

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE QUIMICA
Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Determinants de la concentració plasmàtica de la
Lipoproteïna (a) en la malaltia cardiovascular

Josep Maria Simó
Tesi Doctoral
2003

PIDO la paz y la palabra
Escribo
en defensa del reino
del hombre y su justicia. Pido
la paz
y la palabra . He dicho
< silencio > < sombras > < vacío >
etc.
Digo
< del hombre y su justicia >
< océano pacífico >
lo que me dejen
Pido
la paz y la palabra

Blas de Otero

Al meu pare

Agraïments

Al Dr. Jorge Joven amb admiració, per la seva capacitat d'enfrontar-se a tots els reptes amb seguretat, perquè és l'autèntica ànima d'aquest treball i perquè si assolixo el títol de doctor haurà estat culpa seva.

A la Dra. Elisabet Vilella, perquè sense la seva col·laboració aquest treball no hagués estat possible. Però sobretot perquè manté, per a nosaltres els analistes del Laboratori, una finestra oberta a la biologia molecular

Al Dr. Miquel Àngel Pujana per la seva dedicació generosa, a la Dra. Virginia Nunes per la seva generosa amistat.

A la Dra. Lourdes Martorell pels bons moments del principi quan érem tres i una taula amb cavallets

A totes les "nenes" del CRB, aviat doctores, pel seu bon rotllo

A la meva mare perquè respirant vitalitat la transmet als que estem al seu costat

Al Jordi per totes les "neures" que m'ha aguantat. Sense ell aquesta tesi tampoc seria possible.

A la meva germana perquè no me'n hagués pogut imaginar una de millor, a l'Alba i l'Andreu perquè són un motor per a mi

A tots els avis que col·laboraren de forma entusiasta en l'estudi, als metges de les residències que m'ho facilitaren, a les infermeres als malalts i als controls que m'ajudaren.

A la Mercè Feliu per fer aquesta presentació més agradable

.....A tots els que d'alguna forma m'han recolzat, que no són pocs.

ÍNDEX

Introducció

1. Descripció i funció de la lipoproteïna (a)	10
1.1. Descripció de la partícula	10
1.1.1. Descobriment	10
1.1.2. L'apoproteïna (a) humana	11
1.1.3. Localització cromosòmica	14
1.1.4. Evolució	16
1.1.5. Isoformes	16
1.1.6. Polimorfismes genètics	17
1.2. Funció de la Lipoproteïna (a)	18
1.2.1. Funció LBS	18
1.2.2. Efecte de la Lipoproteïna (a) en el sistema fibrinolític	23
1.2.3. Afinitat de la Lipoproteïna (a) pels components de la matriu extracel·lular	26
1.2.4. Afinitat de la Lipoproteïna (a) / apolipoproteïna (a) per altres substàncies	28
1.2.5. Mutacions en l'apoproteïna (a) associades a canvis en la seva funció	28
1.2.6. Modificacions postranscripcionals associades a canvis en la seva funció	30
1.2.6.1. Processos oxidatius	30
1.2.6.2. Processos proteolítics	30
1.2.6.3. Processos lipolítics	32
1.2.7. Funcions fisiològiques de la Lipoproteïna (a)	32
1.2.7.1. Facilita la reparació dels teixits	33
1.2.7.2. La Lipoproteïna(a) i el càncer	35
1.2.7.3. Pot ser un succedani de l'ascorbat	35

2. Concentració de Lipoproteïna (a) en plasma i el seu significat en la patologia humana	36
2.1. Contribució dels polimorfismes de mida de l'apoproteïna (a) a la concentració plasmàtica de Lipoproteïna (a)	36
2.2. D'altres factors reguladors de les concentracions plasmàtiques	38
2.2.1. Factors genètics	38
2.2.2. Factors no genètics	39
2.3. Metabolisme de la Lipoproteïna (a)	41
2.3.1. Síntesi de la Lipoproteïna (a)	41
2.3.2. Acoblament de l'apoproteïna (a) a les Lipoproteïnes de baixa densitat (LDL)	42
2.3.3. Catabolisme de la Lipoproteïna (a)	43
2.4. Significat de la Lipoproteïna (a) en la patologia humana	46
2.4.1. Capacitat aterogènica de la Lipoproteïna (a)	47
2.4.2. Capacitat trombogènica de la Lp(a)	50
2.4.3. Paper dels factors genètics en la capacitat aterotrombòtica de la Lipoproteïna(a)	53
2.4.4. Paper dels factors post transcripcionals en la capacitat aterotrombòtica de la Lipoporteïna (a)	54

Hipòtesi i objectius

Hipòtesi	57
Objectius	57

Resultats i discussió

Estudi 1	60
----------	----

Impact of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity on the lysine binding function of lipoprotein(a) in early onset coronary artery disease
JM Simó J Joven E Vilella, M Ribas, MA Pujana IM Sundaran J Hammel
J Hoover-Plow. *Thromb Haemost* 2001 85(3):412-7

Estudi 2	67
----------	----

Polymorphisms in human apolipoprotein(a) kringle IV-10 and coronary artery disease: relationship to allele size, plasma lipoprotein(a) concentration, and lysine binding site activity
JM Simó J Joven E Vilella, M Ribas, L Figuera, C Virgos
IM Sundaran J Hoover-Plow.
J Mol Med (2001)79 294-299

Estudi 3	74
----------	----

Instability of Lipoprotein(a) in plasma stored -70°C: Effects of concentration apolipoprotein(a) genotype , and donor cardiovascular disease
JM Simó, J Camps, E Vilella, F Gómez, A Paul and J Joven.
Clin Chem (2001) 47:9 1673-1678

Conclusions globals	82
----------------------------	----

Referències bibliogràfiques	94
------------------------------------	----

INTRODUCCIÓ

1. Descripció i funció de la lipoproteïna (a)

1.1. Descripció de la partícula

1.1.1. Descobriment

La lipoproteïna (a) [Lp(a)] fou descrita per primer cop per Karen Berg [Berg, 1963] en un estudi dissenyat per identificar variants antigèniques de les β -lipoproteïnes humanes. Enfrontant sèrums de diferents pacients a determinats antisèrums anti β -lipoproteïnes, Berg caracteritzà dos tipus de pacients, els que posseïen la variant antigènica que anomenà Lp(a) positiu i els que no o Lp(a) negatiu. Molt aviat demostrà que aquest caràcter s'heretava de forma autosòmica dominant.

Poc temps després diversos autors [Utermann i Wiegand, 1969; Harvie i Schultz, 1970; Ehnholm et al., 1971] evidenciaren que la Lp(a) era una partícula amb identitat pròpia i no pas una variant de les LDL.

Si bé va ser purificada i caracteritzada parcialment a principis dels anys 70, la seva complexitat va fer que fins la dècada següent no fos caracteritzada en la seva totalitat.

La Lp(a) però, no despertà cap interès clínic fins que passats uns anys, un estudi cas - control [Dahlen et al., 1976] provà que la freqüència de plasmes Lp(a)-positiu entre pacients amb infart de miocardi era més elevada que la del grup control. Més tard, altres autors [Kostner et al, 1980] utilitzant un assaig quantitatiu demostraren per primer cop una relació directa entre concentracions elevades de Lp(a) i malaltia cardiovascular.

Des de les hores, nombrosos estudis han ampliat els coneixements originals sobre aquesta partícula, donant resposta a moltes de les qüestions plantejades i obrint-ne de noves algunes de les quals queden encara per contestar.

La lipoproteïna (a) és una partícula molt heterogènia de mida. El seu interval de densitat és ampli i inclou el de les LDL i part de les HDL. [Fless et al, 1984].

Malgrat la seva semblança amb les LDL, algunes de les seves característiques físiques i bàsicament la seva composició proteica la diferencien clarament d'aquestes. En un 71 a

83% està formada per lípids neutres, majoritàriament ésters de colesterol, situats en el nucli de la partícula mentre la resta, entre un 17 i un 29%, el constitueixen proteïnes [Gaubatz et al., 1983], fortament glicades [Ehnholm et al., 1972], que recobreixen totalment el cor hidrofòbic de la partícula [Fless et al., 1985].

