bisacrilamida 40% Biorad	0,625 ml
Tris-HCl 1M, pH 6,8	0,625 ml
SDS 10 %	50 µl
H2O Milli-Q	3,75 ml
TEMED	5 µl
Persulfato de amonio (APS) al 10%	25 µl

**Electroforesis:** Previamente, las muestras se mezclan con tampón Laemmli (BioRad) en proporción 1:1 volumen/volumen, que contiene glicerol para dar densidad, SDS para dar carga negativa uniforme y azul de bromofenol como colorante.

Después cargamos 20 µl de muestras en los pocillos de gel y corremos la electroforesis en el tampón tris glicina 15 minutos a 30 V para que la muestra se iguale

y entre en el gel, después se aumenta la corriente a 100 V hasta que el frente llegue al final del gel.

Tampón Tris-glicina: Tris 24 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1% pH 8,8

### **Tinción del gel:**

La tinción se realiza en Coomasie (PhastGel Blue, Pharmacia) o en nitrato de plata (Silver Stain Plus, BioRad) que es más sensible.

Coomasie: Se pone el gel en el colorante (azul de bromofenol 0,1%, metanol 40%, ácido acético 10% y H<sub>2</sub>O hasta 1 L) hasta que quede teñido (unos 30 minutos). Después se hacen sucesivos lavados con la solución decolorante (metanol 50%, ácido acético 10%, glicerol 1% y H<sub>2</sub>O hasta 1 L) hasta que se vean las bandas de proteína.

Nitrato de plata: Es un método de alta sensibilidad. Se utiliza el gel Silver Stain Plus de Bio-Rad. Todo el material utilizado ha de ser vidrio y se ha de lavar previamente con ácido nítrico al 50%. No se puede utilizar metal.

- Lo primero, hay que fijar el gel con la solución de fijación agitando suavemente 30 minutos. Si el gel está teñido previamente en Coomasie, nos saltamos este paso.

Solución de fijación: 50 ml metanol  
10 ml ácido acético  
10 ml concentrado de fijador  
30 ml agua destilada

- Después se decanta la solución y se lavan los geles con agua desionizada durante 10 minutos agitando suavemente, este proceso se repite dos veces.
- Se prepara la solución de tinción y solución de aceleración justo antes de usarlas y se mezclan.

Solución de tinción: 2,5 mL Silver Complex Solution  
2,5 mL Reduction Moderator Solution



	2,5 mL Image Development Reagent
	Se enrasa hasta 25 ml con agua
Solución de aceleración:	1,25 g Development Accelerator Solution
	Se enrasa hasta 25 ml con agua

Se mezclan estas dos soluciones y se añaden al gel. Se deja agitando hasta que se vean las bandas.

- Después se retira esta solución, y se añade la solución para detener la reacción (solución de stop, ácido acético al 5%) durante 15 minutos.
- Se quita la disolución de stop y lavamos extensamente con agua.

### **2.3.3 Transferencia electroforética**

Después de realizar la electroforesis en gel SDS que desnaturaliza las proteínas, estas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante carga eléctrica. Las proteínas se unen a la membrana de nitrocelulosa mediante interacciones hidrofóbicas, lo que permite su detección con anticuerpos.

#### **Procedimiento:**

- Se equilibra la membrana de nitrocelulosa, papel de filtro y esponjas en tampón de transferencia para favorecer el proceso.

Tampón de transferencia:	200 ml metanol
	400 ml tampón Tris-glicina con SDS (el mismo de la electroforesis en SDS)
	400 ml agua destilada

- Se coloca el gel con la membrana de nitrocelulosa cubiertas de papel de filtro y esponjas en un cassette y se mete dentro de la cámara de transferencia con el tampón de transferencia. Se corre 1 h y media a 30 V en frío.

### **2.3.4 Western Blot**

- Se saca la membrana del cassette y se bloquea con caseína al 0,1 % en TBS (50 mM

Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4) para evitar interacciones inespecíficas entre la membrana y el anticuerpo, ya que la caseína se une a la membrana en las zonas donde las proteínas no se han unido.

- Se incuba la membrana con el anticuerpo primario anti-apoJ (PAI-26903, Thermo Scientific) diluido 1/1000 en TBS con caseína al 0,1% hasta el día siguiente a 4°C (o 2 horas a 37°C).

- Se lava 3 veces con TTBS (TBS con 0,1% Tween 20).

- Incubación con anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con HRP (dilución 1:2000, Jackson Immuno Research) 2 horas.

- La membrana se revela con el kit Immune-Star™ HRP de Quimioluminiscencia (BioRad), este reactivo reacciona con la HRP del anticuerpo secundario y produce luminiscencia proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. La luminiscencia se capta en una cámara CCD (ChemiDoc, BioRad).

## **2. 4 MONITORIZACIÓN DE LA AGREGACIÓN**

### ***2.4.1 Inducción de la agregación de la LDL***

Se indujo la agregación de la LDL por diferentes mecanismos.

- Agregación espontánea: Las LDLs se igualan a una concentración de 2,5 mM de colesterol con tampón A y se les añade BHT 2  $\mu$ M para prevenir la oxidación. Se incuban a 37°C agitándose hasta 21 días.
- Agregación inducida por esfingomielinasa (SMasa): Las LDLs se igualan a una concentración de 2,5 mM de colesterol con tampón A, a continuación se dializan en columnas PD10 equilibradas en tampón SMasa, ya que el enzima SMasa necesita calcio para que se produzca la reacción. Se les añade BHT 2  $\mu$ M y SMasa (*Bacillus cereus* sp., Sigma) a una concentración final de 25 mU/ml y se incuba a 37°C durante 48 horas.

Tampón SMasa: Tris-HCl 10 mM, NaCl 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4.

- Agregación inducida por  $\alpha$ -quimiotripsina ( $\alpha$ -CT): Las LDLs se igualan a una concentración de 2,5 mM de colesterol con tampón A y se les añade BHT 2  $\mu$ M. Se incuban a 37°C durante 48 horas con  $\alpha$ -CT a una concentración final de 0,1 g/L, de esta manera el ratio molar LDL/ $\alpha$ -CT será 10/1.

### **2.4.2 Métodos para monitorizar la agregación**

**2.4.2.1 Absorbancia:** Se mide la absorbancia a 450 y 680 nm de 200  $\mu$ l de LDL a 2,5 mM de colesterol usando placas-UV de 96 pozos (Greiner) en un lector de placas (Biotek Synergy HT). La absorbancia a estas dos longitudes de onda es indicativa de agregación. A 450 nm la señal es más intensa, aunque a 680 nm es más específica de este proceso.

**2.4.2.2 Precipitación de lipoproteínas:** Se cogen 200  $\mu$ l de LDL a 2,5 mM de colesterol y se centrifugan a 15000 rpm durante 10 minutos. La porción de lipoproteína agregada precipita, se separa el sobrenadante y se mide el colesterol. Los resultados se expresan como porcentaje de colesterol no precipitado.

**2.4.2.3 Cromatografía de gel filtración (CGF):** Se lleva a cabo del mismo modo que el descrito en el apartado 1.3

**2.4.2.4 Electroforesis en gradiente de acrilamida (GGE):** Se lleva a cabo del mismo modo que el descrito en el apartado 2.2.1.

**2.4.2.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM):** Las LDLs se tiñen negativamente con fosfotungstato de potasio al 2% y pH 7 sobre rejillas de carbón. Se observan y fotografían las muestras en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 120-kV JEM-1400 con una cámara Erlangshen ES100 W CCD (Gatan, Abingdon, UK).

**2.4.2.6 Dicroísmo circular (CD):** Se analizaron las muestras de LDL a una concentración de 50 mg de proteína/L en PBS en una cubeta de cuarzo de 0,2 cm a 25°C. Se realizaron los espectros en un espectropolarímetro JASCO J-175 en la región del ultravioleta lejano (190-250 nm). Este método nos permite predecir el contenido de estructura secundaria de una proteína.

**2.4.2.7 ATR-FTIR:** Se analizaron muestras de LDL a una concentración de 0,04 mg/dl en PBS a temperatura ambiente. Para ello se transfieren 5 µl de muestra a una superficie de cristal de diamante y se seca al aire durante 10 minutos y a continuación se realizan los espectros de infrarojos en modo absorbancia (4000-400 cm<sup>-1</sup>) un espectrómetro Variant Resolutions Pro spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para cada medida se recogen 400 espectros y se resta el blanco.

### **3. AISLAMIENTO DE APOLIPOPROTEINA J.**

La apoJ se aísla a partir de suero libre de lipoproteínas (LPDS). Para ello se somete el suero a un proceso de ultracentrifugación a 36000 rpm, 18 horas ajustando a una densidad de 1,210 g/mL con KBr. De esta manera todas las lipoproteínas flotan mientras que el LPDS queda en la base del tubo. Una vez se tiene el LPDS, para aislar la apoJ se utilizan dos cromatografías en serie, primero con la columna Blue Sepharose y después con la NHS-apoJ.

#### **3.1 CROMATOGRAFÍA CON LA COLUMNA BLUE SEPHAROSA**

Utilizamos dos columnas HiTrap Blue Sepharosa de 5 ml conectadas en línea para eliminar el exceso de albúmina de las muestras de suero, ya que se une covalentemente a esta columna.

Se inyectan 2 ml de LPDS. Como tampón de unión se utiliza PBS a pH 6, ya que a pH ligeramente ácido la apoJ se encuentra en forma más monomérica. Como tampón de elución (B) se utiliza el tampón de unión con KCl 2M. La muestra se eluye a un flujo de 1 ml/min con el siguiente gradiente:

% tampón B	minutos
0-20	20
20-100	10
100	20
0	20

El primer pico del cromatograma, correspondiente al LPDS sin albúmina se concentra al volumen inicial y se dializa en PBS a pH 6.

### **3.2 CROMATOGRAFÍA CON LA COLUMNA NHS-apoJ**

A partir de la primera fracción obtenida en la cromatografía anterior, se aísla la apoJ mediante cromatografía de afinidad, utilizando la columna HiTrap NHS con el anticuerpo anti-apoJ preparada previamente (apartado 1.4.1) adaptada al cromatógrafo ÄKTA-FPLC (GE Healthcare). Inyectamos 1 ml de LPDS en cada cromatografía. Como tampón de unión a la columna se utiliza el tampón A (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 7,4). Y como tampón de elución glicina a pH 2,5. Se equilibra la columna en tampón A y a continuación inyectamos la LDL a un flujo de 1 ml/min. Todo el proceso se realiza como se ha indicado en el apartado 1.4.2.

### **3.3 COMPROBACIÓN DE LA PUREZA DE LA apoJ**

Se mide su concentración de proteína usando un método comercial (TPUC3, Roche diagnostics) adaptado al autoanalizador Cobas 6000/c501. Se determina su pureza mediante geles de SDS-PAGE (detallado en el apartado 2.3.2) y Western Blot (detallado en el apartado 2.3.4).









- 1) **Martínez-Bujidos, M.**, Rull, A., González-Cura, B., Pérez-Cuéllar, M., Montoliu-Gaya, L., Villegas, S., Ordóñez-Llanos, J., Sánchez-Quesada, J. L. Clusterin/apolipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation. *FASEB J.* 2015 May;29(5):1688-700.
  
- 2) Anna Rull<sup>1</sup>; **Maria Martínez-Bujidos**<sup>1</sup>; Montserrat Perez-Cuellar; Antonio Pérez; Jordi Ordoñez-Llanos; José Luis Sánchez-Quesada. Increased concentration of clusterin/apolipoprotein J (apoJ) in hyperlipemic serum is paradoxically associated with decreased apoJ content in lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2015 Jun 6;241(2):463-470

<sup>1</sup> contributed equally to the work, and both should be considered as first authors.



# Clusterin/apolipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation

Maria Martínez-Bujidos,<sup>\*,†,1</sup> Anna Rull,<sup>\*,†,1</sup> Beatriz González-Cura,<sup>\*,†,1</sup> Montserrat Pérez-Cuéllar,<sup>\*</sup> Laia Montoliu-Gaya,<sup>‡</sup> Sandra Villegas,<sup>‡</sup> Jordi Ordóñez-Llanos,<sup>\*,†</sup> and José Luis Sánchez-Quesada<sup>\*,2</sup>

\*Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain; <sup>†</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola, Spain; and <sup>‡</sup>Protein Folding and Stability Group, Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola, Spain

**ABSTRACT** Clusterin/apolipoprotein J (apoJ) is an extracellular chaperone involved in the quality control system against protein aggregation. A minor part of apoJ is transported in blood bound to LDLs, but its function is unknown. Our aim was to determine the role of apoJ bound to LDLs. Total LDL from human plasma was fractionated into native LDL [LDL(+)] and electronegative LDL [LDL(-)]. The latter was separated into non-aggregated [nagLDL(-)] and aggregated LDL(-) [agLDL(-)]. The content of apoJ was 6-fold higher in LDL(-) than in LDL(+) and 7-fold higher in agLDL(-) than in nagLDL(-). The proportion of LDL particles containing apoJ (LDL/J+) was 3-fold lower in LDL(+) than in LDL(-). LDL/J+ particles shared several characteristics with agLDL(-), including increased negative charge and aggregation. apoJ-depleted particles (LDL/J-) showed increased susceptibility to aggregation, whether spontaneous or induced by proteolysis or lipolysis, as was revealed by turbidimetric analysis, gel filtration chromatography, lipoprotein precipitation, native gradient gel electrophoresis, circular dichroism, and transmission electronic microscopy. The addition of purified apoJ to total LDL also prevented its aggregation induced by proteolysis or lipolysis. These findings point to apoJ as a key modulator of LDL aggregation and reveal a putative new therapeutic strategy against atherosclerosis.—Martínez-Bujidos, M., Rull, A., González-Cura, B., Pérez-Cuéllar, M., Montoliu-Gaya, L., Villegas, S., Ordóñez-Llanos, J., Sánchez-Quesada, J. L. Clusterin/apolipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation. *FASEB J.* 29, 1688–1700 (2015). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

**Key Words:** chaperones • electronegative LDL • atherosclerosis

Abbreviations:  $\alpha$ -CT,  $\alpha$ -chymotrypsin; agLDL(-), aggregated LDL(-); apo, apolipoprotein; ATR-FTIR, attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy; BHT, butylated hydroxytoluene; CD, circular dichroism; CVR, cardiovascular risk; E-LDL, enzymatically modified LDL; GFC, gel filtration chromatography; GGE, nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis; HRP, horseradish peroxidase; IR, infrared; LDL(-), electronegative LDL; (continued on next page)

CLUSTERIN/APOLIPOPROTEIN J (apoJ) is an extracellular chaperone that binds in a noncovalent manner to abnormally folded proteins to prevent both amorphous and amyloid protein aggregation (1–3). apoJ expression increases during various physiologic and pathologic stresses as it forms part of a quality control system against protein unfolding (4). It has been involved in pathologic processes including aging, cancer, diabetes, kidney disease, and Alzheimer's disease. Regarding its relationship with cardiovascular disease, apoJ is abundantly expressed in atherosclerotic lesions compared with normal arteries (5), but its specific function in the arterial wall is unknown. apoJ is thought to be transported in blood as active dimers or as inactive oligomers (3) and binds to some client proteins such as albumin, fibrinogen, or ceruloplasmin under stress conditions (6). However, a substantial part of apoJ is also carried by lipoproteins, mainly by HDLs (7). The function of apoJ in HDLs seems to be related to the stabilization of apoA-I, paraoxonase 1, and other proteins, maintaining the antiatherogenic properties of HDLs (8, 9). Studies conducted in animal models have shown that a decreased content of apoJ in HDLs induces a loss of its antiatherogenic functions (10). Studies in humans are scarce, but recent findings have shown a decreased content of apoJ in HDLs from subjects with a high cardiovascular risk (CVR), such as patients with diabetes, obesity, dyslipoproteinemia, or coronary artery disease (11, 12). The decrease of apoJ in HDLs from coronary artery disease patients has been shown to promote a loss of its antiapoptotic ability (12).

Although it was initially considered that apoJ was only present in HDLs when bound to lipoproteins, recent proteomic analyses revealed that it is also bound to LDLs and very LDLs (13–18). Considering that LDL aggregation is

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Correspondence: Cardiovascular Biochemistry Group, Research Institute of the Hospital de Sant Pau (IIB Sant Pau), C/ Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain; E-mail: [jsanchezq@santpau.cat](mailto:jsanchezq@santpau.cat)

doi: 10.1096/fj.14-264036

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

the key event triggering the development of atherosclerosis (19) and that the physiologic function of apoJ is avoiding protein aggregation, apoJ could play a relevant role in atherogenesis. However, studies on the relationship between apoJ and very LDLs or LDLs are scarce, and the role of apoJ in these lipoproteins is virtually unknown. Pettersson *et al.* described that, in diabetic patients, the content of apoJ is increased in small dense LDLs (20), an atherogenic form of LDLs related with high CVR. Schwarz *et al.* reported that apoJ binds to LDLs treated with cholesteryl esterase and plasmin [enzymatically modified LDLs (E-LDLs)] (21), inhibiting its cytotoxic capacity. Our group previously described that apoJ associates preferentially to electro-negative LDL [LDL(-)] (22), a subfraction of modified LDLs present in blood with inflammatory properties, whose proportion is increased in high CVR patients (23). One of the most remarkable characteristics of LDL(-) is a high susceptibility to aggregation, probably due to the misfolding of apoB-100, its main apolipoprotein (24). In fact, a minor fraction of LDL(-), accounting for 0.2–1% of total LDLs, is already aggregated in plasma (25), and among other atherogenic characteristics, it binds with a higher affinity to arterial proteoglycans (26). Binding of LDLs to proteoglycans is considered the initial event in atherogenesis (19), and LDL aggregation is the process that triggers such binding (27, 28). Because of the role of apoJ in controlling the formation of protein aggregates, we hypothesized that the aggregated subfraction of LDL(-) present in blood could contain an increased amount of apoJ. Furthermore, our aim was to analyze the role of apoJ in the aggregation process of LDLs. For this purpose, the effect on susceptibility to aggregation of both depletion and addition of apoJ on LDLs was analyzed under different experimental conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Lipoprotein isolation and fractionation

Total LDL was isolated from pooled plasma of healthy normolipemic volunteers by sequential ultracentrifugation (density range, 1.019–1.050 g/ml), using KBr gradients. It has been reported that KBr gradients could promote the loss of apolipoproteins during lipoprotein isolation because of their high ionic strength. However, using 2D electrophoresis and surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, Stallman *et al.* (17) reported that the intensity of the spots corresponding to apoJ in 2D electrophoresis was similar in LDLs isolated by the KBr method and LDLs isolated by the deuterium/sucrose method, the latter being a more gentle method. The study was approved by the institutional ethics committee, and all volunteers gave informed consent. Volunteers were between 25 and 58 years of age, and the male/female ratio was ~1/1. Cholesterol and triglycerides were measured in all plasmas to ensure that the samples were normolipemic. Only

(continued from previous page)

LDL(+), native LDL; LDL/J-, apolipoprotein J-depleted LDL; LDL/J+, apolipoprotein J-containing LDL; LPDS, lipoprotein-deficient serum; nagLDL(-), nonaggregated LDL(-); NEFA, nonesterified fatty acid; SMase, sphingomyelinase; TBS, buffer containing 50 mM Tris and 500 mM NaCl; TEM, transmission electron microscopy; TTBS, TBS buffer with 0.1% Tween 20

plasmas with cholesterol levels <5.5 mM and triglyceride levels <1.5 mM were selected. Each pool (180–250 ml) contained plasma from 35 to 50 individuals. All density solutions contained 1 mM EDTA and 2  $\mu$ M butylated hydroxytoluene (BHT), and ultracentrifugation steps were performed at 4°C to avoid lipoperoxidation. Total LDL was dialyzed against buffer A (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) and subfractionated in native LDL [LDL(+)] and LDL(-) by stepwise anion-exchange chromatography using a Hi-Load 26/10 Q-Sepharose column (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA), as previously described (29). To separate aggregated [agLDL(-)] and nonaggregated [nagLDL(-)] fractions, LDL(-) was subjected to gel filtration chromatography (GFC) in 2 online connected Superose 6 columns in an AKTA-FPLC system (GE Healthcare), as previously reported (25). The separation of LDL fractions containing (LDL/J+) or not containing (LDL/J-) apoJ was performed in an AKTA-FPLC chromatograph using HiTrap NHS-activated columns (GE Healthcare), to which the polyclonal antibody anti-apoJ (PAI-26903; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was previously coupled, according to the manufacturer's instructions. Two milliliters of LDL in buffer A was injected in the 5 ml apoJ-coupled HiTrap column at a flow of 1 ml/min. The bound fraction (apoJ-containing LDLs) was eluted with buffer 0.1 M glycine, pH 2.5, and 1 ml aliquots were collected in tubes containing 0.1 ml of 1 M Tris, pH 9.0, to neutralize the acidic pH of glycine buffer. After chromatography, all LDL subfractions were concentrated using centrifugal filters (Amicon; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) with a cutoff of 50 kDa, and the content of cholesterol was measured in each fraction.

### Characterization of LDL subfractions

#### Composition

The composition of LDL subfractions was measured by commercial methods adapted to a Cobas 6000/c501 autoanalyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Total cholesterol, triglycerides, apoB and apoA-I reagents were obtained from Roche Diagnostics. Phospholipids, nonesterified fatty acids (NEFAs), and free cholesterol reagents were obtained from Wako Pure Chemicals (Tokyo Japan). apoE, apoC-II, apoC-III, and apoA-II reagents were obtained from Kamiya Biomedical (Seattle, WA, USA).

#### ELISA

The content of apoJ was quantified by ELISA using a Duo Set kit (Clusterin Duo Set; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. LDLs at 0.4 mg/ml apoB were diluted 1:500 in PBS.

#### SDS-PAGE and Western blot

apoJ was also detected by Western blot after electrophoresis of LDL subfractions in 10% SDS-PAGE gels and transference to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 30 minutes in TBS buffer (50 mM Tris and 500 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% casein, washed 2 times with TTBS (TBS containing 0.1% Tween 20), incubated for 2 hours with the polyclonal antibody anti-apoJ (PAI-26903; Thermo Scientific) diluted 1/1000 in TBS containing 0.1% casein, washed 5 times with TTBS, and incubated for 2 hours with secondary anti-goat horseradish peroxidase (HRP) antibody (dilution 1/5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

#### GGE

The basal level of aggregation was determined by GGE (2–16%) after 6 hours of electrophoresis at 100 V, as previously

described (30). GGE at 1 hour of electrophoresis was also used to evaluate the electric charge of LDLs.

### TEM

TEM was performed as previously described (25). Briefly, LDLs were absorbed and processed for negative staining with 2% potassium phosphotungstate, pH 7.0, over carbon-coated grids. Micrographs were obtained using a Jeol 120-kV JEM-1400 transmission electron microscope, with an Erlangshen ES1000W CCD camera (Gatan, Abingdon, United Kingdom).

### Spectroscopic analysis

Circular dichroism (CD) spectra were obtained using 40  $\mu\text{g}$  of apoB/L in PBS in a JASCO J-715 spectropolarimeter in the far-UV region (190–260 nm) as previously described (31). A 0.2 cm quartz cuvette was used, and the temperature was maintained at 25°C. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra were obtained by analyzing LDLs at 0.04 mg/ml in PBS at room temperature. Five microliter samples were transferred onto the diamond crystal surface area and air dried for 10 minutes before infrared (IR) spectra were acquired in absorbance mode (mid-IR source, 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ) on a Varian Resolutions Pro spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Four hundred spectra were averaged for each measurement, and the buffer blank was subtracted (32). The amide I region (1700–1600  $\text{cm}^{-1}$ ) arising mainly from the C = O stretching vibration of the peptide bond was used to obtain information about protein conformation.

### Induction of LDL aggregation

#### Spontaneous aggregation

Total LDL and LDL/J– (0.4 mg/ml apoB) in buffer A containing 2  $\mu\text{M}$  BHT were incubated at 37°C and gently agitated for up to 21 days without any external aggregation stimuli.

#### Aggregation induced by sphingomyelinase

LDL (0.4 mg/ml apoB) in PBS containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 2  $\mu\text{M}$  BHT was incubated at 37°C for 24 h with sphingomyelinase (SMase; from *Bacillus cereus* sp.; final concentration, 25 mU/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### Aggregation induced by $\alpha$ -chymotrypsin

LDL (0.4 mg/ml apoB) in buffer A containing 2  $\mu\text{M}$  BHT was incubated at 37°C for 24 hours with  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -CT) (final concentration, 0.1 mg/ml). Molar ratio was LDL/ $\alpha$ -CT = 10/1.

### Methods for monitoring aggregation

#### Turbidity

Sample turbidity was determined by measuring absorbance at 450 nm of 200  $\mu\text{l}$  of LDLs (0.5 mg/ml apoB, which corresponds to ~3 mM cholesterol) in a microplate reader using 96-well UV microplates.

#### Lipoprotein precipitation

Aggregated lipoproteins (100  $\mu\text{l}$  at 0.4 mg/ml apoB) were precipitated by centrifugation at 15,000 rpm, at 10°C for 10 minutes.

The upper phase was separated from the pellet, and the cholesterol content was measured. Data are expressed as the percentage of cholesterol recovered in the supernatant.

### Other analysis

GFC, GGE, and TEM were performed as described in previous paragraphs, except for GFC, which was performed using only 1 Superose 6 column (29).

### apoJ isolation

apoJ was isolated from lipoprotein-deficient serum (LPDS). Serum was initially depleted of lipoproteins by flotation ultracentrifugation at 36,000 rpm for 48 hours, adjusting serum at a density of 1.210 g/ml with KBr. The infranatant LPDS was dialyzed against PBS and subjected to albumin depletion by affinity chromatography using 2 5-ml HiTrap Blue Sepharose columns (GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, USA) connected online. Two 2-ml aliquots of LPDS were injected, and the next gradient was developed: 0–20% buffer B for 20 minutes, 20–100% buffer B for 10 minutes, continuous 100% buffer B for 20 minutes, and continuous 0% buffer B for 20 minutes, as shown in Supplemental Fig. S4. Buffer A was PBS, pH 6.0; buffer B was PBS, pH 6.0, containing 2 M KCl. The flow rate was 0.2 ml/min for the first 15 minutes to facilitate the binding of albumin and other proteins (coagulation factors, interferon) to the column; for the rest of the chromatogram, the flow rate was 1 ml/min. The first peak corresponding to LPDS depleted of albumin was concentrated to the initial volume. Aliquots of 1 ml were injected in the HiTrap NHS column (GE Healthcare Life Sciences), coupled with the antibody anti-apoJ, as described above. The flow rate was maintained at 0.2 ml/min for 5 ml to facilitate the binding of apoJ to the column, and the rest of the chromatogram was performed at 1 ml/min. apoJ was eluted with 50 mM glycine buffer, pH 2.9, and collected fractions were neutralized with 10% buffer 1 M Tris, pH 9.0. apoJ was concentrated with Amicon (10-kDa cutoff) centrifugal filters (EMD Millipore), and its purity was assessed by SDS-PAGE and Western blot. The concentration of apoJ was measured using a highly sensitivity commercial method (TPUC3; Roche Diagnostics) adapted to a Cobas 6000/c501 autoanalyzer. Supplemental Fig. S1 shows SDS-PAGE and Western blot analysis confirming the high purity of isolated apoJ (>90%, calculated from densitometric analysis of Coomassie-stained gels). Western blot shows that most of the apoJ purified under our isolation conditions is in the form of high-molecular-weight oligomers. It is been reported that apoJ is present as a heterodimer (~80 kDa) at mild acidic pH but tends to form oligomers at neutral pH (33).

### Effect of added apoJ on LDL aggregation

Purified apoJ (1 and 10  $\mu\text{g}$ ) was added to LDLs (0.5 mg apoB, final volume 1 ml) simultaneously with the induction of aggregation by the 3 methods described above. The final mass ratios of apoJ/apoB were 1/500 and 1/50, respectively (molar ratios were 1/70 and 1/7). LDL aggregation was promoted with SMase or  $\alpha$ -CT in the same conditions described above, and the process was monitored by measuring the absorbance at 450 nm, GGE, and GFC.

### Statistical analysis

Results were expressed as means  $\pm$  SD or as means  $\pm$  SEM when indicated. Statistically significant data were assessed by unpaired

(Mann-Whitney) or paired (Wilcoxon) nonparametric tests, when appropriate.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

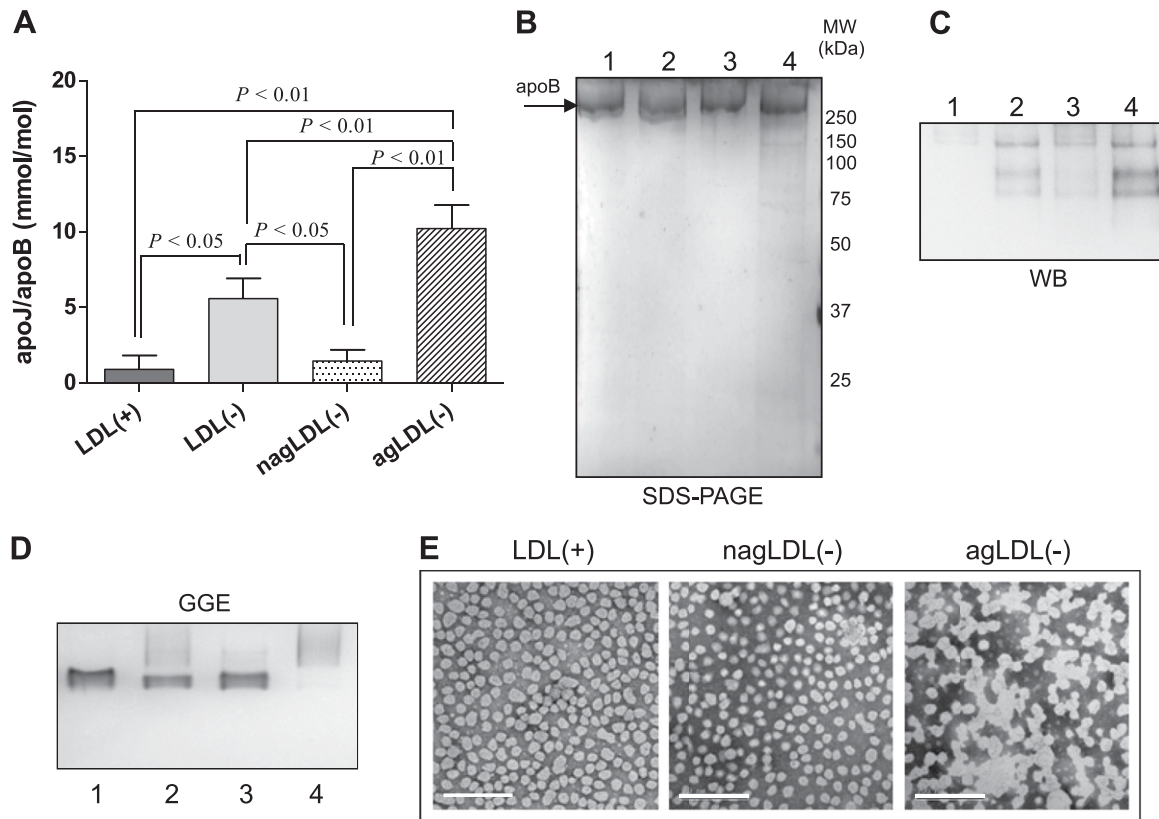
### Content of apoJ in LDL subfractions

**Figure 1A** shows the content of apoJ in LDL(+), LDL(-), nagLDL(-), and agLDL(-) measured by ELISA. In agreement with previous reports, our data indicate that total LDL(-) contains 6-fold more apoJ than LDL(+), and such content was 7-fold higher in agLDL(-) than in the nagLDL(-). Western blot analysis confirmed the increased content of apoJ in agLDL(-) compared with LDL(+), total LDL(-), or nagLDL(-) (Fig. 1C). The 75 and 85 kDa bands possibly correspond to the heterodimer (having different degrees of glycosylation depending on the tissue of origin) and the upper band to 2 heterodimers. SDS-PAGE showed a slight degradation of apoB in agLDL(-) but not in nagLDL(-) or LDL(+). Fig. 1D (GGE) and E (TEM micrographs) shows that, as expected, agLDL(-) presented abundant LDL aggregates, whereas LDL(+) and nagLDL(-) displayed a clear predominance of monomeric LDL particles.

ELISA data in Fig. 1A indicated a very low content of apoJ in all LDL subfractions. This finding was confirmed by affinity chromatography using an anti-apoJ antibody attached to a HiTrap HNS column (Supplemental Fig. S1A). The proportion of LDL containing apoJ was calculated separating these particles (LDL/J+) from those not containing apoJ (LDL/J-) and measuring the recovery of cholesterol in each fraction. The proportion of LDL particles containing apoJ was  $<0.3\%$  in all the performed experiments. However, the proportion of LDL/J+ was higher in LDL(-) than in LDL(+) ( $0.24 \pm 0.05\%$  versus  $0.08 \pm 0.04\%$ , respectively,  $n = 8$ ,  $P = 0.015$ ; Supplemental Fig. S1B). This observation agrees with the lower content of apoJ in LDL(+) than in the LDL(-) particles (Fig. 1A).

### Physicochemical characteristics of LDL fractions containing or not containing apoJ

ELISA (Fig. 2A) and Western blot (Fig. 2C) analyses confirmed that the content of apoJ was higher in LDL/J+ than in LDL/J-. SDS-PAGE showed that apoB in LDL/J+ presented partial degradation, in contrast with total LDL or LDL/J-, whose apoB was essentially intact (Fig. 2B). GGE



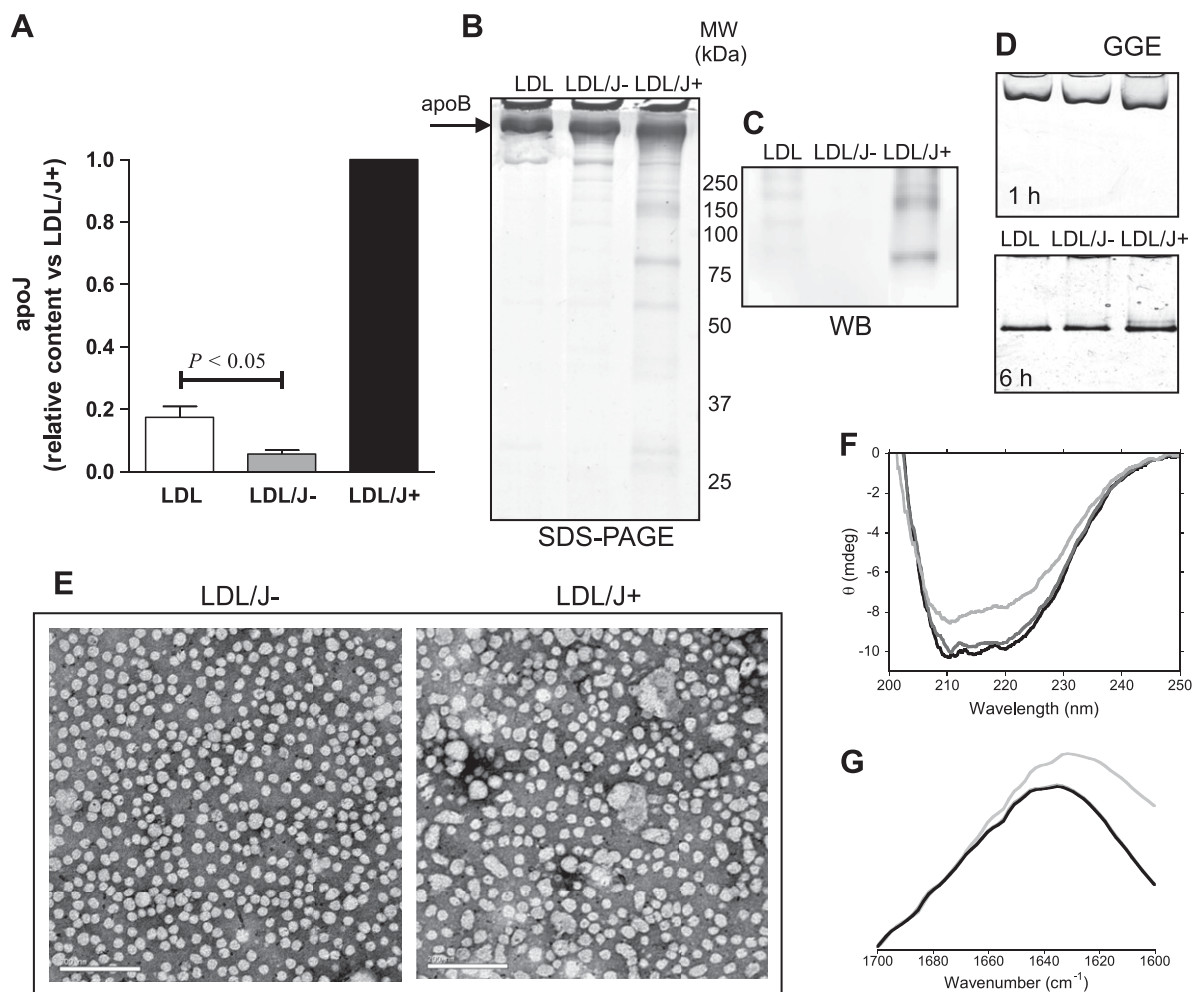
**Figure 1.** Content of apoJ in LDL subfractions. **A)** The content of apoJ in LDL subfractions was determined by ELISA and expressed as mol apoJ/mol apoB. Data are the mean  $\pm$  SEM of 12 independent samples for LDL(+) and LDL(-) and 9 independent samples for nagLDL(-) and agLDL(-). **B)** SDS-PAGE. LDLs (5  $\mu$ g/well) were electrophoresed in 10% acrylamide gels under nonreducing conditions. 1, LDL(+); 2, LDL(-); 3, nagLDL(-); 4, agLDL(-). The same numeration is used for **C** and **D**. MW, molecular weight standard (Kaleidoscope; BioRad). Black arrow indicates apoB-100. **C)** Western blot analysis. Proteins were transferred from SDS-PAGE gels to nitrocellulose membranes for 1 hour at 30 V. Membranes were revealed with antibody against apoJ (1/500) and secondary HRP-conjugated antibody (1/2000). **D)** GGE. LDLs (5  $\mu$ g/well) were electrophoresed in 2–16% acrylamide native gradient gels. LDLs were prestained with 1% Sudan black. **E)** TEM was performed in a Jeol 120 kV JEM-1400 microscope, as described in Materials and Methods. White bars, 200 nm.



at 1 hour of electrophoresis, when the mobility of LDL particles depends mainly on its electric charge, indicated higher electronegativity of LDL/J+ than LDL/J- (Fig. 2D, upper). At 6 h of electrophoresis, when the mobility of LDL particles depends mainly on size, LDL/J+ showed 2 bands: the upper corresponding to aggregated LDL and the lower corresponding to monomeric LDL particles (Fig. 2D, lower). TEM micrographs show that LDL/J- displayed a homogeneous pattern of particles with a similar size. In contrast, LDL/J+ was heterogeneous in size and included aggregated particles, although monomeric LDL particles were still the most abundant (Fig. 2E). The CD spectra

showed that secondary structure was similar between total LDL and LDL/J-, whereas the LDL/J+ CD spectra indicated a general loss of signal, compatible with some aggregation in the later (Fig. 2F). The occurrence of aggregation was further confirmed by ATR-FTIR, where the center of the spectra moves from 1637 to 1631  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 2G).

Regarding LDL composition, **Table 1** compares lipid and protein components of LDL/J- and LDL/J+ sub-fractions with those of total LDL. As expected, the composition of total LDL and LDL/J- was very similar. In contrast, LDL/J+ had less esterified cholesterol and



**Figure 2.** Characteristics of LDL/J- and LDL/J+ LDL particles. Both fractions were separated according to the affinity chromatography shown in Supplemental Fig. S1A. **A)** The content of apoJ was determined by ELISA and is expressed as arbitrary units relative to LDL/J+ (arbitrary value of 1). Data are the mean  $\pm$  SEM of 10 independent samples. **B)** SDS-PAGE shows bands of apolipoproteins stained with Coomassie brilliant blue. LDLs (5  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) were electrophoresed in 10% acrylamide gels under nonreducing conditions. MW, molecular weight standard (Kaleidoscope; BioRad). Black arrow indicates apoB-100. **C)** Western blot analysis. Proteins were transferred from SDS-PAGE gels to nitrocellulose membranes and were revealed with antibody against apoJ (1/500) and secondary HRP-conjugated antibody (1/2000). **D)** GGE shows the mobility of the whole lipoprotein particle, stained with the lipid-specific stain Sudan black. LDLs (5  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) were electrophoresed in 2–16% acrylamide native gradient gels for 1 hour at 100 V in a cold room. Electrophoresis was stopped, the gel was scanned, and electrophoresis was then continued for a further 5 hours. LDLs were prestained with 1% Sudan black. **E)** TEM was performed in a Jeol 120 kV JEM-1400 microscope, as described in Materials and Methods. White bars, 200 nm. **F)** CD spectra of total LDL (black line), LDL/J- (dark gray line), and LDL/J+ (light gray line). One hundred microliters of LDLs at 0.05 mg/ml in PBS was analyzed at 25°C in a JASCO J-715 spectropolarimeter in the far-UV region (190–250 nm). **G)** Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) spectra of total LDL (black line), LDL/J- (dark gray line), and LDL/J+ (light gray line). LDLs at 0.05 mg/ml in PBS were analyzed at room temperature on a Variant Resolutions Pro spectrometer in the amide I region (1700–1600  $\text{cm}^{-1}$ ).

TABLE 1. *Composition of LDL subfractions containing or not containing apoJ*

LDL composition	Total LDL	LDL/apoJ <sup>-</sup>	LDL/apoJ <sup>+</sup>
Major components <sup>a</sup>			
Total cholesterol	37.8 ± 3.1	37.3 ± 2.1	36.0 ± 6.4
Esterified cholesterol	26.8 ± 3.9	26.9 ± 3.3	20.4 ± 7.5 <sup>b</sup>
Free cholesterol	11.0 ± 1.8	10.7 ± 1.8	15.6 ± 2.7 <sup>b</sup>
Triglyceride	10.5 ± 3.9	10.1 ± 3.3	12.3 ± 3.3 <sup>b</sup>
Phospholipids	24.4 ± 3.2	24.4 ± 2.7	23.6 ± 1.4
apoB	27.2 ± 2.1	28.2 ± 2.2	28.1 ± 8.0
Minor components <sup>c</sup>			
NEFA	15.0 ± 11.1	16.8 ± 13.0	50.6 ± 28.7 <sup>b</sup>
apoA-I	0.205 ± 0.279	0.103 ± 0.075	0.570 ± 0.265 <sup>b</sup>
apoA-II	0.162 ± 0.279	0.112 ± 0.163	0.252 ± 0.339
apoE	0.171 ± 0.050	0.141 ± 0.033	0.270 ± 0.080 <sup>b</sup>
apoC-III	0.207 ± 0.059	0.146 ± 0.035	0.152 ± 0.039
apoC-II	0.088 ± 0.032	0.067 ± 0.029	0.103 ± 0.042

<sup>a</sup>Expressed as percent of the particle total mass. Data are mean ± sd of 10 independent experiments.

<sup>b</sup>Statistically significant differences *vs.* total LDL and LDL/apoJ<sup>-</sup>. <sup>c</sup>Expressed as mol/mol apoB. Data are means ± sd of 5 independent experiments.

a higher content of free cholesterol, triglycerides, NEFA, and apoE than total LDL.

Because of the very low amount of LDL/J<sup>+</sup>, we were unable to analyze its chromatographic profiles by anion-exchange chromatography or GFC to corroborate increased negative electric charge and increased aggregation. However, both analyses were performed in total LDL and LDL/J<sup>-</sup> (Supplemental Fig. S2). The 2 LDLs essentially presented the same chromatographic profiles regarding electric charge (anion-exchange chromatography) and presence of aggregates (GFC).

### Susceptibility to aggregation of apoJ-depleted LDL

The very low amount of LDL/J<sup>+</sup> did not allow analysis of its susceptibility to aggregation. However, both total LDL and LDL/J<sup>-</sup> essentially presented the same composition and characteristics, including a similar proportion of LDL(-) and aggregated LDL (Supplemental Fig. S2). Hence, we assumed that the only difference between total LDL and LDL/J<sup>-</sup> was the lower content of apoJ in the latter. This prompted us to analyze the specific role of apoJ in LDL particles by comparing the behavior against induced-aggregation of LDL/J<sup>-</sup> and total LDL.