En general aquestes propietats fan difícil la seva separació de les altres lipoproteïnes únicament per criteris de densitat i per tant es combina la ultracentrifugació amb tècniques de cromatografia d'afinitat

La reducció química de la Lp(a) amb tiols, dona lloc a dos productes solubles en aigua que poden ser separats per ultracentrifugació [Fless et al., 1986], la designada com lipoproteïna (a-) [Lp (a-)] i l'apoproteïna (a) [apo(a)].

La Lp (a-) és similar a les LDL en la seva mobilitat electroforètica composició lipídica i pes molecular aparent. El seu únic component proteic és l'apoB-100 i s'uneix als receptors específics de LDL presents en fibroblasts humans sent degradada de forma similar a aquestes [Armstrong et al., 1985]. L'apoproteïna(a) per la seva part és el component que la diferencia de les LDL. En la taula 1 es comparen les principals propietats fisicoquímiques i la composició de la Lp(a), les LDL i de la Lp (a-).

1.1.2. L'apoproteïna (a) humana

Amb un pes molecular entre 300 i 800 kDa, l'apo(a) és una proteïna fortament glicada, el 28% del seu pes de mitjana són carbohidrats, [Fless et al., 1986] i molt heterogènia de mida [Utermann et al., 1987].

En la seva estructura secundària predomina el plegament a l'atzar, un 71%, mentre l'hèlix alfa constitueix un 8% i la beta plegada un 21%. [Gaubatz et al., 1987]. El plegament terciari és el responsable de la seva elevada viscositat intrínseca, $28.3 \text{ cm}^3/\text{g}$.

És altament soluble en aigua i malgrat el caràcter relativament hidròfob de la Lp (a-), fa extensiva aquesta propietat a la lipoproteïna de la que forma part.

La seva presència confereix a la Lp(a) una immunoreactivitat diferent de la de LDL [Zawadzki et al., 1988] a la que està unida de forma covalent mitjançant un pont disulfur [Utermann et al., 1983].

Taula 1 Propietats fisicoquímiques de la Lp(a) en comparació a les LDL i a la Lp(a-)

	LDL	Lp(a)	Lp (a-)
Propietats fisicoquímiques			
Massa molecular (Da)	$(2.9) \times 10^6$	$(3.8-4.0) \times 10^6$	$3.2-3.3 \times 10^6$
Diàmetre (nm)	25.9 ± 0.1	28.3 ± 0.5	26.1 ± 0.1
Densitat (g/l)	1019-1063	1006-1125	1028
Vida mitjana (dies)	2-3	3-4	--
Composició (%)			
Proteïnes	26-31	17-29	24
Colesterol lliure	9	6-9	9
Colesterol esterificat	40-43	35-46	40-41
Triglicèrids	4-6	4-8	5-6
Fosfolípids	20-22	17-24	20

(Adaptat de Lippi i Guidi, 2000)

Les anàlisis de pes molecular [Fless et al., 1997] i composició d'aminoàcids [Albers et al., 1996] assenyalen una relació molar 1:1 apo(a):apoB100 en la partícula sencera.

Alguns autors han descrit altres proteïnes com a components menors de la Lp(a) [Bard et al., 1996], suggerint la presència de subpoblacions d'aquesta lipoproteïna. No està demostrat però, si aquestes troballes corresponen a autèntiques subespècies de Lp(a) o a contaminacions derivades del procés d'aïllament.

La seqüència d'aminoàcids de l'apo(a) [McLean et al., 1987], exhibeix un alt grau d'homologia amb el plasminogen humà. La proteïna madura està formada per 11 dominis proteics diferents o *kringles* i un domini serin-proteasa. Els *kringles*, anomenats així per la seva semblança amb una típica galeta danesa, són estructures disposades en triplella establitzades per 3 ponts disulfur intracatenaris, comunes a diferents proteïnes del sistema fibrinolític i de la coagulació entre les que es troba el plasminogen [Magnusson et al., 1975].

En la figura 1 es mostra l'estructura d'un *kringle* estàndard i la seva inserció en l'estructura de l'apo(a).

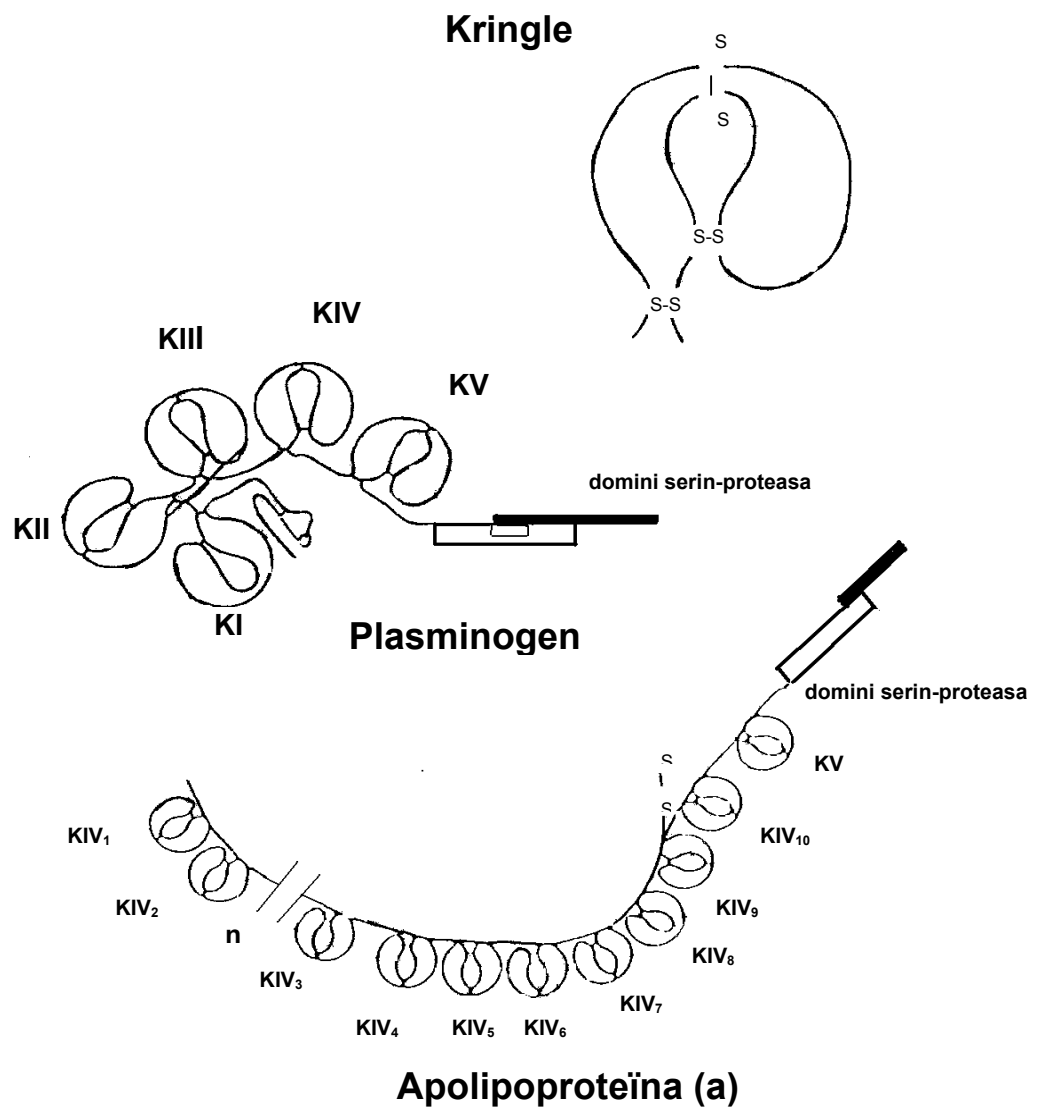
L'apo(a) conté fins a 54 *kringles* que segons la seva homologia amb els del plasminogen es classifiquen com del tipus IV i V [Scanu et al., 1995]. Tots ells són presents en una sola còpia (tipus IV subtipus 1 a 10 i tipus V) [Guevara et al., 1992] excepte el *kringle* IV₂ que ho fa en múltiples còpies idèntiques condicionant la mida de la proteïna [Gaw et al., 1994] i influenciant en els nivells plasmàtics de Lp(a) [Kraft et al., 1992]. La seva homologia amb els *kringles* del plasminogen oscil·la entre el 61-95%, i tots excepte KIV₁, KIV₂ i KV tenen el mateix nombre d'aminoàcids.