#### *Spontaneous aggregation*

In the first set of experiments, LDLs were induced to spontaneous aggregation by incubation at 37°C in gentle agitation in the presence of EDTA and BHT to prevent oxidation. Supplemental Fig. S3 shows an experiment measuring the increment of absorbance at 450 nm and the precipitation of cholesterol throughout the period of incubation. Turbidity remained stable up to days 11–12 and then rapidly increased. This increase was faster in LDL/J<sup>-</sup> than in total LDL (Supplemental Fig. S3A). Precipitation of the cholesterol method showed a similar pattern, with LDL/J<sup>-</sup> presenting increased propensity to cholesterol precipitation (Supplemental Fig. S3B). However, although

LDL/J<sup>-</sup> proved to be more susceptible to aggregation than total LDL in all the performed experiments ( $n = 4$ ), the response of LDLs was heterogeneous among batches, with the period to detect evident aggregation ranging from 5 days to 3 weeks.

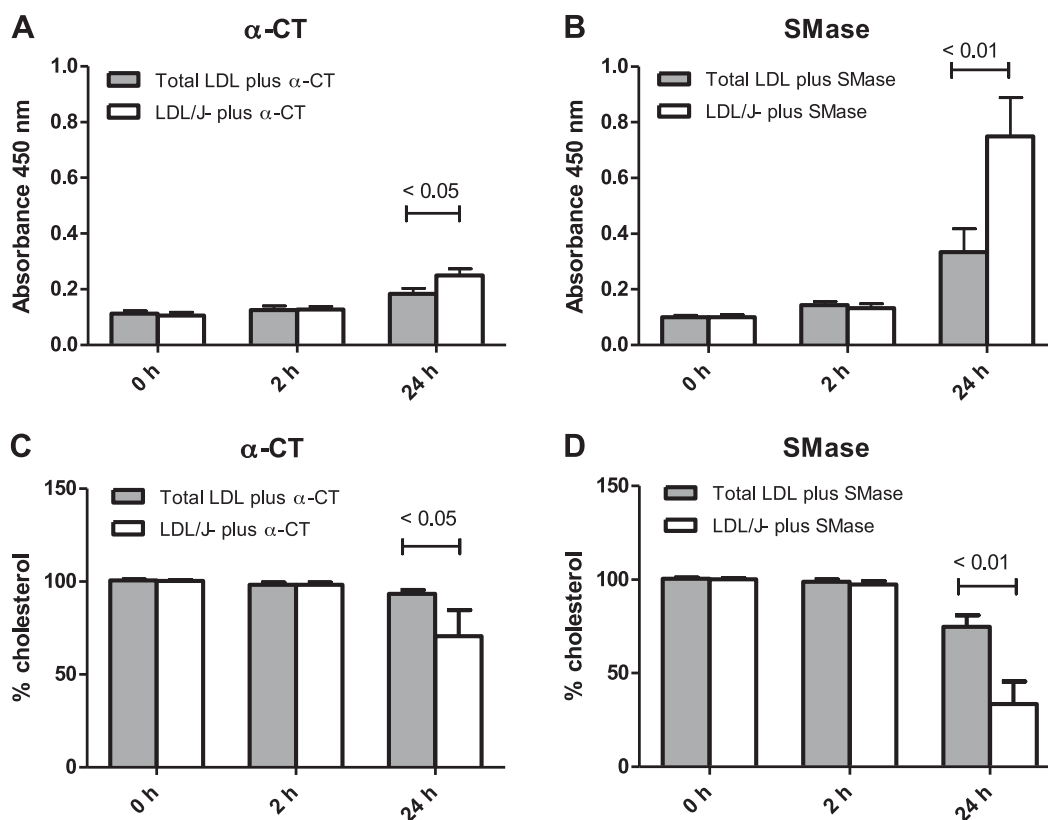
#### *Aggregation induced by SMase and $\alpha$ -CT*

To solve the problems with the heterogeneous response of spontaneous LDL aggregation, we added SMase or  $\alpha$ -CT to trigger this process. In these experimental conditions, aggregation occurred fast enough to obtain relevant differences at 24 hours after the process started. Absorbance results (Fig. 3A, B) showed that both enzymatic treatments promoted the aggregation of total LDL and LDL/J<sup>-</sup>, but aggregation was higher in LDL/apoJ<sup>-</sup>. The cholesterol-precipitation method yielded results that were similar to the measurement of absorbance (Fig. 3C, D). In the specific conditions that we used, SMase treatment promoted stronger aggregation than  $\alpha$ -CT proteolysis.

Figure 4 shows a representative experiment of SMase- or  $\alpha$ -CT-induced aggregation after 24 hours, evaluated by GFC. The results obtained by this method were similar to those obtained by the absorbance or the cholesterol precipitation methods. These findings indicate that LDL/J<sup>-</sup> is more susceptible to aggregation than total LDL whatever the induction mechanism used. In addition, both treatments generated a peak of smaller size, probably corresponding to degradation fragments. These observations were also patent in TEM micrographs (Fig. 4, right), which showed that aggregates in LDL/J<sup>-</sup> were more abundant and larger than in total LDL after SMase and  $\alpha$ -CT treatment.

CD spectra (Fig. 5A, B) showed that SMase-induced aggregation slightly decreased the ellipticity signal in LDL/J<sup>-</sup> but not in total LDL. This decrease is more evident at the 208 nm region, where the  $\alpha$ -helix contributes; this suggests a relative enrichment of  $\beta$ -structure of apoB in LDL/J<sup>-</sup>. ATR-FTIR analyses show a noticeable shift to lower wavenumbers, from 1637 to 1622  $\text{cm}^{-1}$ , in both LDLs, although





**Figure 3.** Aggregation of total LDL and LDL/J<sup>-</sup> after SMase or  $\alpha$ -CT treatments. LDLs were at 0.5 mg/ml apoB (equivalent to 3 mM cholesterol). Aggregation of LDLs was induced by  $\alpha$ -CT (A) or SMase treatment (B) and monitored at 2 and 24 hours by measuring absorbance at 450 nm. Proportion of nonprecipitable cholesterol after LDL aggregation induced by  $\alpha$ -CT (C) or SMase treatment (D). Data are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments in triplicate (absorbance) or duplicate (cholesterol precipitation).

the shift was a bit more evident in the LDL/J<sup>-</sup> spectrum (Fig. 5C, D). Although both regions of the spectra correspond to  $\beta$ -structures, a shift to lower wavenumbers in the spectra of proteins is indicative of increased hydrogen bonding, of a more planar sheet, or of a larger number of strands (34). However, such a change in the IR spectra of lipoproteins has been attributed to the embedding of  $\beta$ -strands in the lipid monolayer rather than to an increase in  $\beta$ -sheet packing (35), which makes sense after SMase treatment. Whatever the case, both views are consistent with increased SMase-induced aggregation of LDL/J<sup>-</sup> particles compared with total LDL.

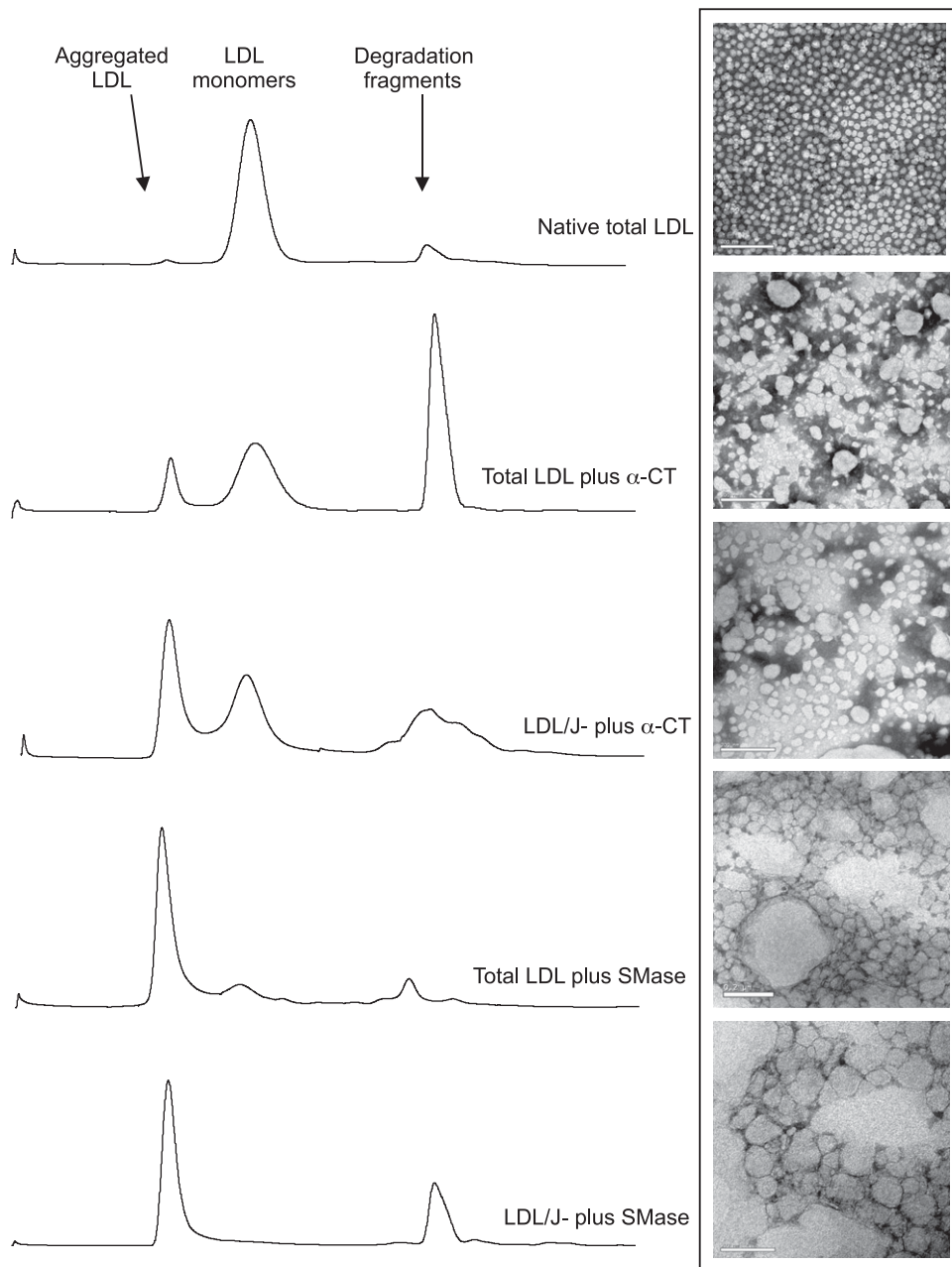
$\alpha$ -CT-induced aggregation promoted a stronger modification of CD spectra than SMase treatment in both LDLs (Fig. 5F, G) possibly because of the extensive proteolysis of apoB, as seen in Fig. 5J. Here, both the relative enrichment of the  $\beta$ -structure of apoB at 2 hours of proteolysis and the aggregation of the particles at 24 hours are more evident in LDL/J<sup>-</sup> than in total LDL. These differences were not observed in the overall ATR-FTIR spectra (Fig. 5H, I). It must be noted that IR spectroscopy interpretation is not a straightforward procedure because of the sensitivity of IR to combined structural and environmental factors (36), especially when talking about the ATR mode allowing the study of crystallized samples to avoid water contribution to the spectra. The detection of conformational differences in the native  $\beta$ -sheet of apoB would require deconvolution of the spectra, but this would not be reliable with the

characteristic 4 cm<sup>-1</sup> resolution of ATR-FTIR. Albeit this technical limitation, it is apparent that LDL/J<sup>-</sup> is more susceptible to SMase and  $\alpha$ -CT treatments than total LDL.

SDS-PAGE showed that apoB in LDL/J<sup>-</sup> was more susceptible to proteolytic degradation than total LDL, both when it was promoted by  $\alpha$ -CT and when proteolysis was spontaneous in SMase-treated LDLs (Fig. 5E, J). apoJ would therefore not only protect LDLs from aggregation but could also prevent apoB degradation. Because proteolysis of apoB promotes LDL aggregation, the inhibitory effect of apoJ on proteolysis could be a mechanism involved in preventing the aggregation of LDL particles.

#### Effect of the addition of purified apoJ on LDL susceptibility to aggregation

Total LDL was submitted to SMase- or  $\alpha$ -CT-induced aggregation in presence of purified apoJ at 2 molar ratios in respect to apoB. The first was close to that observed in agLDL(-) in plasma (mol apoJ/mol apoB 1/70, or expressed as mass, mg apoJ/mg apoB 1/500). The second was 10-fold higher (molar ratio 1/7, mass ratio 1/50). The process of LDL aggregation induced by SMase or  $\alpha$ -CT was prevented at 4 hours of incubation by both doses of apoJ and was slowed in a dose-dependent manner for periods up to 24 h (Fig. 6A, B). GGE confirmed that the higher concentration of apoJ partially prevented the formation of



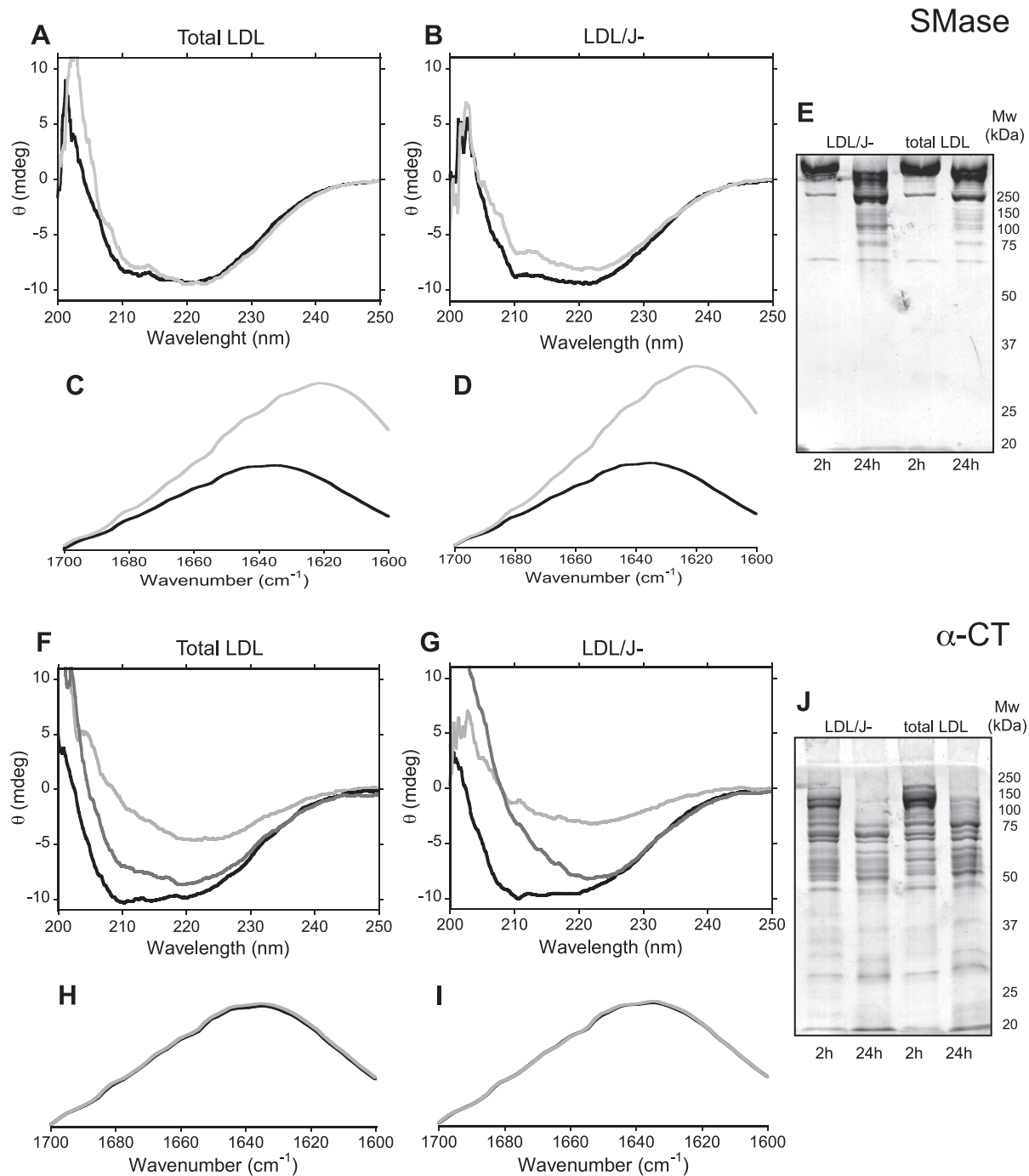
**Figure 4.** GFC and TEM of total LDL and LDL/J- after 24 hours of SMase or  $\alpha$ -CT treatments. LDLs (0.5 ml at 0.4 mg/ml apoB) were chromatographed at a flow rate of 0.5 ml/min using a Superose 6 column in a AKTA-FPLC system (GE Healthcare) as described in Materials and Methods. White bars in TEM micrographs indicate 200 nm.

aggregated particles at 24 hours of aggregation (Fig. 6C, D). GFC also showed the inhibitory effect of the higher concentration of apoJ on the formation of aggregated LDL particles after 24 hours of SMase- or  $\alpha$ -CT-induced aggregation (Fig. 6E).

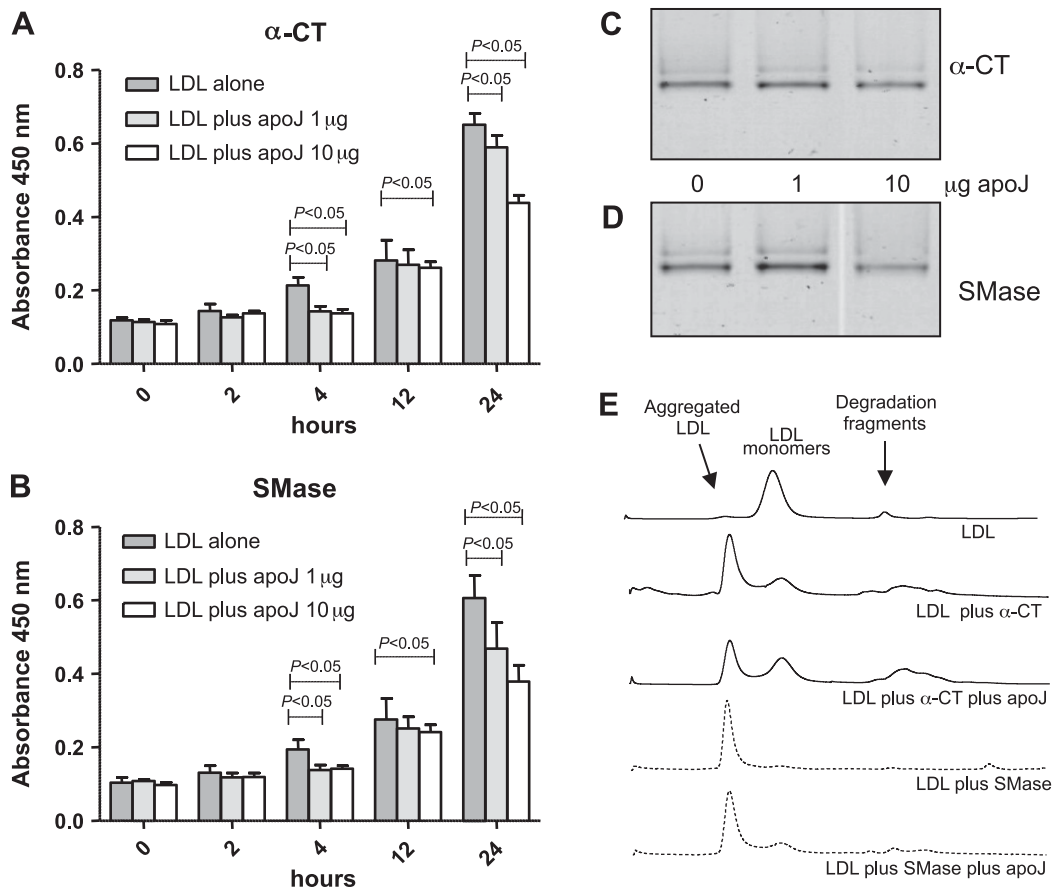
Because purified apoJ contained a low amount of contaminating albumin and because albumin is known to inhibit LDL aggregation at high concentrations, we tested the effect of an amount of albumin similar to those contaminating apoJ preparations. At this concentration (mol albumin/mol apoB 1/70), no effect on LDL aggregation was observed (data not shown). We used transferrin, trypsin inhibitor, and immunoglobulin (Mab anti-CD14) as negative controls at the same concentration as that used for apoJ. None of these proteins had any effect on LDL aggregation.

## DISCUSSION

The current study shows that the amount of apoJ bound to LDL is increased in the aggregated forms of this lipoprotein present in blood. This increased binding should be attributable to the chaperone function of apoJ, which binds to unfolded proteins with solvent-exposed hydrophobic domains (37). Aggregation of LDL is promoted by the exposure of hydrophobic domains on the surface of LDL particles, which can be induced by chemical (lipolysis or proteolysis) or physical (vortexing) modifications (28, 38). However, from our observation of an increased content of apoJ in agLDL(-), we cannot deduce whether the binding of apoJ to the aggregated forms of LDL occurs merely due to the exposure of hydrophobic domains after LDL aggregation or whether apoJ plays a concrete role in



**Figure 5.** CD and ATR-FTIR spectra. Total LDL and LDL/J<sup>-</sup> were analyzed at 0 (black lines), 2 (dark gray lines), and 24 hours (light gray lines) of SMase or  $\alpha$ -CT treatments. LDLs (0 at 0.5 mg/ml apoB) were incubated for 24 hours with SMase or  $\alpha$ -CT, as described in Materials and Methods, and CD or ATR-FTIR spectra were obtained using 50 mg/L apoB on a JASCO J-715 spectropolarimeter in the far-UV region (190–250 nm) or on a Variant Resolutions Pro spectrometer in the amide I region (1700–1600 cm<sup>-1</sup>), respectively. CD and FTIR graphs are representative of 3 independent experiments. A) CD spectra of total LDL after SMase treatment. B) CD spectra of LDL/J<sup>-</sup> after SMase treatment. C) ART-FTIR spectra of total LDL after SMase treatment. D) ART-FTIR spectra of LDL/J<sup>-</sup> after SMase treatment. F) CD spectra of total LDL after  $\alpha$ -CT treatment. G) CD spectra of LDL/J<sup>-</sup> after  $\alpha$ -CT treatment. H) ART-FTIR spectra of total LDL after  $\alpha$ -CT treatment. I) ART-FTIR spectra of LDL/J<sup>-</sup> after  $\alpha$ -CT treatment. E and J) SDS-PAGE of total LDL and apoJ-depleted LDL (LDL/J<sup>-</sup>) after 2 and 24 hours of SMase or  $\alpha$ -CT treatments. LDLs (5  $\mu$ g/well) were electrophoresed in 10% acrylamide gels under nonreducing conditions for 2 hours at 100 V and stained with 0.05% Coomassie. Left gel, LDLs treated with SMase; right gel, LDLs treated with  $\alpha$ -CT.