Els *kringles* de l'apo(a) s'uneixen a través de regions connectores la funció de les quals és encara desconeguda. És probable però que influencin en la flexibilitat dels dominis proteics i indirectament tinguin a veure amb l'activitat global de l'apo(a). Tots els connectors que uneixen els KIV₂ repetits tenen el mateix nombre d'aminoàcids mentre que aquells que es troben entre *kringles* no idèntics difereixen en mida i composició.

El *kringle* IV-9 posseeix a més un residu de cisteïna desaparellat que estableix un pont disulfur amb una altra cisteïna de l'apoB-100 en la Lp(a) [Koschinsky et al., 1993].

El domini carboxi-terminal de l'apo(a) exhibeix un alt grau d'homologia amb la regió serin-proteasa del plasminogen. Aquesta regió conté la tríada catalítica His⁴³⁵⁰-Asp⁴³⁹³-Ser⁴⁴⁸¹ (numeració basada en McLean et al), però una mutació en la seva seqüència d'activació (Arg-Val) impedeix que esdevingui funcional. En la figura 2 es representen les similituds entre l'apo(a) i el plasminogen

Els carbohidrats, amb un 28% aproximadament del seu pes, es distribueixen en una relació molar de 3 : 7 : 5 : 4 : 7 (manosa: galactosa: galactosamina: glucosamina: àcid siàlic) [Fless et al., 1986]. L'existència de *kringles* diferents suggereix que l'apo(a) pot exhibir diferències en el seu contingut i composició en carbohidrats entre les diverses isoformes de mida. Aquesta heterogeneïtat pot relacionar-se amb el nombre de llocs susceptibles de glicosilació al llarg de la cadena polipeptídica, amb la longitud de la cadena d'oligosacàrids, amb l'existència de ramificacions o amb la combinació d'aquestes tres possibilitats.

Figura 1 Esquema d'un *kringle* i la seva disposició en el plasminogen i l'apoproteïna(a)

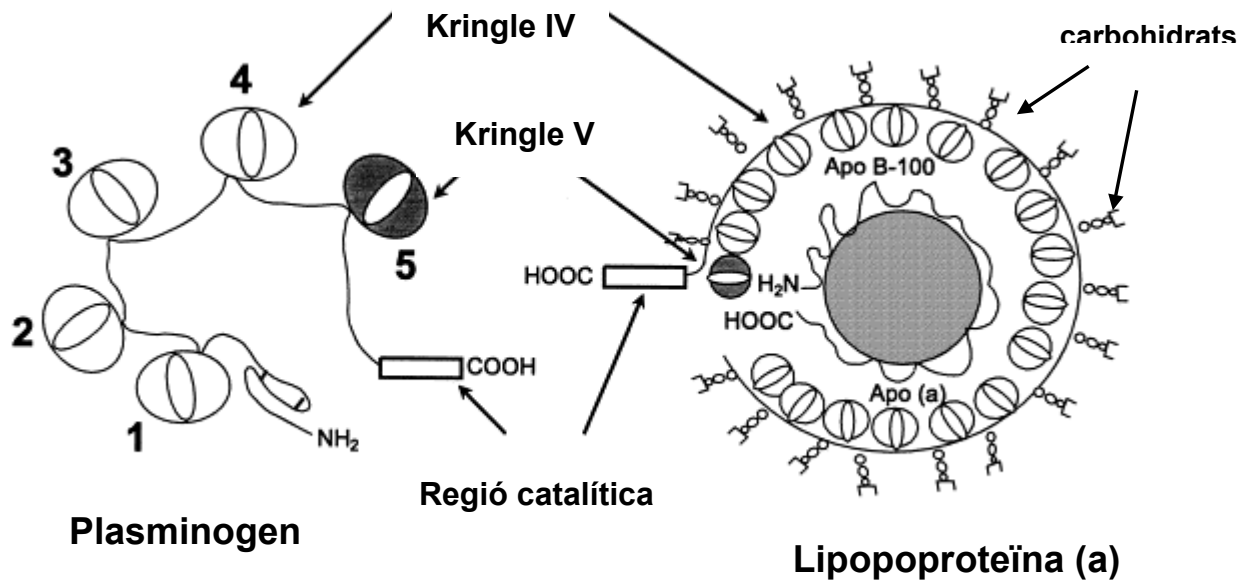
(Adaptat de Martínez Triguero et al. 1993)

1.1.3. Localització cromosòmica

L'apo(a) és membre d'una superfamília de serin-proteases que actuen com la tripsina [Ichinose, 1992].

El gen de l'apo(a) es localitza en el braç llarg del cromosoma 6 en la posició q26-q27 [Frank et al., 1988], pròxim al gen del plasminogen, [Weikamp et al., 1988].

Figura 2 Semblança estructural entre l'apo (a) i el plasminogen



Adaptat de de la Peña et al., 2000

Actualment se sap que el gen de l'apo(a) és part d'un grup de com a mínim 5 gens: plasminogen, factors de creixement hepàtic I i II i un segon pseudogen d'apo(a), amb més d'un 70% d'identitat de seqüència [Magnaghi et al., 1994]. El gen de l'apo(a) i el plasminogen estan organitzats cap amb cap separats per al voltant de 40 Kb.

La seqüència no transcrita i el senyal de l'extrem 5' del gen comparteixen una homologia d'un 98% i un 100% respectivament amb les del gen del plasminogen [Mc Lean et al., 1987], més enllà, les seqüències dels dos cDNA divergeixen.

La regió codificadora per un *kringle* IV, consta de 2 exons de 162 pb (exó 1) i 180 pb (exó 2), separats per un intró de 4.2 Kb (intró 1). Un segon intró de 1.4 Kb es localitza entre l'extrem 3' de l'exó 2 i l'extrem 5' del següent exó [Kraft et al., 1992].

1.1.4. Evolució

L'existència de la Lp(a) i de l'apo(a) està restringida als primats del vell continent, mones, goril·les i ximpanzés i als humans. [Lawn et al., 1995] i també a l'eriçó que produeix una proteïna semblant a l'apo(a) constituïda per moltes còpies repetides del *kringle* III del plasminogen però sense el domini serin-proteasa.

La comparació de les seqüències de DNA i l'anàlisi filogenètic indica que l'apo(a) humana, es formà a partir d'un duplicat del gen del plasminogen durant l'evolució més recent dels primats. En contrast, el *kringle* III de l'eriçó, ho va fer a partir d'una duplicació diferent del mateix gen fa aproximadament 90 milions d'anys quan l'eriçó primitiu es va separar de la resta de mamífers amb placenta. [Lawn et al., 1997].

Es proposa que el gen del plasminogen ha estat reestructurat dues vegades de forma independent produint dues formes similars d'apo(a) en dos grups d'espècies tant divergents. Posteriorment, ambdós gens haurien evolucionat independentment per duplicacions i modificació de diferents dominis del plasminogen donant lloc a una nova forma de convergència evolutiva molecular.

1.1.5. Isoformes

El polimorfisme de mida de la proteïna fou descrit per primer cop per Utermann [Utermann et al., 1987] quan aconseguí separar i identificar sis isoformes d'apo (a) en una electroforesi en gel de poliàcrilamida desnaturalitzant. Les sis isoformes de les que es determinà un pes molecular d'entre 400 i 800 kDa, es varen nomenar d'acord a la seva mobilitat electroforètica relativa respecte l'apoB100 ($\approx$ 520 kDa.).

- F (*faster*) amb una mobilitat superior a l'apoB100
- B amb mobilitat semblant a l'apoB100
- S (*slower*) amb una mobilitat inferior a l'apoB100, distingint en aquest cas quatre isoformes amb diferents mobilitats, S₁ a S₄

Tots els individus estudiats, presenten com a màxim dues isoformes diferents en el plasma [Kraft et al., 1992], però en un nombre considerable, el 49%, no es detecta cap isoforma. Aquests individus varen ser catalogats com a portadors de l'al·lel nul.

Els estudis familiars suggeriren ben aviat una herència autosòmica codominant de les isoformes controlada per un seguit d'al·lels autosòmics (Lp^F , Lp^B , Lp^{s1} , Lp^{s2} , Lp^{s3} , Lp^{s4}) i un locus simple. Un setè al·lel Lp^0 o al·lel nul, va ser introduït per explicar els pacients que no expressaven cap isoforma [Utermann et al., 1988].

D'acord amb aquest model, les persones amb dues isoformes d'apo(a) són heterozigotes per aquest caràcter mentre que les persones amb una sola isoforma o bé són homozigotes o heterozigotes amb un dels dos al·lels nul.

La introducció de l'electroforesi desnaturalitzant en gel d'agarosa ha permès incrementar sensiblement la detecció d'isoformes d'apo(a) en plasma i en l'actualitat se'n descriuen més de 30 de diferents. Paral·lelament, ha augmentat el percentatge d'individus classificats com heterozigots que en els estudis actuals se situa al voltant del 80% [Marcovina et al., 1993], mentre en tots ells es detecta com a mínim una isoforma.

La distància de migració s'ha relacionat directament amb el nombre de repeticions del *kringle* IV₂ i per tant amb la mida de la proteïna [Marcovina et al., 1996].

En contrast amb els estudis inicials, les freqüències de les isoformes, és troben en equilibri de *Hardy-Weinberg*. El desequilibri dels estudis inicials, reflectia la incapacitat tècnica per detectar algunes isoformes que en certes races es donen amb relativa freqüència, però a baixa concentració.

1.1.6. Polimorfismes genètics

El gen de l'apo(a) presenta polimorfisme de mida. Aquest polimorfisme guarda una relació directa amb la mida de la proteïna que codifica [Lindahl et al., Koschinsky et al., 1990].

Estudis en famílies han revelat una herència codominant per aquest caràcter i han demostrat la cosegregació d'aquest polimorfisme amb el de mida de la proteïna.

L'evidència més directa d'aquesta relació la donen els estudis de restricció del DNA genòmic amb l'enzim KpnI. La digestió del DNA genòmic amb aquest enzim conserva sencer el nombre de repeticions del *kringle* IV₂ [Lackner et al., 1991], demostrant que la mida de la proteïna es relaciona amb el nombre de repeticions del KIV del gen. Aquesta metodologia ha estat aplicada pel nostre grup en l'estudi del polimorfisme de mida del gen a les nostres mostres.

Malgrat la bona correlació entre les tècniques de determinació del fenotip i genotip (s'ha descrit una excel·lent relació lineal entre el logaritme del número de *kringles* i la distància a la que migra l'isoforma en un gel d'agarosa), les diferències en la sensibilitat de la determinació d'un o altre han estat evidents [Valenti et al, 1997], àdhuc emprant tècniques d'alta resolució [Aveynier et al, 1998]. En la població de raça blanca aplicant tècniques estàndards per la determinació del fenotip d'apo(a), no es detecten al voltant del 30% dels al·lels raó per la que s'obté una freqüència elevada d'individus homozigots. Per tant alhora d'abordar l'estudi d'aquesta lipoproteïna és necessari avaluar els avantatges i inconvenients que presenta cadascuna de les tècniques.

1.2. Funció de la Lipoproteïna (a)

No es coneix però es distingeixen algunes relacionades amb la seva similitud estructural i funcional amb el plasminogen.

1.2.1. Funció LBS

El plasminogen mitjançant els seus dominis o *kringles* té la capacitat de reconèixer lisines, principalment residus de lisina carboxi-terminal. Les regions dels *kringle* que intervenen en aquesta unió s'anomenen LBS (*Lysine Binding Site*) i la propietat que li confereixen, funció LBS.

La funció LBS és responsable de la unió del plasminogen a la lisina-Sefarosa i el que és més important, de la unió del plasminogen i la plasmina a substrats com la fibrina, a inhibidors i a receptors cel·lulars. La funció LBS del plasminogen pot ser inhibida per la mateixa lisina i els seus anàlegs com l'àcid ϵ -aminocaproic (ϵ AAC) i l'àcid tranexàmic [Mc Cance et al., 1994] i no és una propietat exclusiva d'aquesta proteïna, doncs altres proteïnes

de coagulació i la fibrinolisi com la protrombina, el factor XII, la urokinasa, i l'activador tissular del plasminogen (tPA), també l'exhibeixen.

L'estructura de la regió LBS es conserva relativament intacta en la majoria de proteïnes amb aquesta funció [Tulinsky et al., 1988]. Els estudis de ressonància magnètica i de minimització d'energia la descriuen com una superfície dipolar separada per una regió hidrofòbica de residus aromàtics.

Dels cinc *kringles* del plasminogen el *kringle* I és el que té més afinitat per la fibrina mentre els *kringle* II i III són llocs de poca o dèbil afinitat i el *kringle* IV d'una afinitat intermèdia. En el KIV set aminoàcids, dos d'aniònics (Asp⁵⁵ Asp⁵⁷), dos catiònics (Lys³⁵ Arg⁷¹) i tres d'apolars (Trp⁶² Phe⁶⁴ i Trp⁷²) formen la regió LBS i són els responsables de la unió de la plasmina als residus de lisina.

A l'igual que el plasminogen, la Lp(a) s'uneix a la lisina-Sefarosa, i també ho fa a la matriu extracel·lular, a proteïnes de la matriu i a varis tipus de cèl·lules, incloent hepatòcits, monòcits i cèl·lules endotelials. Aquesta interacció també pot ser inhibida al menys en part per lisina i els seus anàlegs.

Tenint en compte la similitud entre l'apo(a) i el plasminogen és de suposar que un o més del KIV de l'apo(a) estiguin implicats en aquesta unió. Els estudis d'afinitat de fragments obtinguts en el trencament proteolític de la Lp(a) han determinat que en la interacció hi intervenen seqüències localitzades en l'extrem carboxi-terminal que compren del *kringles* KIV₃ al domini serin-proteasa [Huby et al. , 1995].

De tots els *kringle* IV de l'apo(a) humana, el que conserva millor els aminoàcids claus de la funció LBS del plasminogen és el KIV₁₀ que té sis dels set aminoàcids i el setè en la posició 35 amb un canvi conservatiu lisina per arginina. En base a la seva seqüència als altres *kringles* de l'apo(a) se'ls calcula o bé una afinitat menor o nul·la.

Per tant, des dels inicis de la caracterització de la funció LBS en la Lp(a) tots els esforços s'han centrat en la investigació d'aquest *kringle*.

De forma natural la Lp(a) de la mona rhesus presenta una pèrdua important d'afinitat a lisina-Sefarosa i a cultius de monòcits quan es compara amb la Lp(a) humana. La seqüència d'aminoàcids del *kringle* IV₁₀ de la seva apo(a) mostra una substitució Trp → Arg

en l'aminoàcid 72 considerat clau per aquesta funció [Scanu et al., 1993]. El canvi d'aminoàcids sembla ser la causa principal de la pèrdua de funció LBS de l'apo(a) en el primat. Aquesta hipòtesi es veu reforçada pel fet que en la lesió ateromatosa de primats amb concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a), aquesta lipoproteïna no es detecta conjuntament amb les restes de fibrina [Kusumi et al, 1993].