**Figure 6.** Effect of the addition of purified apoJ to LDL aggregation induced by SMase or  $\alpha$ -CT treatment. Total LDL (at 0.5 mg/ml apoB) was subjected to aggregation by SMase or  $\alpha$ -CT treatments up to 24 hours in the presence of 1 and 10  $\mu$ g of apoJ. The final mass ratios of apoJ/apoB were 1/500 and 1/50, and molar ratios were 1/70 and 1/7, respectively. Increment of absorbance at 450 nm after  $\alpha$ -CT treatment (A) or after SMase treatment (B). GGE of LDLs (5  $\mu$ g apoB/well) after 24 hours of  $\alpha$ -CT treatment (C) or SMase treatment (D). E) GFC of total LDL after 24 hours of SMase or  $\alpha$ -CT treatment in the presence of 10  $\mu$ g of purified apoJ. LDLs (0.5 ml at 0.4 g/ml apoB) were chromatographed using a Superose 6 column in a AKTA-FPLC system.

the control of LDL aggregation. TEM micrographs and GGE electrophoresis of LDL/J+ showed that, although aggregated or fused particles in this subfraction were more abundant than in LDL/J-, monomeric particles were more frequent than aggregated/fused particles. This observation suggests that the binding of apoJ does not require the effective aggregation of LDL particles. Instead, such binding could occur in monomeric particles that expose some hydrophobic domains but are still not aggregated. It is on these particles where apoJ could exert some effect controlling aggregation.

Experiments performed with apoJ-depleted LDLs demonstrate that apoJ plays an active protective role against LDL aggregation. This protective function was observed whatever method induced aggregation, suggesting that it would be a general mechanism to prevent LDL aggregation. Interestingly, apoJ not only retarded the aggregation of LDL particles but it also diminished the degradation of apoB, either when it was secondary to degradation of phospholipids by SMase or when it was directly induced by  $\alpha$ -CT treatment. This function of apoJ in LDL can be compared with that suggested in HDLs, where apoJ would play a role stabilizing the structure and function of apoA-I or paraoxonase 1 (39, 40). ApoJ could thus

be involved in stabilizing the apoB structure and making it less sensitive to proteolysis. These findings in apoJ-depleted LDLs were confirmed in another set of experiments in which purified apoJ added to LDLs was able to partially inhibit the aggregation induced by SMase or  $\alpha$ -CT. It is noteworthy that the concentration of apoJ used in our experiments is within the physiologic range. Several studies report that the concentration of apoJ in blood ranges from 50 to 150  $\mu$ g/ml (41–45), and the usual concentration of apoB in normolipemic subjects ranges from 0.8 to 1.0 mg/ml. The ratio of apoJ/apoB in blood is therefore around 1/10. The lowest apoJ/apoB ratio (1/500, expressed in protein mass) that we used was similar to that observed in agLDL(-) present in plasma, and the highest ratio (1/50) we used is even lower than the ratio usually present in plasma. Taken together, our data demonstrate that apoJ could play a determinant role in preventing the aggregation of LDL particles in blood circulation.

The molecular mechanism for apoJ effects on LDL aggregation is unclear. It is probably related to the ability of apoJ to bind to hydrophobic domains exposed by proteins undergoing unfolding. Wilson and colleagues suggested that during amorphous aggregation of proteins, apoJ interacts with slowly aggregating species of the off-folding

pathway (2, 3). Phospholipolysis or proteolysis of LDL promotes the formation of hydrophobic domains both in the lipid and protein moieties of the lipoprotein, favoring the aggregation of LDL. apoJ could bind to these hydrophobic domains, preventing the interaction of LDL particles mediated by hydrophobic surfaces and the subsequent aggregation.

Our results concur with the postulated function of apoJ as a part of the quality control system for preventing the accumulation of protein aggregates (4). apoJ expression increases during various physiologic and pathologic stresses (44, 46–48), and its binding to client proteins in blood, such as albumin, fibrinogen, or ceruloplasmin, is promoted after inducing shear stress in plasma (6). In the context of cardiovascular disease, a number of studies have reported different protective effects of apoJ (49). apoJ regulates complement and is released from activated platelets to participate in wound repair (50). The concentration of apoJ increases in areas of atherosclerotic lesions but not in normal arteries (5, 51). This increase could be due in part to the entry of lipoproteins from plasma but also to its enhanced expression by the arterial wall cells. Kim *et al.* reported a protective role of apoJ against neointimal hyperplasia *via* an antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and a cytoprotective effect on endothelial cells (52). Another potential protective action of apoJ is that it induces cholesterol export from macrophage-foam cells (53), in a similar manner to that promoted by apoA-I. The role of apoJ in HDLs has been studied in detail by Navab and coworkers. These authors reported that apoJ preserves the anti-inflammatory, antioxidant, and antiatherogenic properties of HDLs (39, 40). Several studies have found that the content of apoJ in HDLs is decreased in subjects with diabetes, obesity, or metabolic syndrome and in patients with active coronary disease (11, 12, 43). In the latter, the antiapoptotic activity of HDLs is compromised in part by its reduced apoJ content (12).

Although all proteomic analyses performed in LDL have detected the presence apoJ in this lipoprotein, few studies have investigated the role of apoJ on LDLs. Karlsson *et al.* reported that apoJ is increased in LDLs from obese subjects (54), and Pettersson *et al.* described increased apoJ content in small dense LDLs from patients with diabetes and metabolic syndrome (20). These findings suggest that the low content of apoJ in HDLs in these patients could be caused by an altered distribution of apoJ among the lipoprotein fractions. However, these studies do not address the specific role of apoJ associated to LDLs. The only study to date that has investigated a specific function of apoJ on LDLs was conducted by Schwartz *et al.* (21). These authors reported a protective role of apoJ against cytotoxicity promoted by E-LDLs. They modified LDLs with plasmin and cholesterol esterase and obtained a highly inflammatory form of LDL (named E-LDL) characterized by increased content in NEFA and apoB degradation. Both characteristics are shared with LDL(–). These authors reported that apoJ bound to E-LDL but not to native LDL, a finding that is in agreement with our results of increased binding of apoJ to aggregated LDL.

It is pertinent to consider that phospholipases and proteases play a relevant role in the triggering of atherogenesis in the arterial wall. SMase expression is increased in atherosclerotic lesions. It degrades SM to ceramide and

phosphorylcholine, leading to the formation of hydrophobic ceramide-rich domains that promote LDL aggregation. Regarding  $\alpha$ -CT, although this enzyme is not directly involved in atherosclerosis, it is used as a model for proteolysis because several endoproteases are hyperexpressed in atherosclerotic lesions.  $\alpha$ -CT induces apoB proteolysis and triggers LDL particle fusion, later destabilizing these lipoproteins. The present findings show a novel mechanism by which apoJ controls the aggregation of LDLs. We propose that the increased expression of apoJ in atherosclerotic lesions could be a response of the arterial walls to LDL aggregation, the initial key step of atherogenesis. This proposal opens the possibility that apoJ-based therapeutic strategies conducted to inhibit LDL aggregation could be useful in the future for preventing cardiovascular disease. The use of mimetic peptides derived from apoJ, for example, has been successfully used to retard atherosclerosis in mice, although the effect on LDL aggregation has not been evaluated. Further research addressing these molecular mechanisms will hopefully contribute to the development of new apoJ-based therapies. **FJ**

The authors thank Carolyn Newey (Sant Pau Biomedical Research Institute; IIB Sant Pau) for editorial assistance. This work was supported by the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III/Fondo de Investigación Sanitaria; ISCIII/FIS) Grants PI10/00265, PI10/00975, PI13/00364, and PI13/01330. M.M.-B., A.R., M.P.-C., J.O.-L., and J.L.S.-Q. are members of the Quality Research Group 2009-SGR-1205 from Generalitat de Catalunya. L.M. and S.V. are members of the Quality Research Group 2014-SGR-00885 from Generalitat de Catalunya. M.M.-B., A.R., M.P.-C., J.O.-L., and J.L.S.-Q. are members of the Cardiovascular Research Network (Red de Investigación Cardiovascular; RD12/0042/0043) from ISCIII. The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. De Silva, H. V., Harmony, J. A., Stuart, W. D., Gil, C. M., and Robbins, J. (1990) Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* **29**, 5380–5389
2. Yerbury, J. J., Poon, S., Meehan, S., Thompson, B., Kumita, J. R., Dobson, C. M., and Wilson, M. R. (2007) The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J.* **21**, 2312–2322
3. Poon, S., Treweek, T. M., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B., and Carver, J. A. (2002) Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett.* **513**, 259–266
4. Yerbury, J. J., Stewart, E. M., Wyatt, A. R., and Wilson, M. R. (2005) Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep.* **6**, 1131–1136
5. Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Komiyama, K., Masuda, S., Asuwa, N., Choi-Miura, N. H., and Tomita, M. (1998) Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 665–672
6. Wyatt, A. R., and Wilson, M. R. (2010) Identification of human plasma proteins as major clients for the extracellular chaperone clusterin. *J. Biol. Chem.* **285**, 3532–3539
7. de Silva, H. V., Stuart, W. D., Duvic, C. R., Wetterau, J. R., Ray, M. J., Ferguson, D. G., Albers, H. W., Smith, W. R., and Harmony, J. A. (1990) A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 13240–13247
8. Bergmeier, C., Siekmeier, R., and Gross, W. (2004) Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin. Chem.* **50**, 2309–2315



9. Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, B. J., Fonarow, G. C., Cardinez, C. J., Castellani, L. W., Brennan, M. L., Lusis, A. J., Fogelman, A. M., and La Du, B. N. (1997) Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J. Clin. Invest.* **99**, 2005–2019
10. Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Nayak, D. P., Hama, S., Navab, M., and Fogelman, A. M. (2001) High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation* **103**, 2283–2288
11. Hoofnagle, A. N., Wu, M., Gosmanova, A. K., Becker, J. O., Wijsman, E. M., Brunzell, J. D., Kahn, S. E., Knopp, R. H., Lyons, T. J., and Heinecke, J. W. (2010) Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2528–2534
12. Riwanto, M., Rohrer, L., Roschitzki, B., Besler, C., Mocharla, P., Mueller, M., Perisa, D., Heinrich, K., Altwegg, L., von Eckardstein, A., Lüscher, T. F., and Landmesser, U. (2013) Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation* **127**, 891–904
13. Banfi, C., Brioschi, M., Barcella, S., Wait, R., Begum, S., Galli, S., Rizzi, A., and Tremoli, E. (2009) Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme. *Proteomics* **9**, 1344–1352
14. Karlsson, H., Leanderson, P., Tagesson, C., and Lindahl, M. (2005) Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 551–565
15. Karlsson, H., Lindqvist, H., Tagesson, C., and Lindahl, M. (2006) Characterization of apolipoprotein M isoforms in low-density lipoprotein. *J. Proteome Res.* **5**, 2685–2690
16. Richardson, M. R., Lai, X., Dixon, J. L., Sturek, M., and Witzmann, F. A. (2009) Diabetic dyslipidemia and exercise alter the plasma low-density lipoproteome in Yucatan pigs. *Proteomics* **9**, 2468–2483
17. Ståhlman, M., Davidsson, P., Kamert, I., Rosengren, B., Borén, J., Fagerberg, B., and Camejo, G. (2008) Proteomics and lipids of lipoproteins isolated at low salt concentrations in D2O/sucrose or in KBr. *J. Lipid Res.* **49**, 481–490
18. Sun, H. Y., Chen, S. F., Lai, M. D., Chang, T. T., Chen, T. L., Li, P. Y., Shieh, D. B., and Young, K. C. (2009) Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clin. Chim. Acta*
19. Tabas, I., Williams, K. J., and Borén, J. (2007) Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**, 1832–1844
20. Pettersson, C., Karlsson, H., Ståhlman, M., Larsson, T., Fagerberg, B., Lindahl, M., Wiklund, O., Borén, J., and Fogelstrand, L. (2011) LDL-associated apolipoprotein J and lysozyme are associated with atherogenic properties of LDL found in type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *J. Intern. Med.* **269**, 306–321
21. Schwarz, M., Spath, L., Lux, C. A., Paprotka, K., Torzewski, M., Dersch, K., Koch-Brandt, C., Husmann, M., and Bhakdi, S. (2008) Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. *Thromb. Haemost.* **100**, 110–118
22. Bancells, C., Canals, F., Benítez, S., Colomé, N., Julve, J., Ordóñez-Llanos, J., and Sánchez-Quesada, J. L. (2010) Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **51**, 3508–3515
23. Sánchez-Quesada, J. L., Benítez, S., and Ordóñez-Llanos, J. (2004) Electronegative low-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 329–335
24. Parasassi, T., De Spirito, M., Mei, G., Brunelli, R., Greco, G., Lenzi, L., Maulucci, G., Nicolai, E., Papi, M., Arcovito, G., Tosatto, S. C., and Ursini, F. (2008) Low density lipoprotein misfolding and amyloidogenesis. *FASEB J.* **22**, 2350–2356
25. Bancells, C., Villegas, S., Blanco, F. J., Benítez, S., Gállego, I., Beloki, L., Pérez-Cuellar, M., Ordóñez-Llanos, J., and Sánchez-Quesada, J. L. (2010) Aggregated electronegative low density lipoprotein in human plasma shows a high tendency toward phospholipolysis and particle fusion. *J. Biol. Chem.* **285**, 32425–32435
26. Bancells, C., Benítez, S., Ordóñez-Llanos, J., Öörni, K., Kovanen, P. T., Milne, R. W., and Sánchez-Quesada, J. L. (2011) Immunochemical analysis of the electronegative LDL subfraction shows that abnormal N-terminal apolipoprotein B conformation is involved in increased binding to proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **286**, 1125–1133
27. Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., and Bondjers, G. (1998) Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* **139**, 205–222
28. Öörni, K., Pentikäinen, M. O., Ala-Korpela, M., and Kovanen, P. T. (2000) Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lipid Res.* **41**, 1703–1714
29. Sánchez-Quesada, J. L., Camacho, M., Antón, R., Benítez, S., Vila, L., and Ordóñez-Llanos, J. (2003) Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* **166**, 261–270
30. Sánchez-Quesada, J. L., Benítez, S., Otal, C., Franco, M., Blanco-Vaca, F., and Ordóñez-Llanos, J. (2002) Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J. Lipid Res.* **43**, 699–705
31. Benítez, S., Villegas, V., Bancells, C., Jorba, O., González-Sastre, F., Ordóñez-Llanos, J., and Sánchez-Quesada, J. L. (2004) Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. *Biochemistry* **43**, 15863–15872
32. Vigano, C., Manciu, L., Buyse, F., Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J. M. (2000) Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the structure, orientation and tertiary structure changes in peptides and membrane proteins. *Biopolymers* **55**, 373–380
33. Hochgrebe, T., Pankhurst, G. J., Wilce, J., and Easterbrook-Smith, S. B. (2000) pH-dependent changes in the in vitro ligand-binding properties and structure of human clusterin. *Biochemistry* **39**, 1411–1419
34. Zandomenighi, G., Krebs, M. R., McCammon, M. G., and Fändrich, M. (2004) FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci.* **13**, 3314–3321
35. Bañuelos, S., Arrondo, J. L., Goñi, F. M., and Pifat, G. (1995) Surface-core relationships in human low density lipoprotein as studied by infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **270**, 9192–9196
36. Arrondo, J. L., Echabe, I., Iloro, I., Hernando, M. A., de la Cruz, F., and Goñi, F. M. (2003) A bacterial TrwC relaxase domain contains a thermally stable alpha-helical core. *J. Bacteriol.* **185**, 4226–4232
37. Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., and Wilson, M. R. (1999) Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 6875–6881
38. Hevonoja, T., Pentikäinen, M. O., Hyvönen, M. T., Kovanen, P. T., and Ala-Korpela, M. (2000) Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 189–210
39. Stuart, W. D., Krol, B., Jenkins, S. H., and Harmony, J. A. (1992) Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins. *Biochemistry* **31**, 8552–8559
40. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Hama, S., Hough, G., Bachini, E., Garber, D. W., Mishra, V. K., Palgunachari, M. N., and Fogelman, A. M. (2005) An oral apoJ peptide renders HDL antiinflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1932–1937
41. Kujiraoka, T., Hattori, H., Miwa, Y., Ishihara, M., Ueno, T., Ishii, J., Tsuji, M., Iwasaki, T., Sasaguri, Y., Fujioka, T., Saito, S., Tsushima, M., Maruyama, T., Miller, I. P., Miller, N. E., and Egashira, T. (2006) Serum apolipoprotein j in health, coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *J. Atheroscler. Thromb.* **13**, 314–322
42. Poulakou, M. V., Paraskevas, K. I., Wilson, M. R., Iliopoulos, D. C., Tsigris, C., Mikhailidis, D. P., and Perrea, D. (2008) Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease. *In Vivo* **22**, 537–542

43. Rubinow, K. B., Tang, C., Hoofnagle, A. N., Snyder, C. N., Amory, J. K., Heinecke, J. W., and Page, S. T. (2012) Acute sex steroid withdrawal increases cholesterol efflux capacity and HDL-associated clusterin in men. *Steroids* **77**, 454–460
44. Trougakos, I. P., Poulakou, M., Stathatos, M., Chalikia, A., Melidonis, A., and Gonos, E. S. (2002) Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction. *Exp. Gerontol.* **37**, 1175–1187
45. Vareka, I., Stejskal, D., Varekova, R., Burianova, K., and Hnatek, J. (2009) Changes in clusterin serum concentration levels in oncologic patients during the course of spa therapy—a pilot study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **153**, 117–120
46. Trougakos, I. P., and Gonos, E. S. (2002) Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1430–1448
47. Swertfeger, D. K., Witte, D. P., Stuart, W. D., Rockman, H. A., and Harmony, J. A. (1996) Apolipoprotein J/clusterin induction in myocarditis: A localized response gene to myocardial injury. *Am. J. Pathol.* **148**, 1971–1983
48. Schlatter, D., Maahs, D. M., Chance, M. R., Dazard, J. E., Li, X., Hazlett, F., Rewers, M., and Snell-Bergeon, J. K. (2012) Novel urinary protein biomarkers predicting the development of microalbuminuria and renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **35**, 549–555
49. Park, S., Mathis, K. W., and Lee, I. K. (2014) The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 45–53
50. Witte, D. P., Aronow, B. J., Stauderman, M. L., Stuart, W. D., Clay, M. A., Gruppo, R. A., Jenkins, S. H., and Harmony, J. A. (1993) Platelet activation releases megakaryocyte-synthesized apolipoprotein J, a highly abundant protein in atheromatous lesions. *Am. J. Pathol.* **143**, 763–773
51. Ishikawa, Y., Ishii, T., Akasaka, Y., Masuda, T., Strong, J. P., Zieske, A. W., Takei, H., Malcom, G. T., Taniyama, M., Choi-Miura, N. H., and Tomita, M. (2001) Immunolocalization of apolipoproteins in aortic atherosclerosis in American youths and young adults: findings from the PDAY study. *Atherosclerosis* **158**, 215–225
52. Kim, H. J., Yoo, E. K., Kim, J. Y., Choi, Y. K., Lee, H. J., Kim, J. K., Jeoung, N. H., Lee, K. U., Park, I. S., Min, B. H., Park, K. G., Lee, C. H., Aronow, B. J., Sata, M., and Lee, I. K. (2009) Protective role of clusterin/apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1558–1564
53. Gelissen, I. C., Hochgrebe, T., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B., Jessup, W., Dean, R. T., and Brown, A. J. (1998) Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem. J.* **331**, 231–237
54. Karlsson, H., Mörtstedt, H., Lindqvist, H., Tagesson, C., and Lindahl, M. (2009) Protein profiling of low-density lipoprotein from obese subjects. *Proteomics Clin. Appl.* **3**, 663–671

Received for publication September 8, 2014.  
Accepted for publication December 1, 2014.







Contents lists available at ScienceDirect

## Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)

# Increased concentration of clusterin/apolipoprotein J (apoJ) in hyperlipemic serum is paradoxically associated with decreased apoJ content in lipoproteins



Anna Rull <sup>a,1</sup>, Maria Martínez-Bujidos <sup>a,b,1</sup>, Montserrat Pérez-Cuellar <sup>a</sup>, Antonio Pérez <sup>c</sup>,  
Jordi Ordóñez-Llanos <sup>a,b</sup>, José Luis Sánchez-Quesada <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Cardiovascular Biochemistry Group, Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Endocrinology and Nutrition Department, Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB Sant Pau, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 January 2015

Received in revised form

31 May 2015

Accepted 1 June 2015

Available online 6 June 2015

## Keywords:

Apolipoprotein J

Atherosclerosis

Cardiovascular risk factors

Hyperlipidemia

Lipoproteins

## ABSTRACT

**Objective:** Clusterin/apolipoprotein J (apoJ) circulates in blood in part associated to lipoproteins or in unbound form. When bound to HDL, apoJ is antiatherogenic by inhibiting endothelial cell apoptosis; thus, any factor modifying apoJ association to HDL would decrease its antiatherogenic function. However, the exact distribution of apoJ in each lipoprotein fraction, or in lipoprotein-non bound form has not been specifically investigated either in normolipemia or in dyslipidemia.

**Methods:** Basic lipid profile and apoJ concentration were determined in sera from 70 subjects, including a wide range of cholesterol and triglyceride concentrations. Lipoproteins were isolated by ultracentrifugation and their lipid and apolipoprotein composition was assessed.

**Results:** In the overall population, serum apoJ positively associated with cholesterol, triglyceride and VLDL-C concentrations, and HDL-C and triglyceride were independent predictors of increased apoJ concentration. Approximately, 20.5% of circulating apoJ was associated with lipoproteins (18.5% HDL, 0.9% LDL and 1.1% VLDL) and 79.5% was not bound to lipoproteins. Serum apoJ concentration was higher in hypercholesterolemic (HC), hypertriglyceridemic (HTG) and combined hyperlipidemic (CHL) sera compared to normolipemic (NL) sera (HC,  $98.15 \pm 33.6$  mg/L; HTG,  $103.3 \pm 36.8$  mg/L; CHL,  $131.7 \pm 26.8$  mg/L; NL,  $66.7 \pm 33.8$  mg/L;  $P < 0.001$ ). ApoJ distribution was also altered in hyperlipidemia; approximately 30% of circulating apoJ was associated to lipoproteins in the NL group whereas this proportion rounded 15% in hyperlipidemic subjects.