El fragment del gen d'apo(a) corresponent al KIV₁₀ ha estat clonat a partir del cDNA hepàtic i expressat en *E. coli*. Aquest procés ha permès l'obtenció de quantitats suficients de *kringle* funcional per ser utilitzats en la caracterització de les seves propietats físiques, l'anàlisi de la constant de dissociació en front de diversos anàlegs de lisina i la capacitat d'unir-se a fibrinogen tractat amb plasmina i de prevenir la unió de la Lp(a) al fibrinogen [LoGrasso et al., 1994]. Els resultats indiquen que el KIV₁₀ contribueix de forma decisiva a la interacció de l'apo(a) i el plasminogen.

La substitució de dos dels residus aniònics claus de la funció LBS del KIV₁₀, Arg^{55 i 57} per Ala dona lloc a una proteïna recombinant [r-apo(a)] que expressada en un cultiu cel·lular és capaç de retenir tant sols un 30% de la capacitat LBS de la proteïna salvatge [Boonmark i Lawn, 1997]. En aquest estudi es troben també diferències significatives en la deposició d'apo(a) en la paret dels vasos entre els ratolins transgènics que expressen la proteïna recombinant mutada o els que expressen la salvatge, suggerint una correlació entre la pèrdua d'afinitat per la lisina i la capacitat de deposició d'apo(a) en les lesions ateromatoses i corroborant els resultats dels estudis anteriors.

Un segon lloc d'interacció de Lp(a) amb substrats biològics ha estat descrit entre els *kringles* IV₅ i IV₈. Aquesta segona regió (LBS II) presenta una afinitat per la lisina més dèbil i és la responsable de la interacció no covalent entre l'apo(a) i l'apoB100. En el context de la partícula sencera, la LBS II està emmascarada per la unió covalent entre ambdues proteïnes. [Ernst et al., 1995]. Emprant tècniques suaus de separació de l'apo(a) i l'apoB100, s'ha demostrat que en l'apo(a) lliure el LBS II és el responsable de la unió de la proteïna al fibrinogen modificat per la plasmina i compta també per la interacció amb la lisina immobilitzada encara que com s'ha dit anteriorment, amb menys eficiència que el LBS del KIV₁₀ [Klezovitch et al., 1996]. Els autors postulen que la mesura amb la que aquesta segona funció LBS queda impedita per la unió covalent amb l'apoB100 i amb les LDL determina la intensitat de la unió de l'apo(a) al fibrinogen modificat per la plasmina.

En la figura 3 es representa esquemàticament la Lp(a) i s'assenyalen els *kringles* responsables de la funció LBS

Recentment, la descripció de la primera estructura cristal·logràfica d'un dels *kringles* amb funció LBS II, el KIV₇ [Ye et al., 2001] ha ajudat a entendre millor les diferències de capacitat entre ambdues funcions LBS. En el KIV₇, on l'afinitat es 10 cops més dèbil que la mostrada pel KIV₁₀ [Rahman et al., 2001], la presència d'una tirosina en la posició 62 juntament amb la d'arginina en la posició 35 facilita la formació d'una xarxa de ponts d'hidrogen i interaccions electrostàtiques entre els aminoàcids de la LBS (Arg³⁵, Tyr⁶² i Asp⁵⁴) i un residu perifèric Tyr⁴⁰. Aquesta interacció restreny la flexibilitat de la funció LBS del *kringle* reduint l'adaptabilitat de la lisina i els seus anàlegs. A més produeix una obstaculització estèrica que elimina les interaccions necessàries per l'estabilització dels lligants. Aquests subtils però crítics canvis semblen ser els responsables de les diferències d'afinitat entre ambdós *kringles*.

Malgrat tot, les bases moleculars que regeixen la unió de la Lp(a) a la fibrina i la contribució de cada *kringle* a la funció LBS i a la unió al fibrinogen són encara lluny de desxifrar-se en la seva totalitat.

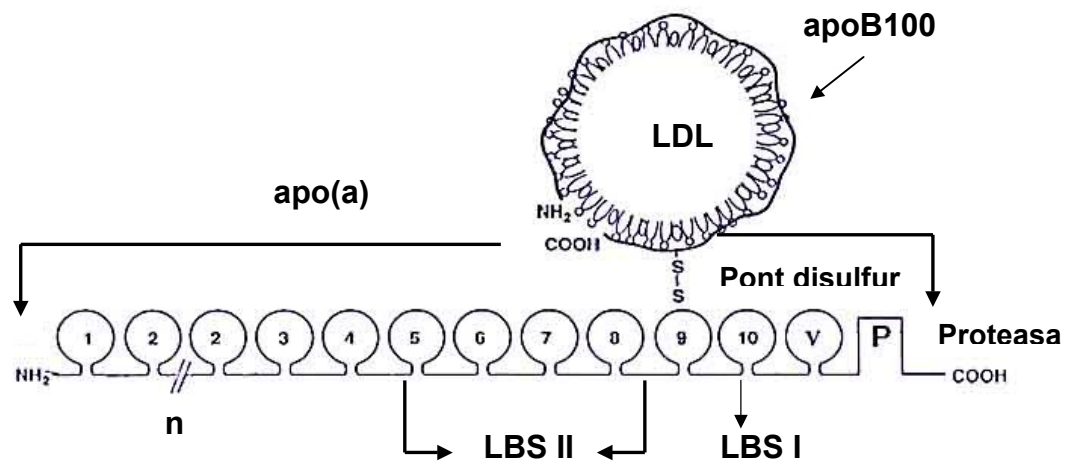
En un estudi recent [Rahman et al., 2001] s'ha intentat caracteritzar per separat l'afinitat dels diferents *kringles* IV de l'apo(a) amb el fibrinogen i determinar la contribució d'aquests a la interacció global al temps que s'examinava la seva capacitat de contribuir a l'efecte antifibrinolític de l'apo(a).

Utilitzant un sistema d'expressió en bacteris s'ha purificat els *kringles* d'apo(a) : KIV₂, KIV₇, KIV₉ Δ Cys (al que li manca la cisteïna lliure) i KIV₁₀, i s'han generat tres mutacions de KIV₁₀ dues corresponents al residu Trp⁷⁰ que juga un paper important en l'estabilització de lligants (KIV₁₀ Trp⁷⁰ → Arg, KIV₁₀ Trp⁷⁰ → Phe) i un altre corresponent al residu Arg³⁵ l'únic residu d'aminoàcid de la LBS no idèntic al KIV del plasminogen (KIV₁₀ Arg³⁵ → Lys).

Aquests estudis han demostrat que KIV₇ i KIV₁₀ tenen regions sensibles a la lisina i a la prolina capaces de fer de mitjanceres en la unió de la Lp(a) al fibrinogen modificat per la plasmina, mentre KIV₂ i KIV₉ tenen poca o nul·la afinitat. Els mutants de KIV₁₀ conserven la funció LBS segons el tipus de mutació i aquesta es correlaciona amb la seva capacitat per unir-se al fibrinogen, Mentre amb el canvi Trp⁷⁰ → Arg s'elimina tant la capacitat d'unir-se a

lisina com a fibrinogen, el canvi conservatiu de Trp⁷⁰ → Phe així com Arg³⁵ → Lys redueixen l'habilitat sense anul·lar-la. És important destacar, però que malgrat la seva capacitat per interaccionar amb el fibrinogen, ni KIV₇ ni els mutants de KIV₁₀ tenen cap efecte observable en la fibrinolisi *in vitro*.

Figura 3 Esquema dels *kringles* responsables de la funció LBS



(Adaptat de Scanu, 1999)

La funció LBS de la Lp(a) varia en la població [Armstrong et al., 1990]. Aquesta variabilitat és deguda en part al polimorfisme de KIV₁₀ però alhora és conseqüència d'altres factors estructurals també heterogenis entre els que es troba la composició lipídica i glucídica. Segons aquesta propietat, la Lp(a) plasmàtica es pot fraccionar en espècies que s'uneixen (Lp[a]-Lys⁺) o que fallen en aquesta propietat (Lp[a]-Lys⁻). La proporció de cadascuna de les fraccions depèn de l'individu estudiat [Bas Leerink et al., 1992].

Una publicació recent ha qüestionat la fiabilitat dels resultats obtinguts en l'avaluació de la funció LBS *in vitro*. Els autors [Xia et al., 2000] han trobat que la purificació progressiva de la Lp(a) per diversos mètodes dona com a resultat un increment progressiu en la fracció Lp(a)-Lys⁺ i una disminució de la fracció Lp(a)-Lys⁻. Al mateix temps, l'addició de LDL o fibronectina purificada a Lp(a) purificada en una relació 1 molar redueix la fracció Lp(a)-Lys⁺ en un 34 i 20% respectivament mentre l'addició conjunta d'ambdues substàncies ho fa en un 45%. Aquests resultats podrien indicar que l'heterogeneïtat de la funció LBS no és una

característica intrínseca de la lipoproteïna si no més aviat el resultat en gran part de la seva habilitat per associar-se de forma no covalent a d'altres components abundants en el plasma com ara les LDL i la fibronectina. Aquesta interacció podria emascarar la zona LBS del *kringle* KIV₁₀ de l'apo(a) que actua de mitjancera en la unió. De confirmar-se, aquesta característica haurà de ser avaluada en els treballs que es realitzin en un futur

El poder aterotrombòtic de la Lp(a) ha estat sovint relacionada amb la seva capacitat per interferir en els processos de la fibrinolisi però també, amb altres processos que impliquen la interacció de la partícula amb cèl·lules, receptors, i substàncies de la matriu extracel·lular. Alguns d'aquests processos faciliten la deposició de colesterol com a primer pas en el mecanisme de formació de la placa d'ateroma. Tots ells, tenen en comú que probablement s'hi troba implicada la funció LBS com a mecanisme d'interacció. Aquesta és l'única funció que la Lp(a) no comparteix amb les LDL, .

La contribució de la funció LBS a la malaltia cardiovascular no ha estat suficientment estudiada, probablement per la dificultat dels mètodes cromatogràfics tradicionals per caracteritzar-la. El desenvolupament d'un immunoassaig [Hoover-Plow et al., 1996] per avaluar la funció LBS va permetre al nostre grup quantificar aquesta funció en pacients amb infart prematur i relacionar-la amb altres característiques de l'apo(a), concentració i polimorfisme de mida assenyalades com a contributives de capacitat aterotrombòtica en la lipoproteïna (a). L'afinitat de l'anticòs per la Lp(a), utilitzat en l'assaig es anul·lada totalment per la presència d'àcid epsilon-aminocaproic indicant la seva especificitat per la regió LBS de la proteïna.

1.2.2. Efecte de la Lipoproteïna (a) en el sistema fibrinolític

Com a resultat de l'activació del sistema fibrinolític, es genera plasmina. La plasmina desfà la fibrina dipositada en els vasos sanguinis per l'activitat homeostàtica. El seu precursor, el plasminogen, mitjançant la funció LBS dels seus *kringles* s'uneix a la malla de fibrina dirigint la unió del seu activador tissular (tPA). D'aquesta forma, la plasmina és generada en la secció interior del dipòsit de fibrina dissolent-la i exposant els residus de lisina carboxi-terminal per amplificar la resposta. Un cop la fibrina s'ha desintegrat, el mecanisme s'atura i l'endoteli vascular no allibera més tPA. Llavors la plasmina circulant romanent i el tPA són

inutilitzats pels seus corresponents inhibidors, l'alfa 2 antiplasmina i l'inhibidor de l'activador tissular del plasminogen (PAI-1).

La Lp(a) mitjançant la funció LBS té la capacitat de modular la fibrinolisi competint amb el plasminogen per la unió a la fibrina [Loscalzo et al, 1990]. Havent perdut la funció enzimàtica característica de la plasmina, la unió competitiva de la Lp(a) als residus de lisina de la fibrina actua a favor de l'acumulació de fibrina i lípids en la paret cel·lular. Els estudis *in vitro* sobre la naturalesa trombogènica de la Lp(a) suggereixen que l'afinitat de cada isoforma d'apo(a) per la fibrina, depèn en primer lloc de la mida de l'apo(a) i de forma secundària de la seva concentració plasmàtica, encara que totes dues estan relacionades [Hervio et al., 1993, 1996, Bas Leernik et al., 1994]. Un dels objectius del nostre grup ha estat estudiar la relació entre la mida de l'apoproteïna i la funció LBS avaluada de forma quantitativa. La caracterització de la mida de la proteïna mitjançant la determinació del genotip ens ha permès obviar els problemes de detecció que presenten les tècniques de determinació del fenotip que podrien interferir en els resultats obtinguts.

L'efecte que els canvis en les concentracions de Lp(a) tenen *in vivo* en l'activació del plasminogen s'ha investigat en la Síndrome Nefròtica [Soulat et al., 1999]. L'increment en la unió de la Lp(a) a fibrina observat durant els episodis d'aquesta Síndrome es relaciona directament amb la concentració de Lp(a) i inversament amb la de plasminogen. És de destacar que no es troba correlació amb altres paràmetres lipídics que també manifesten àmplies variacions en aquest període [Soulat et al., 2000].

La interacció de la Lp(a) amb el plasminogen s'estén al procés fibrinolític que té lloc a l'endoteli, el qual juga un paper crític en la regulació del procés trombòtic en virtut de la seva connexió superficial al sistema fibrinolític.

Les cèl·lules endotelials sintetitzen i segreguen tPA el qual pot unir-se com a mínim a dos llocs de la superfície cel·lular. Aquests llocs d'unió mantenen la seva activitat catalítica i el protegeixen del seu inhibidor fisiològic PAI-1. La unió del plasminogen als receptors cel·lulars s'associa amb un increment fins a 12 vegades en l'eficiència del tPA per generar plasmina. [Scott, 1989].

L'acoblament del plasminogen i tPA a les cèl·lules de l'endoteli és un dels mecanismes pel qual aquestes regulen la fibrinolisi. La Lp(a) interfereix en el procés inhibint la unió de Glu-

Plg als seus receptors impedit la formació de plasminogen i plasmina [Hajjar et al., 1989]. En la figura 4 es resumeix esquemàticament el sistema fibrinolític endotelial i la intervenció de la Lp(a) en el mateix.

La competència de la Lp(a) amb el plasminogen pels receptors cel·lulars, no es limita a les cèl·lules endotelials sinó que s'estén als receptors de cèl·lules monocítiques [Gonzalez-Gronow et al., 1989]. La interacció és depenent del temps, específica, saturable, independent de presència en el medi d'ions bivalents i sensible a la temperatura, característiques que també mostra la unió del plasminogen a les cèl·lules endotelials. L'afinitat d'ambdues partícules és similar però, la Lp(a) té aproximadament deu vegades menys punts d'unió que el plasminogen [Miles et al., 1995].

Un dels receptors cel·lulars de l'endoteli que participa en la interacció amb el plasminogen i la Lp(a), ha estat identificat. Consta de dos components, un d'ells és el receptor pròpiament dit i l'altre és una proteïna citoesquelètica, actina que juga un paper important en la localització i unió del plasminogen a la superfície de la cèl·lula [Dudani i Ganz, 1996]. Els estudis *in vitro* amb actina purificada han confirmat que el plasminogen s'hi uneix d'una forma saturable i amb relativa afinitat. Ensenms, ha estat demostrada la capacitat de la Lp(a) per unir-s'hi.

Per últim la reducció en la formació de plasmina es veu facilitada per un tercer mecanisme, la interacció de la Lp(a) amb el PAI.

El PAI-1 està considerat el regulador més important del sistema fibrinolític mitjançant la seva interacció amb els activadors del plasminogen entre els que es troba el tPA. La interacció entre la Lp(a) i el PAI-1 va ser descrita per primer cop fa una dècada [Etingin et al., 1991] quan es demostrà que en cultius de cèl·lules endotelials la Lp(a) era capaç d'incrementar l'activitat del PAI-1 sense alterar els nivells de tPA. La descripció dels polimorfismes genètics del PAI ha permès constatar que la Lp(a) exerceix un efecte potenciador sobre l'expressió de PAI i que aquest efecte és depenent del polimorfisme genètic d'aquesta proteïna [Li et al., 1997].