**Conclusions:** Our findings indicate that hyperlipidemia increases the concentration of apoJ in serum but, in turn, the content of lipoprotein-associated apoJ decreases. The redistribution of apoJ in hyperlipidemia could compromise the antiatherogenic properties of HDL.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Clusterin, also known as apolipoprotein J (apoJ), is a highly glycosylated protein involved in ageing, arteriosclerosis, diabetes, cancer, nephropathy and neuron degeneration [1–3]. Although the specific role that apoJ plays in these processes is not well

understood, its chaperone activity seems to be involved in a general protective action. ApoJ was the first identified extracellular chaperone and it binds to a wide variety of partially unfolded proteins that present hydrophobic regions, including amyloid-like structures. It is therefore part of the quality control system for preventing extracellular unfolded protein accumulation [1,2].

ApoJ is expressed by numerous cell types and is present in most tissues and body compartments [3–6]. In relation to atherosclerosis, it is hyperexpressed in human atherosclerotic lesions [7–9] and in areas of vascular damage [10,11]. ApoJ is also present in blood, with values ranging from 50 to 200 mg/L, depending on the measurement method [12–19]. ApoJ circulates mainly in free form

\* Corresponding author. Cardiovascular Biochemistry Group at Biomedical Research Institute IIB-Sant Pau, Sant Antoni M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

E-mail address: [jsanchezq@santpau.cat](mailto:jsanchezq@santpau.cat) (J.L. Sánchez-Quesada).

<sup>1</sup> AR and MM-B contributed equally to the work, and both should be considered as first authors.

or forming oligomers, and binds to several client proteins such as albumin, fibrinogen and ceruloplasmin under stress conditions. However, a substantial part of apoJ associates to lipoproteins, mainly to HDL, where it could play a relevant role in maintaining qualitative properties [14]. It has been reported that apoJ contributes to the antioxidative function of HDL, preventing the oxidative modification of LDL, but it is not clear if this atheroprotective function is related to its coexistence in a subpopulation of HDL particles that contain the antioxidant enzyme paraoxonase 1 (PON1) [20,21]. Although the content of apoJ in other lipoproteins is minor, proteomic approaches have shown that apoJ also associates with VLDL and LDL [14,22,23]. ApoJ is specially abundant in a minor subfraction of plasma LDL, named electronegative LDL (LDL(-)), which displays inflammatory, apoptotic and proliferative properties and whose proportion increases in situations of high cardiovascular risk (CVR) [24]. The function of apoJ in LDL is unclear, but it has been suggested that could inhibit LDL-mediated cytotoxicity [25]. More recently, we have reported that apoJ could play a protective role preventing LDL from aggregation [26].

Several studies have reported increased apoJ concentrations in serum from patients with CVR factors [12,14–17,27,28]. It has been recently shown that the content of apoJ in lipoproteins can also be altered in these situations. Recent findings have shown a decreased content of apoJ in HDL from subjects with diabetes, obesity, dyslipoproteinemia or coronary artery disease (CAD) [13,14]. HDL proteome remodeling in CAD, in particular increased apoC-III and decreased apoJ content, impairs the activation of endothelial anti-apoptotic pathways [13]. Other authors have reported that apoJ content in LDL is increased in diabetic patients [29]. These findings suggest that the distribution of apoJ is abnormal in subjects with high CVR. Despite this evidence, to our knowledge the exact distribution of apoJ in each lipoprotein fraction, or in lipoprotein-not bound form, has not been thoroughly investigated either in healthy subjects or in hyperlipidemic patients. Our aim was to determine the distribution of apoJ in lipoprotein fractions and in the lipoprotein non-bound form and to assess the impact of the lipoprotein profile on such distribution. Possible associations between lipid and protein composition of each lipoprotein fraction and their apoJ content were also assessed.

## 2. Methods

### 2.1. Patients

The study was approved by the Institutional Review Board. Samples ( $n = 70$ ) were taken from those routinely analyzed in the Lipid Laboratory of our hospital. Patients with severe diseases known to affect apoJ concentrations, such as cancer, renal disease, morbid obesity and acute coronary disease, were not included in the study. Subjects taking lipid-lowering drugs were not included in the study. Patients were classified as normolipidemic (NL group, total cholesterol  $< 240$  mg/dL, triglycerides  $< 175$  mg/dL and HDL cholesterol  $> 45$  mg/dL,  $n = 22$ ), hypercholesterolemic (HC group, total cholesterol  $> 240$  mg/dL, triglycerides  $< 175$  mg/dL and HDL cholesterol  $> 45$  mg/dL,  $n = 20$ ), hypertiglyceridemic (HTG group, total cholesterol  $< 240$  mg/dL, triglycerides  $> 175$  mg/dL and HDL cholesterol  $< 45$  mg/dL,  $n = 23$ ) or combined hyperlipidemic (CHL group, total cholesterol  $> 240$  mg/dL, triglycerides  $> 175$  mg/dL,  $n = 5$ ) subjects.

### 2.2. Basic lipid profile

All analyses were performed using serum samples obtained in Vacutainer tubes (Becton Dickinson). Lipid measurements were performed on an Architect 6000 automated analyzer (Abbot

Diagnostics) using commercial methods, according to the guidelines of the hospital. Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were measured by standard enzymatic methods and HDL-C by a homogeneous direct method. LDL-C was calculated using the Friedewald formula when TG concentrations were  $< 300$  mg/dL or measured after separation of lipoproteins by ultracentrifugation at 100 000g for 18 h at 4 °C when TG was  $\geq 300$  mg/dL. All measurements were controlled by national and international external quality assurance programs and fulfilled the NCEP recommendations for inaccuracy and total imprecision.

### 2.3. Lipoprotein isolation and composition

#### 2.3.1. KBr method

VLDL/IDL (density  $< 1.019$  g/mL), LDL (density 1.019–1.063 g/mL), HDL (density 1.063–1.210 g/mL) and LPDS (density  $> 1.210$  g/mL) were isolated from 2 ml of fresh serum by sequential density gradient ultracentrifugation using KBr density solutions, according Havel et al. [30]. The isolation of lipoproteins started within 24 h of blood extraction. Additional serum aliquots were stored at  $-80$  °C for apoJ measurement. Cholesterol, triglycerides, apoB, apoA-I (Roche Diagnostics), phospholipids, free cholesterol (Wako Chemicals), apoA-II, apoC-III and apoE (Kamiya Biomedical Company) concentrations in HDL, LDL and VLDL were determined in a Cobas c501 autoanalyzer (Roche Diagnostics). The results were expressed as the percentage of each component respect to the total lipoprotein mass, or as the molar ratio of apoJ versus apoB or apoA-I.

#### 2.3.2. Sucrose/D<sub>2</sub>O method

To validate the distribution of circulating apoJ obtained using the KBr ultracentrifugation method, lipoprotein particles from the serum of 6 participants were also isolated by sucrose/D<sub>2</sub>O ultracentrifugation. Mean lipid values of these subjects were cholesterol  $234.74 \pm 47.96$  mg/dL and triglyceride  $157.36 \pm 84.64$  mg/dL. The method was essentially the same as that described by Stahlman et al. [31], using the same density solutions but with different spin speed and times. VLDL/IDL (density  $< 1.019$  g/mL) and LDL (density 1.019–1.063 g/mL) were obtained after two consecutive 18 h ultracentrifugations at 45,000 rpm. The fraction of HDL (density 1.063–1.210 g/mL) was obtained after centrifugation for 96 h at 45,000 rpm.

### 2.4. ApoJ ELISA

Serum and lipoprotein concentrations of apoJ were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human apoJ (R&D Systems Europe, DuoSet ELISA for human clusterin, catalogue number DY5874), according to the manufacturer's instructions. We used an ELISA specific for urine or cell culture assays to ensure the detection of the presumably low content of apoJ in VLDL and LDL. Intra-assay variability coefficient was 7% (calculated from 8 replicates of the same sample) and inter-assay variability was 14% (calculated from 5 independent plates). The 96-well plates (MaxiSorp, Nunc) were coated with 100  $\mu$ l mouse anti-human apoJ at a concentration 2  $\mu$ g/mL overnight at room temperature. All further incubations steps were also carried out at room temperature. Samples were diluted in phosphate buffer saline (PBS) (1:1000 for VLDL and LDL; 1:5000 for HDL; and 1:250000 for serum). GraphPad Prism 5.0 software was used to create a four parameter logistic (4-PL) curve fit. ApoJ content on HDL, LDL and VLDL were expressed as the percentage of lipoprotein mass or as the molar ratio mmol apoJ/mol cholesterol, as indicated in the figures. The latter was used to evaluate the percentage of apoJ bound to each lipoprotein in serum. The proportion of circulating lipoprotein-not bound apoJ (apoJ-LPDS) was calculated after the subtraction of lipoprotein-bound

apoJ from total serum apoJ.

### 2.5. Statistical methods

Results are given as mean  $\pm$  SD unless otherwise stated. Distribution normality of the variables was assessed by the Kolmogorov–Smirnov (KS) test. Not normally distributed data were logarithmically transformed. Inter-group differences were analyzed using the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney test to determine significant differences between groups. In each group, lipoprotein differences were assessed by using paired data analysis with the nonparametric Friedman test for global interactions followed by Wilcoxon's test for detailed comparisons. Correlations of normally and non-normally distributed data were evaluated by the Pearson and Spearman coefficient tests, respectively. Statistical analyses were performed using SPSS 21.0, with significance set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Concentration of apoJ in serum and association with lipid profile parameters

Table 1 shows the lipid profile of participants. The mean serum apoJ concentration of the overall study population was  $92.4 \pm 38.7$  mg/L (mean  $\pm$  SD,  $n = 70$ ), and apoJ values exhibited a normal distribution (KS 0.683;  $P = 0.740$ ). No significant difference in serum apoJ was found between women ( $97.8 \pm 37.3$  mg/L,  $n = 31$ ) and men ( $88.1 \pm 39.8$  mg/L,  $n = 39$ ), and no association was observed between serum apoJ concentration and age.

Univariate linear analysis showed that serum apoJ was positively associated with total cholesterol ( $r = 0.264$ ;  $P = 0.027$ ), VLDL-C ( $r = 0.330$ ;  $P = 0.0054$ ) and triglyceride concentrations ( $r = 0.347$ ;  $P = 0.003$ ) (Supplemental Fig. 1).

The independent association between serum apoJ and lipid profile parameters was analyzed using stepwise multiple regression analysis with serum apoJ as the dependent variable and age, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, VLDL-C and triglycerides as the independent variables. Of these parameters, the predictor model contained total HDL-cholesterol ( $B = 28.6 \pm 12.8$ , Beta = 0.314,  $P = 0.029$ ) and triglycerides ( $B = 32.4 \pm 8.0$ , Beta = 0.566,  $P = 0.001$ ) as independent predictors of increased serum apoJ concentrations. The model was statistically significant ( $P < 0.001$ ) and accounted for approximately 20% of the variance of serum apoJ ( $R^2 = 0.204$ ). These observations suggest that the serum apoJ concentration is primarily predicted by an elevated serum triglyceride concentration and to a lesser extent by HDL-C values, which accounted for approximately 20% and 6% of the variance of serum apoJ, respectively (Supplemental Table 1).

**Table 1**

Main characteristics and lipid profile of the study population ( $n = 70$ ).

Variables	Overall population	NL	Hyperlipidemia			P-value*
			HC	HTG	CHL	
Participants, n (%)	70	22 (31.4)	20 (28.6)	23 (32.9)	5 (7.1)	–
Age, in years	$58.3 \pm 13.8$	$57.9 \pm 16.5$	$60.8 \pm 13.2$	$58.4 \pm 12.1$	$48.8 \pm 8.26$	0.362
Gender, n (M/F)	39/31	12/10	7/13	17/6	3/2	–
Total cholesterol (mg/dL)	$219.1 \pm 51.2$	$177.9 \pm 40.6$	$269.3 \pm 26.3^a$	$205.6 \pm 27.3^{a,b}$	$275.2 \pm 28.2^{a,c}$	>0.001
VLDL-C (mg/dL)	$36.8 \pm 25.2$	$18.0 \pm 5.0$	$24.1 \pm 7.3^a$	$59.0 \pm 24.1^{a,b}$	$68.7 \pm 21.8^{a,b}$	>0.001
LDL-C (mg/dL)	$131.8 \pm 46.0$	$104.1 \pm 29.0$	$183.7 \pm 25.9^a$	$106.4 \pm 33.3^b$	$163.0 \pm 12.7^{a,c}$	>0.001
HDL-C (mg/dL)	$49.8 \pm 16.7$	$52.8 \pm 16.3$	$61.5 \pm 17.5$	$38.0 \pm 7.5^{a,b}$	$43.5 \pm 8.6$	>0.001
Triglycerides (mg/dL)	$202.6 \pm 157.3$	$89.6 \pm 25.1$	$119.8 \pm 36.4^a$	$348.3 \pm 165.1^{a,b}$	$360.7 \pm 98.4^{a,b}$	>0.001

Data are reported as number and percentage or mean  $\pm$  SD. \* Significance was assessed by the Kruskal–Wallis test. For conversion of traditional units to SI units, multiply by 0.0259 for cholesterol (mmol/L), and 0.01129 for triglycerides (mmol/L).

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  for comparison to control group, <sup>b</sup>  $P < 0.05$  for comparison to hypercholesterolemic patients (HC) and <sup>c</sup>  $P < 0.05$  for comparison to hypertriglyceridemic patients (HTG) by Mann–Whitney  $U$  test. HC: Hypercholesterolemia; HTG: Hypertriglyceridemia; CHL: combined hyperlipidemia, increased both cholesterol and triglycerides.

### 3.2. Distribution of apoJ in serum

Supplemental Table 2 shows lipid and protein composition of HDL, LDL and VLDL, isolated from the overall population. Using the molar ratio mmol apoJ/mol cholesterol to evaluate the percentage of lipoprotein-bound apoJ, we calculated that 20.5% of circulating apoJ was associated with lipoproteins, and 79.5% was thus circulating lipoprotein-free in serum (apoJ-LPDS) (Fig. 1A). As expected, apoJ bound to lipoproteins was mainly present in HDL (18.5% from total serum apoJ) and only 2% was associated with apoB-containing lipoproteins (0.9% in LDL and 1.1% in VLDL from total serum apoJ,  $P = 0.010$ ) (Fig. 1A).

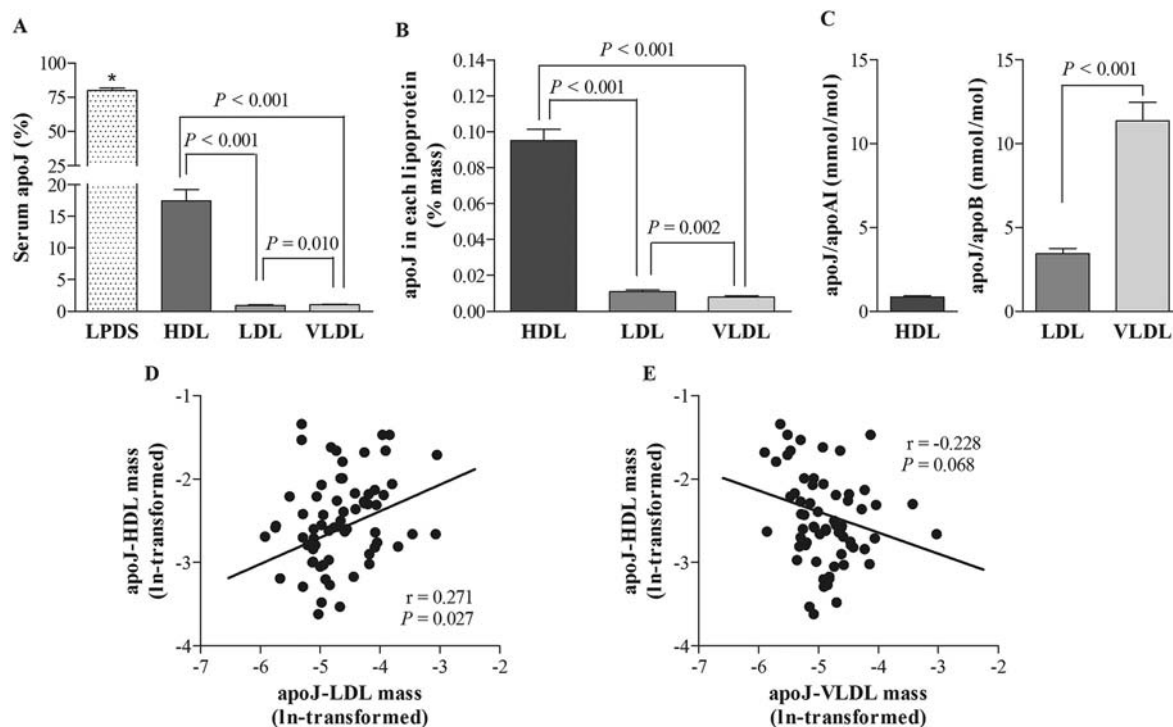
The amount of apoJ bound to HDL represents  $0.095 \pm 0.054\%$  of the HDL total mass (Fig. 1B), and the apoJ/apoA-I molar ratio was  $0.87$  mmol apoJ/mol apoA-I in HDL (Fig. 1C). Regarding apoB-containing lipoproteins, the relative apoJ mass was higher in LDL than in VLDL ( $0.012 \pm 0.008\%$  and  $0.009 \pm 0.006\%$ ; respectively,  $P = 0.010$ ) (Fig. 1B). In turn, because the percentage of apoB in LDL particles is higher than in VLDL particles ( $25.77 \pm 1.75\%$  in LDL versus  $5.80 \pm 1.71\%$  in VLDL,  $P = 0.010$ , Supplemental Table 2), the apoJ/apoB molar ratio was 3.3-fold increased in VLDL compared to LDL ( $11.35 \pm 9.18$  mmol apoJ/mol apoB in VLDL versus  $3.44 \pm 2.58$  mmol apoJ/mol apoB in LDL, respectively,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1C). The content of apoJ in HDL correlated positively with its content in LDL ( $r = 0.271$ ,  $P = 0.027$ ), and showed a negative trend to the content of apoJ in VLDL ( $r = -0.228$ ,  $P = 0.068$ ) (Fig. 1D–E). No significant correlation was observed between the apoJ content in LDL and VLDL ( $r = 0.141$ ,  $P = 0.242$ ). These results suggest that there could be interplay between the levels of apoJ in lipoproteins and that apoJ might shift from HDL to VLDL particles.

### 3.3. Association of the apoJ content in lipoproteins with parameters of the lipoprotein profile

ApoJ-HDL content correlated positively with serum HDL-C and correlated inversely with serum VLDL-C and triglyceride concentrations (Supplemental Fig. 2A–C). The same significant correlations were observed between the apoJ content in LDL and the lipid profile (Supplemental Fig. 2D–F). Opposite correlations were observed between apoJ content in VLDL and lipid profile: apoJ-VLDL correlated inversely to serum HDL-C, but positively correlated to serum VLDL-C and triglycerides (Supplemental Fig. 2G–I).

### 3.4. Association of the apoJ content in lipoproteins with other lipid and protein components of lipoproteins

We analyzed the correlations between the apoJ content in each lipoprotein and their main protein and lipid components in the

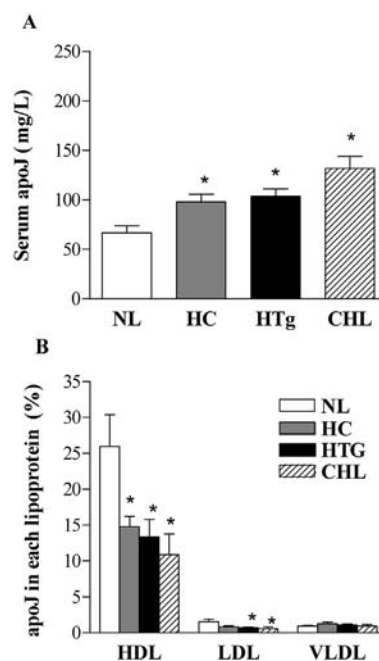


**Fig. 1.** Relative distribution of apoJ in serum and association of the apoJ content between lipoproteins in the overall study population (n = 70). A) Relative proportion of apoJ among LPDS, HDL, LDL and VLDL; B) Percentage of mass corresponding to apoJ in each lipoprotein fraction; C) Ratio apoJ/apoA-I in HDL, and apoJ/apoB in LDL and VLDL, expressed as mmol/mol; D) Correlation analysis between the content of apoJ (% of the lipoprotein mass, ln-transformed) in HDL and LDL; E) Correlation analysis between the content of apoJ (% of the lipoprotein mass, ln-transformed) in HDL and VLDL. Pearson r values are indicated. Data are expressed as mean ± SEM. \*Significant differences between lipoprotein-free (apoJ-LPDS) and lipoprotein-bound apoJ to HDL, LDL and VLDL ( $P < 0.001$ ).

overall population. The content of apoJ in HDL correlated positively with apoA-I and cholesterol content, and negatively with apoA-II and triglyceride content (Supplemental Fig. 3A–D). The LDL content of apoJ correlated positively with cholesterol content and negatively with apoB, apoE and apoC-III content (Supplemental Fig. 3E–H). No correlation was found between the apoJ content in VLDL and the other VLDL components.

### 3.5. Total serum apoJ is increased in subjects with hyperlipidemia

The associations observed between the apoJ content in lipoproteins and the parameters of lipoprotein profile suggest that hyperlipidemic subjects could present an abnormal plasma concentration and/or distribution of apoJ among serum fractions. To confirm this, subjects were classified according to the presence of overt hyperlipidemia. Forty-eight subjects (27 males and 21 females, age  $58.5 \pm 14.1$  years) presented overt hyperlipidemia, including either hypertriglyceridemia (n = 23, HTG group), hypercholesterolemia (n = 20, HC group) and combined hyperlipidemia (n = 5, CHL group). Twenty-two subjects presented normal lipid levels (NL group, 12 males and 10 females,  $57.9 \pm 16.5$  years). The lipid profile of these groups is shown in Table 1. As expected, total cholesterol, LDL-C and VLDL-C and triglyceride concentrations were significantly increased in hyperlipidemic participants. Hypertriglyceridemic subjects also showed lower HDL-C values than the control group. Serum apoJ concentration was significantly higher in hyperlipidemic participants than in the NL group ( $104.1 \pm 35.3$  mg/L vs.  $66.7 \pm 33.8$  mg/L, respectively;  $P < 0.001$ , Fig. 2A). No difference was observed between HC, HTG and CHL subjects ( $98.2 \pm 33.7$  mg/L,  $103.3 \pm 36.8$  mg/L and  $131.7 \pm 26.8$  mg/L;  $P = 0.136$ , respectively) (Fig. 2A).