Coincidint amb la descripció de la regulació del PAI-1 per la Lp(a), s'ha descrit en monòcits una important inducció del RNA missatger de l'inhibidor de l'activador tissular del plasminogen tipus 2 (PAI-2) en pacients amb concentracions plasmàtiques elevades de

Lp(a) [Buechler et al, 2001]. Aquesta inducció sobre una de les formes polimòrfiques del PAI, condueix a l'increment dels nivells intracel·lulars i a la secreció de PAI-2 per aquestes cèl·lules.

1.2.3. Afinitat de la Lipoproteïna (a) pels components de la matriu extracel·lular

La matriu vascular extracel·lular està formada per una densa xarxa de proteïnes i proteoglicans [Wight, 1995]. Entre les proteïnes majoritàries de la matriu es troben: el col·lagen, la fibronectina, la laminina i la vitronectina. Els proteoglicans estan formats per cadenes de glicosaminoglicans amb fortes càrregues negatives unides covalentment a una proteïna situada en el nucli.

Els proteoglicans es diferencien per la seva proteïna i pel nombre, mida i seqüències de les cadenes monosacàrid dels glicosaminoglicans. Els glicosaminoglicans majoritaris de la matriu extracel·lular són l'heparan sulfat, condroitin sulfat i dermatan sulfat.

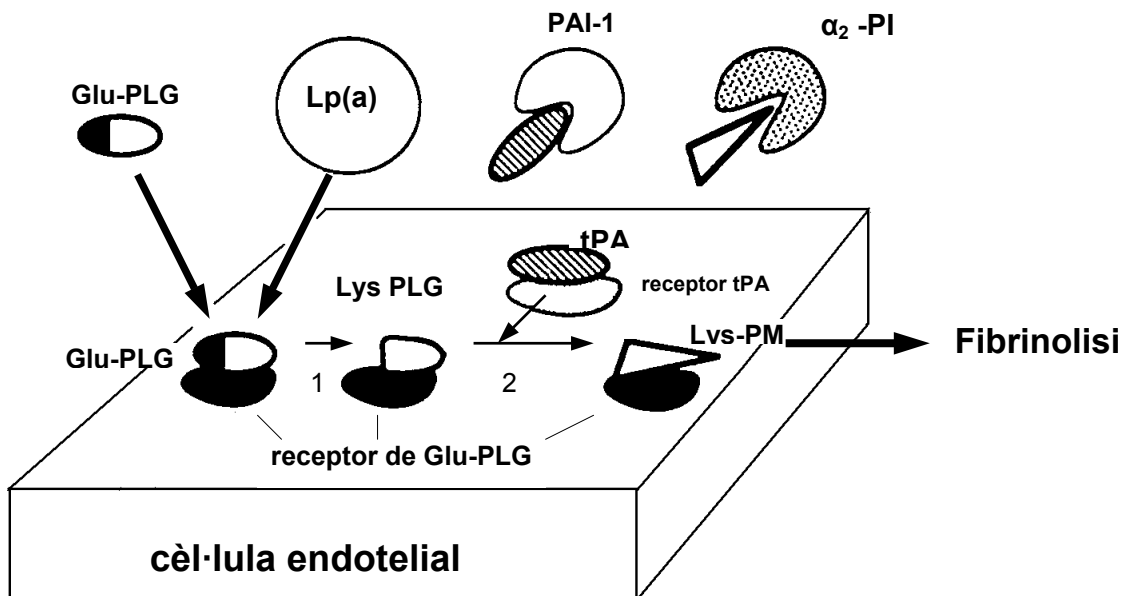
Les lipoproteïnes amb apoB100 poden interaccionar amb els proteoglicans. L'apoB100, conté en la seva superfície, seqüències carregades positivament que poden associar-se amb les fortes càrregues negatives dels proteoglicans de l'íntima [Hurt-Camejo et al., 1997] i contribuir d'aquesta forma al procés aterogènic.

L'afinitat de la Lp(a) pels glicosaminoglicans va ser suggerida per primer cop per Dahlen i els seus col·laboradors quan demostraren que la Lp(a) és capaç d'unir-se a columnes de Sefarosa amb glicosaminoglicans en presència de ions bivalents de calci independentment del tipus de glicosaminoglicà [Dahlen et al. , 1978]. Posteriorment altres autors [Bihari-Varga et al., 1988] confirmaren que la interacció de la Lp(a) amb els glicosaminoglicans de la paret arterial es feia a expenses l'apoB100, reduint la interacció de l'apo(a) a quasi testimonial.

La descripció de mètodes d'obtenció d'apo(a) que no danyen l'estructura de la proteïna i les noves possibilitats que ofereixen els estudis d'interacció amb fragments d'apo(a) generats enzimàticament [Edelstein et al., 1996], han proporcionat un nou punt de vista en la interacció de la Lp(a) amb les proteïnes i proteoglicans de la matriu extracel·lular de forma

que actualment es pot considerar que ambdues apolipoproteïnes, apoB100 i apo(a) hi són implicades.

Figura 4 Interacció de la Lp(a) en el sistema fibrinolític endotelial



Glu PLG: Plasminogen Glutàmic terminal (zimogen); Lys PLG: Plasminogen; Lys PM: Plasmina; α_2 PI: Inhibidor de la plasmina; PAI-1: Inhibidor de l'activador del plasminogen

1. Conversió de Glu-PLG a Lys PLG per la plasmina localitzada en la superfície de l'endoteli.
2. Activació del plasminogen pel tPA

(Adaptat de Scott, 1989)

La interacció entre l'apo(a) i els proteoglicans ha estat estudiada en la decorina, un proteoglicà format per una proteïna de 36 kDa i una sola cadena de glicosaminoglicans (dermatan sulfat). Aquest proteoglicà és sintetitzat a l'endoteli vascular i les cèl·lules musculars llises i es colocalitza amb el col·lagen tipus I en la lesió primària de la placa d'ateroma [Klezovitch et al., 1998].

L'apo(a) lliure s'uneix a la proteïna de la decorina però no al seu glicosaminoglicà. Aquesta unió es veu reduïda si es destrueix l'estructura dels seus *kringles* indicant que la seva conservació és un requeriment essencial per la unió. Els estudis d'afinitat dels fragments generats per l'elastasa han permès demostrar que la decorina s'uneix a l'extrem carboxi-

terminal de l'apo(a) si bé el fet que aquesta interacció no sigui alterada per compostos anàlegs de la lisina com l'EACA fa pensar que no hi intervé la funció LBS. En la unió s'impliquen tant interaccions electrostàtiques entre l'apoB100 i els glicosaminoglicans com hidrofòbiques entre l'apo(a) i la proteïna.

Les LDL i la Lp(a) semblen establir una interacció cooperativa en la matriu mitjançada en bona part pels glicosaminoglicans dels proteoglicans [Lundstam et al, 1999], segons aquesta hipòtesi, la interacció de la Lp(a) amb proteoglicans, del tipus condroitin sulfat incrementaria la unió de lipoproteïnes amb apoB100 a la matriu. Un cop unida a la matriu, la Lp(a) i en menor mesura les LDL, crearien nous llocs d'unió probablement per un procés d'autoagregació. Aquests resultats, han estat obtinguts en cultius de cèl·lules musculars lliures que són probablement les que més contribueixen als components macromoleculars de la matriu de l'intima arterial i que estan fortament implicades en els processos aterogènics.