**Fig. 2.** Serum concentration and distribution of apoJ in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. A) Concentration of apoJ in serum; B) Relative proportion of apoJ among HDL, LDL and VLDL. Data are expressed as mean ± SEM. \*Significant differences versus NL subjects ( $P < 0.05$ ).



3.6. ApoJ distribution is altered in subjects with hyperlipidemia

Next, we determined the distribution of circulating apoJ bound to lipoproteins or in lipoprotein-free form, and its association with hyperlipidemia. Approximately 30% of circulating apoJ was associated to lipoproteins in the NL group whereas this proportion rounded 15% in the 3 hyperlipidemic groups. The decrease in the proportion of apoJ bound to lipoproteins was due to significantly lower amounts of circulating apoJ associated with HDL and LDL in hyperlipidemic patients ( $P = 0.040$  and  $P = 0.046$ , respectively), whereas the percentage of apoJ bound to VLDL did not differ between the NL group and hyperlipidemic participants (Fig. 2B). No differences were observed between HC, HTG and CHL participants.

3.7. Alterations of lipoprotein composition in subjects with hyperlipidemia

The abnormal content of apoJ in lipoproteins from hyperlipidemic subjects could be related to alterations in other lipid and protein components from lipoproteins. Table 2 shows the relative content of lipids and proteins in VLDL, LDL and HDL isolated from subjects according to their lipid levels.

Regarding HDL, HTG patients showed marked compositional changes in cholesterol-, triglycerides-, apoA-I-, apoA-II–HDL (Table 2) compared to the NL group, whereas HDL from HC patients showed a composition similar to HDL from NL subjects. The only

differences with respect to the NL group, difference shared by the HC and HTG groups, were the content of apoJ and apoC-III. ApoJ content in HDL was decreased, whereas apoC-III was increased in both HC and HTG groups when compared to the NL group (Table 2).

LDL from the four studied groups showed marked composition differences (Table 2). The HTG and CHL groups had a low content of cholesterol and phospholipids in LDL and a high content of triglycerides and apoB. LDL from HC subjects had fewer triglycerides and more apoB than LDL from HTG patients. The content of apoJ in LDL was significantly decreased in the HTG group ( $0.009 \pm 0.004\%$  apoJ mass in HTG) compared to the NL group (Table 2). In contrast, hyperlipidemic groups showed a higher amount of apoC-III in LDL than NL subjects (Table 2). No difference was observed between groups in apoE content in LDL.

Regarding VLDL, HTG and CHL groups presented more triglycerides and less cholesterol and apoB than VLDL from NL and HC groups. VLDL from HC patients had less apoB than VLDL from NL subjects (Table 2). No differences in the apoJ content (% apoJ mass) on VLDL were observed between the NL group and hyperlipidemic participants (Table 2). Finally, VLDL from HTG and CHL groups had more apoC-III and less apoE than VLDL from the NL and HC groups (Table 2).

In agreement with the lower content of apoJ in HDL and LDL from hyperlipidemic subjects (Fig. 2), the molar ratios apoJ/apoA-I in HDL particles and apoJ/apoB in LDL were also decreased in hyperlipidemic subjects (Table 2). In contrast, an increased apoJ/

**Table 2**  
Composition of lipoproteins from subjects classified according to lipid levels.

	NL (n = 22)	Hyperlipidemia			* P-value
		(HC; n = 20)	(HTG, n = 23)	(CHL; n = 5)	
<b>HDL composition</b>					
Free Cholesterol <sup>1</sup>	2.75 ± 0.47	3.05 ± 0.67	2.27 ± 0.45 <sup>a,b</sup>	2.51 ± 0.25	<0.001
Esterified Cholesterol	13.99 ± 1.27	14.39 ± 1.26	11.46 ± 1.67 <sup>a,b</sup>	11.97 ± 1.32 <sup>a,b</sup>	<0.001
Triglycerides	5.02 ± 1.07	4.23 ± 1.17 <sup>a</sup>	7.90 ± 1.53 <sup>a,b</sup>	7.05 ± 1.15 <sup>a,b</sup>	<0.001
Phospholipids	26.59 ± 1.40	27.17 ± 2.18	26.33 ± 1.65	26.75 ± 0.97	0.575
Protein	51.64 ± 1.72	51.15 ± 2.74	52.01 ± 1.98	51.71 ± 2.77	0.453
apoA-I	38.67 ± 1.56	38.99 ± 2.19	37.10 ± 1.79 <sup>1a,b</sup>	36.88 ± 2.03	<0.001
apoA-II	10.67 ± 1.35	9.55 ± 3.49	12.44 ± 2.03 <sup>a,b</sup>	12.49 ± 0.83 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoC-III	1.48 ± 0.47	1.75 ± 0.33	1.83 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.47	0.253
apoE	0.64 ± 0.22	0.71 ± 0.21	0.56 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.18	0.131
apoJ	0.13 ± 0.06	0.09 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.004
Ratio apoJ/apoA-I <sup>2</sup>	1.17 ± 0.59	0.81 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.006
<b>LDL composition</b>					
Free Cholesterol	9.66 ± 0.73	9.97 ± 1.03	7.42 ± 1.20 <sup>a,b</sup>	7.59 ± 0.90 <sup>a,b</sup>	<0.001
Esterified Cholesterol	29.07 ± 3.44	29.18 ± 2.19	25.60 ± 3.34 <sup>a,b</sup>	25.34 ± 1.68 <sup>a,b</sup>	<0.001
Triglycerides	9.80 ± 2.62	7.66 ± 1.93 <sup>a</sup>	14.67 ± 4.57 <sup>a,b</sup>	12.33 ± 3.30 <sup>b</sup>	<0.001
Phospholipids	25.84 ± 0.77	26.55 ± 1.29	24.42 ± 1.49 <sup>a,b</sup>	24.89 ± 1.24 <sup>b</sup>	<0.001
Protein	25.60 ± 1.56	27.75 ± 1.23 <sup>a</sup>	27.86 ± 2.28 <sup>a,b</sup>	29.84 ± 1.10 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoB	24.82 ± 1.46	26.22 ± 1.52 <sup>a</sup>	26.19 ± 1.91 <sup>a</sup>	28.09 ± 1.13 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoC-III	0.23 ± 0.15	0.36 ± 0.25	1.12 ± 0.58 <sup>a,b</sup>	1.28 ± 0.58 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoE	0.47 ± 0.19	0.44 ± 0.15	0.52 ± 0.21	0.45 ± 0.25	0.557
apoJ	0.014 ± 0.01	0.012 ± 0.01	0.009 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.008 ± 0.009	0.036
Ratio apoJ/apoB <sup>2</sup>	4.12 ± 2.62	4.10 ± 3.34	2.49 ± 1.19 <sup>a</sup>	2.09 ± 2.42 <sup>b</sup>	0.032
<b>VLDL composition</b>					
Free Cholesterol	6.40 ± 1.17	5.94 ± 1.62	5.58 ± 0.95 <sup>a</sup>	5.32 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.051
Esterified Cholesterol	16.63 ± 3.05	16.60 ± 4.98	11.17 ± 3.09 <sup>a,b</sup>	11.24 ± 1.57 <sup>a,b</sup>	<0.001
Triglycerides	47.01 ± 4.97	49.47 ± 6.64	56.62 ± 5.88 <sup>a,b</sup>	56.53 ± 1.56 <sup>a,b</sup>	<0.001
Phospholipids	17.99 ± 2.32	17.46 ± 3.56	17.58 ± 1.66	17.77 ± 0.24	0.629
Protein	11.86 ± 1.43	10.44 ± 1.36 <sup>a</sup>	8.94 ± 1.33 <sup>a,b</sup>	9.06 ± 0.58 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoB	7.23 ± 1.29	5.76 ± 1.75 <sup>a</sup>	4.70 ± 1.05 <sup>a,b</sup>	4.47 ± 0.38 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoC-III	2.06 ± 0.47	2.07 ± 0.71	2.68 ± 0.63 <sup>a,b</sup>	2.92 ± 0.41 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoE	2.54 ± 0.61	2.58 ± 1.14	1.54 ± 0.56 <sup>a,b</sup>	1.65 ± 0.29 <sup>a,b</sup>	<0.001
apoJ	0.011 ± 0.01	0.008 ± 0.003	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.002	0.988
Ratio apoJ/apoB <sup>2</sup>	7.27 ± 4.46	10.50 ± 7.73 <sup>a</sup>	12.54 ± 7.12 <sup>a</sup>	11.54 ± 4.37	0.126

Data (mean ± SD) are reported as relative proportion of lipoprotein mass <sup>1</sup>, or as the ratio mmol apoJ/mol apoB or A-I <sup>2</sup>. \* Significance was assessed by the Kruskal–Wallis test. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  compared vs. control group, and <sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs. hypercholesterolemic subjects, by the Mann–Whitney  $U$  test. The amount of each component is expressed as the percentage of the mass of cholesterol, triglycerides and phospholipids, and the selected apolipoproteins measured in each lipoprotein fraction. HC: Hypercholesterolemia; HTG: Hypertriglyceridemia, CHL: Combined hyperlipidemia.

apoB molar ratio was observed in VLDL from hyperlipidemic subjects (Table 2).

### 3.8. Comparison of lipoprotein isolation by KBr ultracentrifugation (UC) with D<sub>2</sub>O/sucrose UC or with size exclusion chromatography (SEC)

In parallel to KBr UC, lipoproteins isolated from 6 subjects selected in our Lipid Department were also isolated by sucrose/D<sub>2</sub>O UC. The distribution of apoJ among lipoproteins and LPDS was similar with both methods (Fig. 3). We also measured the content of apoE, apoC-III, apoA-I and apoA-II in lipoproteins (Supplemental Table 3). We found a lower content of apoC-III in LDL and VLDL and of apoE in HDL isolated by KBr UC when compared with lipoproteins isolated using sucrose/D<sub>2</sub>O UC. However, the content of apoJ in lipoproteins was similar whatever the method used. These results demonstrate that the KBr method does not alter the distribution of apoJ in serum when compared with a low ionic strength method such as sucrose/D<sub>2</sub>O ultracentrifugation. These results indicate that ultracentrifugation using KBr gradients is suitable to evaluate the distribution of apoJ among lipoproteins and in lipoprotein non-bound form.

## 4. Discussion

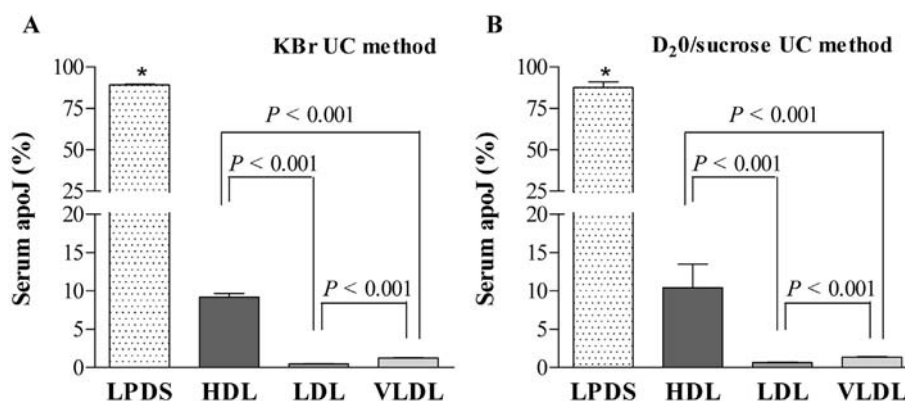
Recent studies have highlighted the role of apoJ associated to lipoproteins. The content of apoJ in lipoproteins is altered in patients with coronary heart disease or with CVR factors, including obesity, insulin resistance and dyslipidemia [13,14,29,32]. It has been shown that a low content of apoJ in HDL may compromise the anti-apoptotic function of this lipoprotein in patients with coronary heart disease [13]. However, although it is known that apoJ co-exist either in lipoprotein-bound or lipoprotein-non bound forms in blood, its relative proportion between the different lipoprotein fractions and in lipoprotein-non bound form has not been previously reported. To our knowledge, only Hoofnagle et al. [14] have reported data on the relative content of apoJ in HDL, but these authors did not separate VLDL from LDL. Moreover, the study by Hoofnagle et al. used a proteomic approach and expressed the apoJ content in lipoproteins as arbitrary units. Similar methodological approaches have been used by other authors [13,29,33–35] and, in all cases, arbitrary units, number of peptides detected or peak areas were used to express the content of apoJ in lipoproteins. This prevents an accurate comparison between studies.

The present study has determined, for the first time, the distribution of apoJ among VLDL, LDL, HDL and LPDS. Our data show

that the apoJ concentration in serum is highly dependent on the lipoprotein profile and is higher in hyperlipidemic subjects than in NL subjects. Moreover, the increase of serum apoJ concentration in hyperlipidemia favors an abnormal distribution of apoJ among LPDS, HDL, LDL and VLDL, showing a lower content of apoJ associated to lipoproteins from hyperlipidemic subjects. Analysis of the overall population shows that total serum apoJ concentrations are closely associated to high total cholesterol, VLDL-C and triglyceride concentration. This was confirmed when patients were classified according to their lipid levels, with hyperlipidemic patients presenting higher serum levels of apoJ than subjects with normal lipid levels.

We also observed an inverse association between the content of apoJ in HDL and that in VLDL. This result suggests that there could be interplay between the levels of apoJ in HDL and VLDL, and that apoJ might shift from HDL to triglyceride-rich lipoproteins. This concurs with data by Hoofnagle et al., who proposed that insulin resistance shifts apolipoproteins from HDL to apoB-containing lipoproteins. Interestingly, although we found that serum apoJ was higher in hyperlipidemic subjects, its relative content associated to lipoproteins was lower than in normolipidemic subjects. This suggests that the binding of apoJ to lipoproteins in plasma is not concentration-dependent, but depends on other factors. One of these factors could be alterations in the lipoprotein composition in hyperlipidemic subjects. Our data reveal that hyperlipidemia, particularly hypertriglyceridemia, may influence the amount of apoJ associated to HDL and LDL.

The correlation analysis conducted on the overall population indicated that the content of apoJ in lipoproteins is related to their composition. In HDL, apoJ binds preferentially to particles with a relatively high content of apoA-I and cholesterol, whereas HDL particles enriched in apoA-II and triglycerides have less apoJ. In addition, the content of apoA-II was increased in HDL from HTG patients, whereas the apoJ content was lower than in NL subjects. This observation suggests an inverse relationship of apoJ with apoA-II. Although consensus is lacking regarding the composition of HDL and cardiovascular risk, it is generally considered that HDL with more apoA-I and/or cholesterol is more atheroprotective than HDL with a higher content of apoA-II and/or triglycerides [36–38]. This indicates that apoJ associates with HDL particles having a higher antiatherogenic capacity, those with more cholesterol and apoA-I. Regarding LDL, its apoJ content correlated positively with cholesterol and negatively with apoB, indicating apoJ preferably binds to large LDL particles rather than to small particles. This could be related to the decrease of apoJ in LDL from hypertriglyceridemic patients, known to have smaller size than LDL from



**Fig. 3.** Distribution of apoJ according to the lipoprotein isolation method. Relative proportion of apoJ in LPDS, HDL, LDL and VLDL using the KBr UC method (A) or the D<sub>2</sub>O/sucrose UC method (B). Data are the mean  $\pm$  SEM of 6 subjects. \* Significant differences (Wilcoxon t test) between lipoprotein-free (apoJ-LPDS) and lipoprotein-bound apoJ to HDL, LDL and VLDL ( $P < 0.001$ ).

normolipidemic subjects [39,40].

A common characteristic observed in all lipoproteins from the three groups is that the higher the content of apoJ, the lower the content of apoC-III. This observation concurs with data by Riwanto et al., who obtained similar findings analyzing HDL from patients with coronary disease. These authors reported that reduced HDL-associated apoJ and an increased HDL-associated apoC-III impair the anti-apoptotic activity of HDL. According to this reasoning, it could be speculated that HDL from hyperlipidemic subjects could also have compromised its anti-apoptotic function. Studies addressing this function are needed. Another inverse relationship was observed between triglycerides and apoJ content in all lipoproteins, suggesting that triglyceride-enriched lipoproteins, characteristic of hypertriglyceridemia, prevent the binding of apoJ. This could explain, at least in hypertriglyceridemic subjects, the relative decrease of apoJ associated to lipoproteins even though its concentration in serum is higher than in normolipidemic subjects.

In summary, our study indicates that hyperlipidemia increases the concentration of apoJ in serum but, in turn, the content of apoJ associated to lipoproteins decreases, mainly in HDL and LDL. The results suggest that apoJ shifts from HDL to VLDL and LPDS in hyperlipidemic subjects. The association of apoJ to lipoproteins might be modulated by its composition, and increased apoC-III and triglyceride content in lipoproteins appear as possible factors for preventing the binding of apoJ to lipoproteins. The main limitation of our study is the relatively low number of subjects analyzed and, therefore, our findings must be confirmed studying a large number of subjects and assessing the effect of lipid-lowering drugs. Mechanistic studies addressing the role of apoJ associated to lipoproteins are necessary to weigh up the relevance of the alterations in the apoJ content of lipoproteins observed in hyperlipidemic subjects.

### Conflict of interest

None declared.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Carolyn Newey (IIB Sant Pau) for editorial assistance.

This work was supported by grants from Spanish Ministry of Health (ISCIII/FIS) PI10/00265, and PI13/00364 to JLS-Q. MMB, AR, MPC, JO-L and JLS-Q are members of the Quality Research Group 2014 SGR 246 from Generalitat de Catalunya and of the Cardiovascular Research Network (RIC, RD12/0042/0043) from ISCIII. A.R. is the receipt of a "Sara Borrell" post-doctoral contract (CD12/00439, Ministerio de Sanidad, Fondo de Investigación Sanitaria-FIS, Spain). MM-B is the receipt of a grant from the Spanish Society of Clinical Biochemistry/Jose Luis Castaño Foundation.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.003>.

### References

- [1] I.P. Trougakos, The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches – a mini-review, *Gerontology* 59 (2013) 514–523.
- [2] J.J. Yerbury, S. Poon, S. Meehan, et al., The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures, *FASEB J.* 21 (2007) 2312–2322.
- [3] H.V. de Silva, W.D. Stuart, C.R. Duvic, et al., A 70-kDa apolipoprotein designated apoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13240–13247.
- [4] H.V. de Silva, W.D. Stuart, Y.B. Park, et al., Purification and characterization of apolipoprotein J, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14292–14297.
- [5] B.J. Aronow, S.D. Lund, T.L. Brown, et al., Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 725–729.
- [6] H.V. de Silva, J.A. Harmony, W.D. Stuart, et al., Apolipoprotein J: structure and tissue distribution, *Biochemistry* 29 (1990) 5380–5389.
- [7] Y. Ishikawa, T. Ishii, Y. Akasaka, et al., Immunolocalization of apolipoproteins in aortic atherosclerosis in American youths and young adults: findings from the PDAY study, *Atherosclerosis* 158 (2001) 215–225.
- [8] Y. Ishikawa, Y. Akasaka, T. Ishii, et al., Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 665–672.
- [9] B. Mackness, R. Hunt, P.N. Durrington, et al., Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 1233–1238.
- [10] M. Miyata, S. Biro, H. Kaieda, et al., Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury, *Circulation* 104 (2001) 1407–1412.
- [11] J. Cubedo, T. Padro, X. Garcia-Moll, et al., Proteomic signature of apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 211–220.
- [12] J.C. Won, C.Y. Park, S.W. Oh, et al., Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation, *PLoS One* 9 (2014) e103351.
- [13] M. Riwanto, L. Rohrer, B. Roschitzki, et al., Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling, *Circulation* 127 (2013) 891–904.
- [14] A.N. Hoofnagle, M. Wu, A.K. Gosmanov, et al., Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 2528–2534.
- [15] M.V. Poulakou, K.I. Paraskevas, I.S. Vlachos, et al., Effect of statins on serum apolipoprotein J and paraoxonase-1 levels in patients with ischemic heart disease undergoing coronary angiography, *Angiology* 59 (2008) 137–144.
- [16] M.V. Poulakou, K.I. Paraskevas, M.R. Wilson, et al., Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease, *In Vivo* 22 (2008) 537–542.
- [17] T. Kujiraoka, H. Hattori, Y. Miwa, et al., Serum apolipoprotein J in health, coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus, *J. Atheroscler. Thromb.* 13 (2006) 314–322.
- [18] C. Morrissey, J. Lakins, A. Moquin, et al., An antigen capture assay for the measurement of serum clusterin concentrations, *J. Biochem. Biophys. Methods* 48 (2001) 13–21.
- [19] M. Navab, S. Hama-Levy, B.J. Van Lenten, et al., Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2005–2019.
- [20] M. Navab, G.M. Anantharamaiah, S.T. Reddy, et al., An oral apoJ peptide renders HDL antiinflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1932–1937.
- [21] G.J. Kelso, W.D. Stuart, R.J. Richter, et al., Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma, *Biochemistry* 33 (1994) 832–839.
- [22] H.Y. Sun, S.F. Chen, M.D. Lai, et al., Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins, *Clin. Chim. Acta* 411 (2009) 336–344.
- [23] H. Karlsson, P. Leanderson, C. Tagesson, et al., Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Proteomics* 5 (2005) 551–565.
- [24] C. Bancellis, F. Canals, S. Benitez, et al., Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3508–3515.
- [25] M. Schwarz, L. Spath, C.A. Lux, et al., Potential protective role of apolipoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity, *Thromb. Haemost.* 100 (2008) 110–118.
- [26] M. Martinez-Bujidos, A. Rull, B. Gonzalez-Cura, et al., Clusterin/apolipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation, *FASEB J.* 29 (2015) 1688–1700.
- [27] I.P. Trougakos, M. Poulakou, M. Stathatos, et al., Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction, *Exp. Gerontol.* 37 (2002) 1175–1187.
- [28] I.P. Trougakos, E.S. Gonos, Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 1430–1448.
- [29] C. Pettersson, H. Karlsson, M. Stahlman, et al., LDL-associated apolipoprotein J and lysozyme are associated with atherogenic properties of LDL found in type 2 diabetes and the metabolic syndrome, *J. Intern. Med.* 269 (2011) 306–321.
- [30] R.J. Havel, H.A. Eder, J.H. Bragdon, The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J. Clin. Invest.* 34 (1955) 1345–1353.
- [31] M. Stahlman, P. Davidsson, I. Kanmert, et al., Proteomics and lipids of lipoproteins isolated at low salt concentrations in D2O/sucrose or in KBr, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 481–490.
- [32] S. Park, K.W. Mathis, I.K. Lee, The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15 (2014) 45–53.

- [33] T. Vaisar, S. Pennathur, P.S. Green, et al., Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 746–756.
- [34] E. Burillo, R. Mateo-Gallego, A. Cenarro, et al., Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome, *Lipids Health Dis.* 11 (2012) 116.
- [35] T. Arnold, S. Brandlhofer, K. Vrtikapa, et al., Effect of obesity on plasma clusterin, [corrected] a proposed modulator of leptin action, *Pediatr. Res.* 69 (2011) 237–242.
- [36] H. Allayee, L.W. Castellani, R.M. Cantor, et al., Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia, *Circ. Res.* 92 (2003) 1262–1267.
- [37] D.C. Chan, T.W. Ng, G.F. Watts, Apolipoprotein A-II: evaluating its significance in dyslipidaemia, insulin resistance, and atherosclerosis, *Ann. Med.* 44 (2012) 313–324.
- [38] C.R. White, D.W. Garber, G.M. Anantharamaiah, Anti-inflammatory and cholesterol-reducing properties of apolipoprotein mimetics: a review, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2007–2021.
- [39] Y.C. Huang, P.Y. Chang, J.S. Hwang, et al., Association of small dense low-density lipoprotein cholesterol in type 2 diabetics with coronary artery disease, *Biomed. J.* 37 (2014) 375–379.
- [40] S.B. Sharma, S. Garg, Small dense LDL: risk factor for coronary artery disease (CAD) and its therapeutic modulation, *Indian J. Biochem. Biophys.* 49 (2012) 77–85.







A lo largo de las últimas décadas han ido apareciendo evidencias que muestran la existencia de una relación entre la apoJ y el desarrollo de arteriosclerosis. Una evidencia básica es que la expresión y la deposición de apoJ están aumentadas en zonas de lesión arteriosclerótica mientras que está ausente en la pared arterial sana [133]. Las células de la pared arterial sintetizan y excretan apoJ, que puede jugar diferentes papeles durante la evolución de la lesión arteriosclerótica, como se ha comentado en la introducción. Pero además de la apoJ expresada por las células de la pared arterial, existe una porción significativa de la apoJ que se halla asociada a las lipoproteínas, tanto en la pared arterial como en la circulación plasmática [112]. La presente tesis se ha centrado en este segundo aspecto.

Es relativamente conocido el papel estabilizador de la apoJ sobre la funcionalidad de la HDL. Sin embargo, el papel de la apoJ sobre las propiedades aterogénicas de la LDL es prácticamente desconocido. De igual manera, aunque se sabe que la apoJ está presente en plasma en forma libre o unida a las lipoproteínas, ningún estudio ha analizado de una manera cuantificable la distribución relativa de la apoJ entre las diferentes lipoproteínas y en forma libre. Estos dos aspectos son los analizados en las dos publicaciones que conforman la presente Tesis.

### **1. ARTÍCULO 1: PAPEL DE LA APOJ EN LA AGREGACIÓN DE LA LDL.**

Diversos estudios han mostrado un papel protector de la apoJ en la HDL. Los estudios se centraron en la HDL ya que durante mucho tiempo se consideró que la apoJ únicamente se asociaba a esta lipoproteína. Sin embargo, los recientes análisis proteómicos que han analizado la composición de VLDL y LDL humana han detectado apoJ en estas partículas [60, 115, 120], aunque su contenido de apoJ es mucho más bajo que en la HDL.

### **1.1 CONTENIDO DE APOJ EN LAS SUBFRACCIONES DE LA LDL (LDL(+) , nagLDL(-) Y agLDL(-)).**

La primera observación relevante del artículo 1 es el diferente contenido de apoJ en las distintas subfracciones de LDL aisladas del plasma. Aunque el contenido de apoJ es muy bajo en todas las fracciones de la LDL, éste es 6 veces superior en la LDL(-) respecto a la LDL(+), y dentro de las fracciones de LDL(-), es 7 veces superior en la fracción de LDL(-) agregada (agLDL(-)) respecto a la LDL(-) no agregada (nagLDL(-)). Es decir, que la apoJ es mucho más abundante en las fracciones de LDL con mayor potencial aterogénico.

Esta observación se presta a una doble interpretación. Por una parte, podría pensarse que la apoJ contribuye de alguna manera a la aterogenicidad de estas partículas. En contrapartida, también puede considerarse que su presencia es debida a que podría representar una función protectora frente a la modificación de la LDL. Considerando la función chaperona de la apoJ, uniéndose a los dominios hidrofóbicos de proteínas que quedan expuestos en su superficie durante su desnaturalización [87], es factible pensar que la apoJ se una preferentemente a la LDL(-) cuando estas partículas sufren algún tipo de modificación que estimule el proceso de agregación. El hecho de que el contenido en apoJ en la LDL(-) no agregada ya sea más elevado que en la LDL(+) indica que no es imprescindible que exista una agregación real de la LDL para la unión de la apoJ. Este hallazgo podría interpretarse como que la apoJ se uniría a zonas hidrofóbicas que se generan en la LDL(-) durante las fases más tempranas del proceso de agregación, previniendo que la agregación de la LDL llegue a ser efectiva.

### **1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA LDL QUE CONTIENE apoJ (LDL/J+).**

Con el fin de confirmar la observación de un mayor contenido de apoJ en las fracciones de LDL(-), se utilizó la estrategia contraria, es decir, se aislaron las

partículas de LDL con apoJ y se determinó si sus características se correspondían con las de las fracciones de LDL(-). Mediante cromatografía de afinidad se obtuvieron dos fracciones de LDL, la que no contiene apoJ (LDL/J-) (> 99.7%) y la que contiene apoJ (LDL/J+) (< 0.3%). El contenido de apoJ de estas subfracciones y de la LDL total fue comprobado por ELISA y Western blot. Las características físico-químicas de estas fracciones se estudiaron por varias técnicas, aunque debido a la pequeña cantidad de LDL/J+ no pudo realizarse un análisis más exhaustivo.

La mayor parte de resultados indican un alto grado de similitud entre la agLDL(-) y la LDL/J+. Respecto a la composición lipídica, la LDL total y la LDL/J- presentan una composición similar, mientras que la LDL/J+ contiene menos colesterol esterificado y más colesterol libre, triglicéridos, NEFAS y apoE, características que también comparte con la agLDL(-). La electroforesis de SDS-PAGE mostró la degradación de la apoB en la LDL/J+ apoJ, al igual que muestra la agLDL(-). En la electroforesis en gel de gradiente no desnaturizante, tanto en la LDL como en la LDL/J- se muestra una única banda del monómero de LDL, mientras que en la LDL/J+ se aprecian dos bandas, la monomérica y una banda superior que indica agregación, es decir, conviven partículas monoméricas con partículas agregadas. Mediante microscopía electrónica se puede observar que la LDL/J- presenta una composición de partículas monoméricas de un tamaño muy regular, mientras que la LDL/J+ presenta partículas muy heterogéneas en tamaño, estando algunas de ellas agregadas. No obstante, las partículas monoméricas siguen siendo las más abundantes. Esta observación está de acuerdo con la idea, planteada en el apartado anterior, de que la apoJ se une a partículas agregadas, pero también a partículas de LDL no agregadas. El análisis de la estructura de la apoB por dicroísmo circular (CD) y ATR-FTIR muestra que la LDL/J+ presenta una pérdida de estructura secundaria (disminución de señal en el espectro de CD, y desplazamiento del máximo en el ATR-FTIR), lo cual es compatible, tanto con

una agregación parcial, como con alteraciones en la apoB que todavía no han dado lugar a agregación.

### **1.3 PAPEL DE LA apoJ EN LA AGREGACIÓN DE LA LDL. DEPLECIÓN DE LDL/J+.**

De los resultados discutidos anteriormente solo puede afirmarse que la apoJ es más abundante en las partículas de LDL agregadas, y aunque su presencia en LDLs no agregadas podría sugerir un papel preventivo en el proceso de agregación, no se puede saber cuál es su función específica. Por ello, fue necesario llevar a cabo experimentos para definir el papel pro- o anti-agregante de la apoJ. Sin embargo, la cantidad que se puede aislar de LDL/J+ es tan pequeña que evita un análisis detallado que permita determinar la función de la apoJ. En contrapartida, la coincidencia prácticamente total entre las características de la LDL total y la LDL/J- si que permite hacer un análisis comparativo para determinar el efecto de la ausencia de apoJ sobre el proceso de agregación de la LDL.

Para analizar el papel de la apoJ en la agregación de la LDL se indujo la agregación de la LDL total y la LDL/J- por diferentes métodos, incluyendo agregación espontánea, lipólisis con esfingomielinasa (SMasa) y proteólisis con  $\alpha$ -quimotripsina ( $\alpha$ -CT). Con cualquiera de los métodos utilizados, y a pesar de que la cantidad de LDL/J+ en la LDL total es muy pequeña (siempre inferior al 0.3%), se vio que la LDL/J- es más susceptible a agregarse que la LDL total. Estos datos demuestran que, a pesar de su escasez, la apoJ juega un papel protector muy importante en el proceso de agregación de la LDL. Los análisis mediante CD y ATR-FTIR confirman que aumenta la agregación inducida con SMasa (disminución de señal en el CD y desplazamiento de máximo en ATR-FTIR) en la LDL/J- pero no en la LDL total. El hecho de que la disminución de la señal sea más acusada en la región de 208 nm, donde contribuye la  $\alpha$ -hélice, sugiere un enriquecimiento de estructura  $\beta$  de la apoB en la LDL/J-.

Un aspecto no esperado de los resultados fue la observación en los geles de SDS-PAGE de que en la LDL/J- la apoB es más susceptible a la degradación proteolítica que en la LDL total. Esto fue observado tanto cuando la proteólisis fue inducida por la  $\alpha$ -CT, como cuando ésta se produjo de forma espontánea durante el tratamiento con SMasa. No conocemos el mecanismo por el cual la apoJ previene de la degradación a la apoB, pero, este hecho que podría estar involucrado en la prevención de la agregación de la LDL, ya que es bien sabido que la proteólisis de la apoB induce el proceso de agregación.

### **1.4 PAPEL DE LA apoJ EN LA AGREGACIÓN DE LA LDL. ADICIÓN DE apoJ.**

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos de depleción de LDL con apoJ se hicieron los experimentos inversos, esto es, adicionando apoJ purificada de plasma en concentración fisiológica a LDL cuya agregación era inducida mediante tratamiento con  $\alpha$ -CT y SMasa. Estos experimentos confirmaron el papel de la apoJ inhibiendo la agregación de la LDL.

### **1.5 FUNCIÓN ANTIATEROGÉNICA DE LA apoJ ASOCIADA A LA LDL.**

Los datos obtenidos en este primer artículo demuestran un papel protector de la apoJ en un aspecto clave en el desarrollo de la arteriosclerosis, como es la inhibición de la agregación de la LDL, considerado el evento inicial que inicia el proceso arteriosclerótico. Esta función protectora la podría ejercer la apoJ en dos espacios bien diferenciados, la circulación plasmática y el espacio subendotelial.

A nivel de de la circulación plasmática la apoJ podría evitar la formación de partículas agregadas de LDL, partículas que generalmente son lipoproteínas envejecidas que han sido modificadas por mecanismos que las hacen potencialmente más aterogénicas. Pero no solo puede ser importante la inhibición de la agregación de la

LDL, sino que la apoJ podría jugar otro papel protector, que estaría mediado por su capacidad para facilitar el aclaramiento de los espacios extracelulares de proteínas desplegadas o desnaturalizadas. La apoJ tiene un dominio de unión al LRP2 (también conocido como megalina) un receptor de la familia del receptor de LDL, que facilita la internalización de los complejos apoJ/proteína desnaturalizada [134]. Este es el caso del péptido beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer. El LRP2 también participa en la internalización de complejos apoJ/leptina, regulando las vías de señalización de la leptina a nivel del hipotálamo [135]. Existen ciertas discrepancias respecto a si la apoJ es reconocida por otros receptores de la familia del receptor de LDL, pero no puede descartarse que otros receptores pudiesen estar implicados en el reconocimiento de los complejos apoJ/LDL. En cualquier caso, son necesarios estudios dirigidos a determinar si realmente la apoJ facilita el aclaramiento de partículas agregadas de LDL, tanto en circulación plasmática como en otros espacios fisiológicos.

La función de la apoJ en el espacio subendotelial podría ser similar al descrito anteriormente, aunque en este caso es remarcable que la expresión de apoJ está aumentada en la pared arterial lesionada [133], siendo, quizás, un mecanismo para prevenir la agregación de partículas de LDL. Otro aspecto a considerar es que el LRP2 no es expresado por las células de la pared arterial, por lo que los complejos apoJ/LDL deberían ser internalizados por las células a través receptores alternativos. La identificación de estos posibles receptores requiere el desarrollo de futuros estudios.

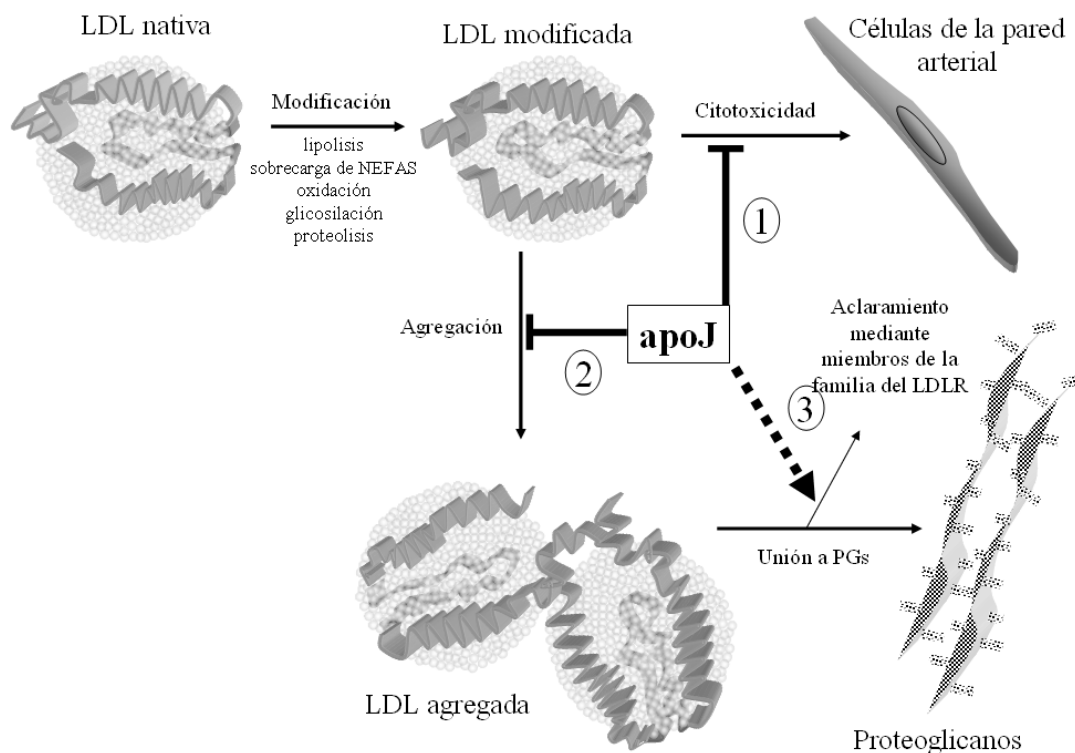
Aparte de nuestro estudio, únicamente otro grupo ha analizado previamente el efecto de la apoJ sobre la LDL (Schwartz et al) [124]. En este estudio los autores demuestran que la apoJ es capaz de inhibir el potencial citotóxico de LDL modificada enzimáticamente (E-LDL) mediante una combinación de proteasas (plasmina) y colesterol éster hidrolasa. La E-LDL tiene propiedades similares a la LDL que se encuentra en las lesiones arterioescleróticas con un contenido elevado de NEFAS y



## DISCUSIÓN

una gran degradación de la apoB, características que hemos visto en la LDL agregada que contiene apoJ. La E-LDL activa el complemento y promueve la formación de células espumosas. Schwartz et al demuestran que la apoJ se une a la E-LDL pero no a la LDL nativa, reduciendo la citotoxicidad de la E-LDL sobre células endoteliales. Además encontraron que en lesiones arterioescleróticas la apoJ se colocaliza con la E-LDL. Estas observaciones están de acuerdo con nuestros resultados en los que describimos que la apoJ se une a la LDL agregada con mucha mayor afinidad que a la LDL total.

En conjunto estos datos indican que la expresión aumentada de apoJ en lesiones arterioescleróticas podría 1) inhibir el potencial citotóxico de la LDL modificada, 2) ser una respuesta inhibitoria a la agregación de la LDL, que es el primer paso de la aterogénesis, y 3) favorecer la captación celular de LDL agregada evitando su acumulación extracelular. La figura muestra esquemáticamente los posibles mecanismos protectores de la apoJ relacionados con la aterogenicidad de la LDL.



## **2. ARTÍCULO 2: DISTRIBUCIÓN DE apoJ EN SUERO Y LIPOPROTEÍNAS.**

### **2.1 CONCENTRACIÓN DE apoJ EN SUERO DE PACIENTES NORMOLIPÉMICOS E HIPERLIPÉMICOS.**

El segundo artículo de la presente tesis analiza en detalle la distribución de la apoJ entre las lipoproteínas y en forma no unida a lipoproteínas. Nuestros datos muestran que la concentración de apoJ en suero es altamente dependiente del perfil lipoproteico, y está asociada positivamente con la concentración de colesterol y triglicéridos. Esto se pone de manifiesto cuando se clasifican los pacientes por su perfil lipídico, ya que los pacientes hiperlipémicos presentan una concentración mayor de apoJ que los normolipémicos indicando que la hiperlipemia favorece la concentración aumentada de apoJ en suero. Esto concuerda con estudios de otros autores que describen que la concentración plasmática de apoJ en pacientes con factores de riesgo cardiovascular como obesidad, resistencia a la insulina y dislipemia se encuentra alterada [102, 126, 128, 131]. Trougakos et al [93, 126], describieron que la concentración plasmática de apoJ está aumentada en pacientes con diabetes tipo 2 o enfermedad coronaria y Kujiraoka et al [102], describieron que la apoJ está aumentada en pacientes obesos y se asocia positivamente con marcadores de inflamación.

### **2.2 DISTRIBUCIÓN DE LA apoJ EN CADA LIPOPROTEÍNA Y EN EL SUERO LIBRE DE LIPOPROTEÍNAS (LPDS).**

Nuestro estudio muestra que del total de la apoJ circulante aproximadamente un 20% está asociado a las lipoproteínas y el 80% en forma libre. Como se esperaba, de la apoJ unida a lipoproteínas la mayor parte se encuentra en la HDL y solo un pequeño porcentaje se encuentra asociado a las lipoproteínas con apoB. Estos porcentajes coinciden aproximadamente con diferentes valores que pueden encontrarse en la

bibliografía, que hablan de entre un 50% y un 80% de apoJ en forma no unida a lipoproteínas [128, 132, 136], y de que la mayor parte de apoJ unida a lipoproteínas está asociada a la HDL. No obstante, hasta ahora no se habían publicado datos precisos en unidades de masa (en lugar de parámetros derivados de análisis proteómicos, expresados como unidades arbitrarias, nº de péptidos o área de picos) sobre la distribución plasmática de la apoJ.

El contenido de apoJ en la HDL correlaciona positivamente con su contenido en la LDL y negativamente con el contenido en la VLDL. Esto sugiere que podría haber un intercambio de apoJ entre la HDL, LDL y VLDL y la apoJ podría desplazarse de la HDL a la VLDL. Esta observación coincide con datos de Hoofnagle y colaboradores [127] que ya postulaban este desplazamiento de la apoJ entre lipoproteínas en función de la presencia o no de dislipemia.

### **2.3 EFECTO DEL PERFIL LIPOPROTEICO EN LA DISTRIBUCIÓN DE LA apoJ EN LAS LIPOPROTEÍNAS.**

Clasificando a los pacientes por el perfil lipídico se observó que en los individuos normolipémicos un 30% de la apoJ está asociada a lipoproteínas, porcentaje que desciende en pacientes hiperlipémicos hasta un 17% en hipercolesterolémicos y un 15% en hipertrigliceridémicos. Esto es debido a que disminuye la concentración de apoJ unida a la LDL y, sobre todo, a la HDL..La siguiente figura muestra esquemáticamente las diferencias en la distribución de apoJ entre normolipemia e hiperlipemia.

Esta observación es relevante, ya que la apoJ contribuye a mantener la capacidad antiaterogénica de la HDL y, como se ha descrito en el artículo 1 de la presente tesis, también juega un papel importante en modular las propiedades aterogénicas de la LDL. Por ello, se puede inferir que la disminución de apoJ asociada a LDL y HDL

podría redundar en una alteración de las propiedades de estas lipoproteínas que las haría potencialmente más aterogénicas.

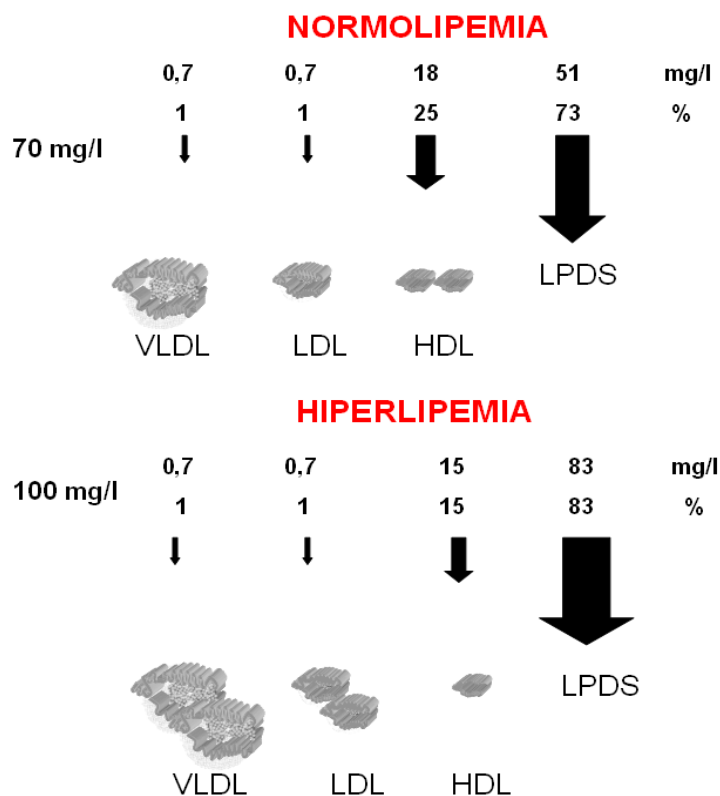
Los estudios que han analizado la concentración de apoJ en las lipoproteínas son escasos pero, en general, indican que la apoJ en la HDL de pacientes con alto riesgo cardiovascular se encuentra disminuida. Hoofnagle et al [127], describieron un menor contenido de apoJ en HDL de pacientes con insulinoresistencia, obesidad y dislipemia. Estos datos fueron confirmados por el estudio de Riwanto et al [128], que muestra que la HDL de pacientes con enfermedad coronaria contiene menos apoJ y más apoC-III que la HDL de individuos sanos. El estudio de Riwanto et al es además muy interesante porque relaciona la disminución de apoJ en la HDL con un menor potencial antiapoptótico. En la misma línea, Burillo et al. [129] describieron que una dieta rica en ácidos grasos  $\omega$ -3 aumentaba el contenido de apoJ en la HDL de individuos fumadores. Sin embargo, en estos estudios o no se analizaron las lipoproteínas con apoB o no se separó la VLDL de la LDL. De manera específica, el contenido de apoJ en la LDL solo ha sido analizado en dos estudios. El primero es el estudio de Karlsson et al [131], que describe que las LDL de pacientes obesos presentan una concentración aumentada de apoJ y apoCIII y disminuida de apoA-I. Pettersson et al [132], confirmaron estos resultados en pacientes con diabetes tipo II y síndrome metabólico mostrando que la apoJ está incrementada en las LDL con concentración aumentada de apoCIII y disminuida de colesterol total, características típicas de las LDL pequeñas y densas.

Los resultados obtenidos en el artículo 2 pueden parecer paradójicos, ya que aunque los pacientes hiperlipémicos presentan concentraciones de apoJ y lipoproteínas más elevadas, la proporción de apoJ unida a lipoproteínas es menor. Las causas que dan lugar a esto son desconocidas, pero podrían estar relacionadas con alteraciones en la composición de las lipoproteínas que eviten la unión de apoJ. Los resultados de nuestro estudio indican que un mayor contenido de triglicérido y apoC-III en las

## DISCUSIÓN

lipoproteínas, características que se observan en los pacientes hiperlipémicos, podría estar relacionado con un menor contenido de apoJ. Sin embargo, es necesario desarrollar estudios más específicos dirigidos a conocer de qué manera alteraciones en la composición de las lipoproteínas modulan la unión de apoJ.

En la siguiente figura se muestra esquemáticamente la concentración de apoJ en las lipoproteínas en normolipemia e hiperlipemia:



### 3. PERSPECTIVAS FUTURAS

El contenido de proteínas minoritarias en las lipoproteínas podría tener un papel más importante en el desarrollo de la aterosclerosis de lo esperable por sus bajas concentraciones. De acuerdo con su función en otras enfermedades, tales como el Alzheimer, la apoJ podría tener un efecto relevante sobre el control de la agregación de LDL, un paso temprano crítico en la aterogénesis. La apoJ también podría prevenir los efectos citotóxicos mediados por la LDL modificada en el espacio subendotelial. Estas observaciones abren la posibilidad de desarrollar herramientas terapéuticas basadas en la apoJ y diseñadas para disminuir la progresión de la aterosclerosis. En este contexto, los péptidos miméticos derivados de apoJ han sido utilizados con éxito para prevenir el desarrollo de la aterosclerosis en ratones knockout apoE y monos *Cynomolgus* [122, 123]. Este efecto fue atribuido por los autores a la mejora en el potencial antioxidante y anti-inflamatorio de la HDL al aumento de la capacidad eflujo de colesterol. Sin embargo, este estudio no analizó los posibles efectos de péptidos miméticos derivados de apoJ sobre las propiedades específicas de la LDL. Sería de gran interés analizar si péptidos miméticos, derivados de apoJ o de otras apolipoproteínas, pueden inhibir la agregación de LDL y la citotoxicidad. El conocimiento detallado de tales mecanismos podría promover el desarrollo de nuevos péptidos con mayor especificidad y eficiencia.

Por otra parte, en relación a la asociación de la apoJ a las diferentes lipoproteínas, una distribución anormal podría indicar un cierto grado de disfuncionalidad en las diferentes fracciones lipoproteicas y, por tanto, sería indicativo del riesgo cardiovascular. Hay que desarrollar estudios que determinen el papel de la apoJ en los diferentes aspectos funcionales de las lipoproteínas y, al mismo tiempo hay que profundizar en las características físico-químicas que facilitan o dificultan la unión de la apoJ a las lipoproteínas. Otro aspecto relevante es conocer el efecto de diferentes terapias hipolipemiantes sobre la distribución de la apoJ, lo que podría ser útil para

conocer en más detalle los cambios inducidos por estas terapias sobre la función de las lipoproteínas. Sin embargo, hasta ahora no se ha desarrollado ningún estudio en este sentido. Únicamente Burillo y colaboradores [129] han analizado el efecto de una dieta rica en ácidos grasos  $\omega$ -3 sobre la composición proteica de la HDL en un pequeño grupo de fumadores. Estos autores observaron que el contenido de apoJ en la HDL aumentaba tras la dieta. Sin embargo en este estudio no se analizó la distribución de apoJ en el suero ni el contenido en otras lipoproteínas.





**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

- 1- La apoJ se une en la circulación plasmática a las partículas modificadas de LDL y preferencialmente a las partículas agregadas, posiblemente debido a su función como chaperona uniéndose a dominios hidrofóbicos.
- 2- La apoJ juega un papel protector muy importante en el proceso de agregación de la LDL. El proceso de agregación de la LDL podría ser una diana terapéutica sobre la que actuar con péptidos miméticos derivados de la apoJ que podrían inhibir este proceso.
- 3- Del total de la apoJ circulante un aproximadamente un 20% está asociado a las lipoproteínas y el 80% se encuentra en forma libre. De la apoJ unida a lipoproteínas la mayor parte se encuentra en la HDL, aproximadamente el 18%.
- 4- La concentración de apoJ en suero es altamente dependiente del perfil lipoproteico, y está asociada positivamente con la concentración de colesterol y triglicéridos. Los pacientes hiperlipémicos presentan una concentración aumentada de apoJ.
- 5- La distribución de apoJ en plasma es diferente en normolipemia e hiperlipemia. En pacientes normolipémicos un 30% de la apoJ está asociada a lipoproteínas, porcentaje que desciende en pacientes hiperlipémicos hasta un 17% en hipercolesterolémicos y un 15% en hipertrigliceridémicos.







1. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
2. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
3. Boren, J., et al., *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2658-64.
4. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
5. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
6. Paretz, A.D. and D. Adlersberg, *Hereditary hypercholesterolemia; a factor in the genesis of coronary atherosclerosis; studies of patients under age of 50*. J Clin Invest, 1948. **27**(4): p. 551.
7. Wieland, H., et al., *Serum lipoproteins and coronary artery disease (CAD). Comparison of the lipoprotein profile with the results of coronary angiography*. Atherosclerosis, 1980. **36**(2): p. 269-80.
8. Garg, R., et al., *Association of atherosclerosis with dyslipidemia and co-morbid conditions: A descriptive study*. J Nat Sci Biol Med, 2015. **6**(1): p. 163-8.
9. Rafieian-Kopaei, M., et al., *Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes*. Int J Prev Med, 2014. **5**(8): p. 927-46.
10. Dan L. Longo, L.J., Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Joseph Loscalzo, *Harrison Principios de Medicina Interna*. 18ª ed. 2012. 3118.
11. Niemeier, A., et al., *VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro*. J Lipid Res, 1996. **37**(8): p. 1733-42.
12. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(4): p. 341-90.
13. Lund-Katz, S. and M.C. Phillips, *Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein*. Biochemistry, 1986. **25**(7): p. 1562-8.
14. Hevonoja, T., et al., *Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1488**(3): p. 189-210.
15. Segrest, J.P., et al., *apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(10): p. 1674-85.
16. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
17. Sudhof, T.C., et al., *The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins*. Science, 1985. **228**(4701): p. 815-22.
18. Yamamoto, T., et al., *The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA*. Cell, 1984. **39**(1): p. 27-38.
19. Russell, D.W., et al., *Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor*. Cell, 1984. **37**(2): p. 577-85.
20. Hiltunen, T.P. and S. Yla-Herttuala, *Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis, 1998. **137** Suppl: p. S81-8.
21. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(4): p. 431-8.

22. Brown, M.S., S.E. Dana, and J.L. Goldstein, *Receptor-dependent hydrolysis of cholesteryl esters contained in plasma low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(8): p. 2925-9.
23. Stephen, S.L., et al., *Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease*. Int J Hypertens, 2010. **2010**: p. 646929.
24. Watts, G.F. and V. Burke, *Lipid-lowering trials in the primary and secondary prevention of coronary heart disease: new evidence, implications and outstanding issues*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(6): p. 341-55.
25. Navab, M., et al., *The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(7): p. 831-42.
26. Williams, K.J. and I. Tabas, *Lipoprotein retention--and clues for atheroma regression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1536-40.
27. Stocker, R. and J.F. Keane, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
28. Esterbauer, H., et al., *Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation*. Biochem Soc Trans, 1990. **18**(6): p. 1059-61.
29. Itabe, H., T. Obama, and R. Kato, *The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis*. J Lipids, 2011. **2011**: p. 418313.
30. Oorni, K., et al., *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions*. J Lipid Res, 2000. **41**(11): p. 1703-14.
31. Jayaraman, S., D.L. Gantz, and O. Gursky, *Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein*. Biochemistry, 2007. **46**(19): p. 5790-7.
32. Jayaraman, S., D.L. Gantz, and O. Gursky, *Effects of phospholipase A(2) and its products on structural stability of human LDL: relevance to formation of LDL-derived lipid droplets*. J Lipid Res, 2011. **52**(3): p. 549-57.
33. Lu, M. and O. Gursky, *Aggregation and fusion of low-density lipoproteins in vivo and in vitro*. Biomol Concepts, 2013. **4**(5): p. 501-18.
34. Schissel, S.L., et al., *Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2738-46.
35. Schissel, S.L., et al., *Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1455-64.
36. Khoo, J.C., et al., *Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I*. J Lipid Res, 1990. **31**(4): p. 645-52.
37. Bancells, C., et al., *Aggregated electronegative low density lipoprotein in human plasma shows a high tendency toward phospholipolysis and particle fusion*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32425-35.
38. Piha, M., L. Lindstedt, and P.T. Kovanen, *Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles*. Biochemistry, 1995. **34**(32): p. 10120-9.
39. Paananen, K., et al., *Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles strengthen their binding to human aortic proteoglycans*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12257-62.



40. Bhakdi, S., et al., *On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1959-71.
41. Bhakdi, S., et al., *Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2348-54.
42. Bhakdi, S., et al., *Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence*. Circulation, 2004. **109**(15): p. 1870-6.
43. Torzewski, M., et al., *Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(3): p. 369-78.
44. Schmiedt, W., et al., *Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(11): p. 1790-5.
45. Witztum, J.L., et al., *Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity*. Diabetes, 1982. **31**(4 Pt 1): p. 283-91.
46. Tabas, I., *Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 123-39.
47. Pentikainen, M.O., E.M. Lehtonen, and P.T. Kovanen, *Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein*. J Lipid Res, 1996. **37**(12): p. 2638-49.
48. Steinbrecher, U.P. and J.L. Witztum, *Glycosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism*. Diabetes, 1984. **33**(2): p. 130-4.
49. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism*. J Cell Sci Suppl, 1985. **3**: p. 131-7.
50. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. N Engl J Med, 1986. **314**(8): p. 488-500.
51. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
52. Fraley, A.E. and S. Tsimikas, *Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(5): p. 502-9.
53. Sanchez-Quesada, J.L., S. Benitez, and J. Ordonez-Llanos, *Electronegative low-density lipoprotein*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 329-35.
54. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control*. Diabetologia, 1996. **39**(12): p. 1469-76.
55. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia*. Am J Cardiol, 1999. **84**(6): p. 655-9.
56. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(7): p. 3243-9.
57. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects*. J Lipid Res, 2002. **43**(5): p. 699-705.
58. Ziouzenkova, O., et al., *Oxidative cross-linking of ApoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. Relevance to*

- atherogenesis caused by hemodialysis*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18916-24.
59. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise*. Atherosclerosis, 1995. **118**(2): p. 297-305.
60. Bancells, C., et al., *Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein*. J Lipid Res, 2010. **51**(12): p. 3508-15.
61. De Castellarnau, C., et al., *Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2281-7.
62. Benitez, S., et al., *Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction*. Circulation, 2003. **108**(1): p. 92-6.
63. Bancells, C., et al., *Novel phospholipolytic activities associated with electronegative low-density lipoprotein are involved in increased self-aggregation*. Biochemistry, 2008. **47**(31): p. 8186-94.
64. Sanchez-Quesada, J.L., S. Villegas, and J. Ordonez-Llanos, *Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(5): p. 479-86.
65. Sanchez-Quesada, J.L., et al., *Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells*. Atherosclerosis, 2003. **166**(2): p. 261-70.
66. Parasassi, T., et al., *Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-)*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(1): p. 82-9.
67. Benitez, S., et al., *Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content*. Biochemistry, 2004. **43**(50): p. 15863-72.
68. Bancells, C., et al., *High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level*. J Lipid Res, 2009. **50**(3): p. 446-55.
69. Bancells, C., et al., *Immunochemical analysis of the electronegative LDL subfraction shows that abnormal N-terminal apolipoprotein B conformation is involved in increased binding to proteoglycans*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1125-33.
70. Benitez, S., et al., *Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(9): p. 1014-21.
71. Benitez, S., et al., *Pro-inflammatory action of LDL(-) on mononuclear cells is counteracted by increased IL10 production*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(5): p. 613-22.
72. Sevanian, A., et al., *LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein*. J Lipid Res, 1997. **38**(3): p. 419-28.
73. MacPhee, C.H., et al., *Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor*. Biochem J, 1999. **338** ( Pt 2): p. 479-87.

74. Park, S., K.W. Mathis, and I.K. Lee, *The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases*. Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(1): p. 45-53.
75. Wong, P., et al., *Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 5021-31.
76. Jones, S.E. and C. Jomary, *Clusterin*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(5): p. 427-31.
77. de Silva, H.V., et al., *Apolipoprotein J: structure and tissue distribution*. Biochemistry, 1990. **29**(22): p. 5380-9.
78. Aronow, B.J., et al., *Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 725-9.
79. de Silva, H.V., et al., *Purification and characterization of apolipoprotein J*. J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14292-7.
80. Wilson, M.R. and S.B. Easterbrook-Smith, *Clusterin is a secreted mammalian chaperone*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 95-8.
81. Humphreys, D.T., et al., *Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 6875-81.
82. Poon, S., et al., *Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state*. Biochemistry, 2000. **39**(51): p. 15953-60.
83. Trougakos, I.P., *The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches - a mini-review*. Gerontology, 2013. **59**(6): p. 514-23.
84. Wyatt, A.R., et al., *Therapeutic targets in extracellular protein deposition diseases*. Curr Med Chem, 2009. **16**(22): p. 2855-66.
85. Yerbury, J.J., et al., *Quality control of protein folding in extracellular space*. EMBO Rep, 2005. **6**(12): p. 1131-6.
86. Poon, S., et al., *Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39532-40.
87. Poon, S., et al., *Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway*. FEBS Lett, 2002. **513**(2-3): p. 259-66.
88. Hochgrebe, T., et al., *pH-dependent changes in the in vitro ligand-binding properties and structure of human clusterin*. Biochemistry, 2000. **39**(6): p. 1411-9.
89. Pankhurst, G.J., C.A. Bennett, and S.B. Easterbrook-Smith, *Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin*. Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 4823-30.
90. Calero, M., et al., *Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(4): p. 305-15.
91. Trougakos, I.P., et al., *Advances and challenges in basic and translational research on clusterin*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 403-6.
92. Sala, A., et al., *Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis*. Adv Cancer Res, 2009. **105**: p. 115-32.
93. Trougakos, I.P. and E.S. Gonos, *Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(11): p. 1430-48.
94. Cubedo, J., et al., *Proteomic signature of Apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction*. J Proteome Res, 2011. **10**(1): p. 211-20.

95. Van Dijk, A., et al., *Intravenous clusterin administration reduces myocardial infarct size in rats*. Eur J Clin Invest, 2010. **40**(10): p. 893-902.
96. Kim, G., et al., *SREBP-1c regulates glucose-stimulated hepatic clusterin expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **408**(4): p. 720-5.
97. Daimon, M., et al., *Association of the clusterin gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2011. **60**(6): p. 815-22.
98. Charnay, Y., et al., *Clusterin in neurological disorders: molecular perspectives and clinical relevance*. Brain Res Bull, 2012. **88**(5): p. 434-43.
99. Thambisetty, M., et al., *Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(7): p. 739-48.
100. Murphy, B.F., et al., *SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis*. J Clin Invest, 1988. **81**(6): p. 1858-64.
101. Jenne, D.E., et al., *Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11030-6.
102. Kujiraoka, T., et al., *Serum apolipoprotein j in health, coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus*. J Atheroscler Thromb, 2006. **13**(6): p. 314-22.
103. Stejskal, D. and R.R. Fiala, *Evaluation of serum and urine clusterin as a potential tumor marker for urinary bladder cancer*. Neoplasma, 2006. **53**(4): p. 343-6.
104. Mackness, B., et al., *Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1233-8.
105. Ishikawa, Y., et al., *Immunolocalization of apolipoproteins in aortic atherosclerosis in American youths and young adults: findings from the PDAY study*. Atherosclerosis, 2001. **158**(1): p. 215-25.
106. Gelissen, I.C., et al., *Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function?* Biochem J, 1998. **331** ( Pt 1): p. 231-7.
107. Krijnen, P.A., et al., *Clusterin: a protective mediator for ischemic cardiomyocytes?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): p. H2193-202.
108. Bajari, T.M., et al., *A model for modulation of leptin activity by association with clusterin*. FASEB J, 2003. **17**(11): p. 1505-7.
109. Arnold, T., et al., *Effect of obesity on plasma clusterin, [corrected] a proposed modulator of leptin action*. Pediatr Res, 2011. **69**(3): p. 237-42.
110. Poulakou, M.V., et al., *Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease*. In Vivo, 2008. **22**(4): p. 537-42.
111. Aronis, K.N., et al., *Circulating clusterin (apolipoprotein J) levels do not have any day/night variability and are positively associated with total and LDL cholesterol levels in young healthy individuals*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(11): p. E1871-5.
112. Wyatt, A.R. and M.R. Wilson, *Identification of human plasma proteins as major clients for the extracellular chaperone clusterin*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3532-9.
113. de Silva, H.V., et al., *A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(22): p. 13240-7.

114. Stuart, W.D., et al., *Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins*. *Biochemistry*, 1992. **31**(36): p. 8552-9.
115. Karlsson, H., et al., *Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. *Proteomics*, 2005. **5**(5): p. 1431-45.
116. Banfi, C., et al., *Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme*. *Proteomics*, 2009. **9**(5): p. 1344-52.
117. Karlsson, H., et al., *Characterization of apolipoprotein M isoforms in low-density lipoprotein*. *J Proteome Res*, 2006. **5**(10): p. 2685-90.
118. Richardson, M.R., et al., *Diabetic dyslipidemia and exercise alter the plasma low-density lipoproteome in Yucatan pigs*. *Proteomics*, 2009. **9**(9): p. 2468-83.
119. Stahlman, M., et al., *Proteomics and lipids of lipoproteins isolated at low salt concentrations in D2O/sucrose or in KBr*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(2): p. 481-90.
120. Sun, H.Y., et al., *Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(5-6): p. 336-44.
121. Navab, M., et al., *Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(8): p. 2005-19.
122. Navab, M., et al., *An oral apoJ peptide renders HDL antiinflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(9): p. 1932-7.
123. Navab, M., et al., *Peptide Mimetics of Apolipoproteins Improve HDL Function*. *J Clin Lipidol*, 2007. **1**(2): p. 142-7.
124. Schwarz, M., et al., *Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(1): p. 110-8.
125. Haefliger, J.A., et al., *Complete primary structure and functional characterization of the sixth component of the human complement system. Identification of the C5b-binding domain in complement C6*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(30): p. 18041-51.
126. Trougakos, I.P., et al., *Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction*. *Exp Gerontol*, 2002. **37**(10-11): p. 1175-87.
127. Hoofnagle, A.N., et al., *Low clusterin levels in high-density lipoprotein associate with insulin resistance, obesity, and dyslipoproteinemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(12): p. 2528-34.
128. Riwanto, M., et al., *Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling*. *Circulation*, 2013. **127**(8): p. 891-904.
129. Burillo, E., et al., *Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome*. *Lipids Health Dis*, 2012. **11**: p. 116.
130. Rubinow, K.B., et al., *Acute sex steroid withdrawal increases cholesterol efflux capacity and HDL-associated clusterin in men*. *Steroids*, 2012. **77**(5): p. 454-60.
131. Karlsson, H., et al., *Protein profiling of low-density lipoprotein from obese subjects*. *Proteomics Clin Appl*, 2009. **3**(6): p. 663-71.

132. Pettersson, C., et al., *LDL-associated apolipoprotein J and lysozyme are associated with atherogenic properties of LDL found in type 2 diabetes and the metabolic syndrome*. J Intern Med, 2011. **269**(3): p. 306-21.
133. Ishikawa, Y., et al., *Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(4): p. 665-72.
134. Gil, S.Y., et al., *Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1862.
135. Byun, K., et al., *Clusterin/ApoJ enhances central leptin signaling through Lrp2-mediated endocytosis*. EMBO Rep, 2014. **15**(7): p. 801-8.
136. Vaisar, T., et al., *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 746-56.