1.2.4. Afinitat de Lipoproteïna (a) / apolipoproteïna (a) per altres substàncies

L'interès per comprendre els mecanismes precisos pels quals les concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a) incrementen el poder aterotrombòtic de la Lp(a) ha portat a alguns investigadors a la recerca de proteïnes que actuïn com a lligands de l'apo(a) i que puguin explicar les seves funcions fisiopatològiques. Entre aquestes s'ha descrit la β 2-glicoproteïna. Aquesta proteïna amb una seqüència única d'aminoàcids rica en prolina i cisteïna s'estructura en 5 mòduls repetits que es relacionen amb la superfamília de les proteïnes que controlen el complement. La seva interacció amb la Lp(a) *in vivo* podria estar mediatitzada per les repeticions del *kringle* KIV₂ pel *kringle* KIV₆ o per ambdós [Kochl et al., 1997]. Malauradament no se li ha assignat cap funció metabòlica concreta raó que dificulta explicar-ne la relació. S'ha suggerit que pot jugar un paper en el metabolisme dels triglicèrids. A més la β 2-glicoproteïna exhibeix propietats anticoagulants inhibint diferents processos com l'activació per contacte en la via intrínseca de la coagulació, l'agregació de les plaquetes depenent de l'ADP, i l'activitat protrombinasa de les plaquetes. Aquestes funcions podrien ser modulades per la interacció de la Lp(a) dotant a aquesta partícula d'un nou mecanisme d'interferència en el procés de la coagulació sanguínia

1.2.5. Mutacions en l'apoproteïna (a) associades a canvis en la seva funció

La recerca de mutacions en l'apo(a) relacionades amb canvis en la funció d'aquesta lipoproteïna ha donat de moment pocs resultats. La mutació $\text{Trp}^{72} \rightarrow \text{Arg}$ del *kringle* KIV₁₀ de l'apo(a) observada en la mona rhesus, responsable de la pèrdua de funció LBS en la Lp(a) d'aquests primats, ha estat descrita també en humans [Scanu et al., 1994] si bé afecta tant sols al 2% de la mostra estudiada. El seu significat biològic i patològic és incert. No obstant, donat el paper crític que aquest aminoàcid juga en la funció LBS bé podria ser la causa de pèrdua d'afinitat pel fibrinogen. Des del punt de vista de la malaltia cardiovascular, si es pogués extrapolar *in vivo* el concepte que per inhibir la conversió de plasminogen a plasmina és necessària la funció LBS del *kringle* IV₁₀ la mutació es podria considerar com a favorable.

El concepte de polimorfisme en la funció LBS de la Lp(a) s'ha ampliat amb la descripció d'un fenotip de "superafinitat". Trobat en el 4% d'una mostra d'individus de raça caucàsica (americans i mediterranis), la seva Lp(a) presenta una afinitat pel fibrinogen superior en tres a quatre vegades a la dels altres individus, similar a la que presenta l'apo(a) lliure en el grup control on la funció LBS II no es veu impedida per la unió de les LDL. [Scanu et al., 1997]. La incidència familiar d'aquest fenotip amb independència dels nivells plasmàtics de Lp(a), estat nutricional, edat, sexe o tipus de desordre lipídic, dona suport al seu origen genètic. Si s'accepta que l'increment en l'afinitat pel fibrinogen d'aquests pacients es fa a expenses de la segona funció LBS (*kringles* KIV₅ a KIV₈) es pot especular que els pacients amb Lp(a) d'alta afinitat podrien presentar modificacions estructurals potser relacionades amb la composició lipídica de la partícula que els comportaria una apo(a) més exposada. Alternativament també es podria pensar en seqüències mutades en aquests *kringles*. En qualsevol cas, la identificació de Lp(a) d'alta afinitat afegeix un nou polimorfisme funcional que pot ser rellevant en la patologia cardiovascular.

Un darrer estudi ha descrit una mutació en el KIV₈ $\text{Pro}^{12} \rightarrow \text{Trp}$ en el *kringle* IV₈, un dels constituents de l'anomenat segon domini d'unió a la lisina (LBS-II) [Prins et al., 1997]. Aquesta mutació que es dona tant sols en el 2% d'una mostra de la població holandesa sembla incidir en l'afinitat de la Lp(a) amb el fibrinogen però no ha estat descrita en altres poblacions.

La importància de la funció LBS com a mitjancera de la interacció de la Lp(a) per la fibrina, receptors cel·lulars i substàncies de la matriu i la descripció de les mutacions esmentades

així com la ben caracteritzada substitució en els aminoàcids de la LBS de l'apo(a) de la mona rhesus, va encoratjar el nostre grup a cercar noves mutacions en la població mediterrània en el *kringle* IV₁₀ principal responsable de la funció LBS de la Lp(a).

1.2.6. Modificacions postranscripcionals associades a canvis en la seva funció

1.2.6.1. Processos oxidatius

Els estudis *in vitro*, han demostrat que la Lp(a) oxidada amb malonaldehid [Haberland et al., 1992] o coure [Naruszewicz et al., 1992] és captada de forma preferent pels receptors dels macròfegs. La Lp(a) oxidada amb coure injectada de forma intravenosa en rates, és ràpidament eliminada de la circulació sanguínia per un mecanisme de receptor *scavenger* [de Rijke et al., 1992]

Darrerament, ha estat desenvolupat un assaig d'enzimoinmunoanàlisi per mesurar el grau d'oxidació de la partícula gràcies a l'obtenció d'anticossos monoclonals que reconeixen un epítop de la Lp(a) modificada amb un tractament oxidatiu. D'aquesta forma ha estat possible demostrar la presència de Lp(a) modificada per estrès oxidatiu en sèrum humà i el seu augment en circulació en pacients hipertensos així com la presència de Lp(a) oxidada en lesions ateroscleròtiques en humans [Yamada et al., 2000].

1.2.6.2. Processos proteolítics

En el procés de la fibrinolisi s'acumulen leucòcits neutròfils que per un procés de lisi cel·lular o per secreció poden alliberar elastasa, la qual en un entorn plasmàtic és capaç de degradar la fibrina. La modificació de la Lp(a) per l'elastasa podria provocar canvis en la seva funció que modifiquin el seu poder aterotrombòtic.

L'elastasa pancreàtica [Edelstein et al., 1996] i leucocitària [Edelstein et al., 1997] són els dos primers bioenzims dels que s'ha demostrat una acció proteolítica sobre l'apo(a) que és independent de la mida de la proteïna.

Aquests enzims trenquen l'enllaç Ile³⁵²⁰ - Leu³⁵²¹ en la regió d'unió entre els *kringles* IV₄ i IV₅. Aquest tall genera dos fragments, un que representa el domini amino-terminal anomenat F1 i l'altre que representa el domini carboxi-terminal anomenat F2. Ambdós fragments exhibeixen un comportament metabòlic, estructural i funcional diferent. El fragment F₁ sembla ser funcionalment inert i la seva mida varia d'acord amb la mida de la isoforma de la que depèn. El fragment F₂, que comprèn de KIV₅ a la regió proteasa, té capacitat per unir-se a les columnes de lisina-Sefarosa, a la fibrina i a la fibronectina i si s'incuba amb LDL és capaç de formar una partícula anomenada mini Lp(a).

Els estudis metabòlics amb ratolins mostren que mentre els fragments F₁ injectats via intravenosa són ràpidament eliminats del plasma ($T_{1/2}$ 2.9 hores), els F₂ tenen una vida més llarga ($T_{1/2}$ 5 hores) i s'excreten en quantitats marcadament inferiors en orina.

La recerca d'enzims inflamatoris implicats en processos proteolítics de la Lp(a) ha portat a l'estudi de les metal·lo-proteinases, enzims metal·lo-dependents implicats en l'homeòstasi de la matriu extracel·lular que juguen un paper important en el procés ateroscleròtic [Galis et al., 1994].

Dins d'aquesta família la metal·lo-elastasa de macròfegs, també anomenada MMP-12 és un enzim secretat per macròfegs inflamatoris amb amplia activitat elastolítica sobre macromolècules de la matriu com ara la fibronectina, la laminina, la vitronectina i els proteoglicans., *In vitro*, la metal·lo-elastasa trenca l'apo(a) en l'enllaç entre Asn³⁵¹⁸ i Val³⁵¹⁹ situat al costat mateix, en direcció 5' del lloc de tall de l'elastasa de neutròfils (NE) [Edelstein et al., 1999].

La capacitat proteolítica *in vivo* de d'ambdós enzims sobre la Lp(a) ha estat estudiada amb dues soques de ratolí *knock out* per cadascun dels enzims (MMP-12^{-/-} i NE^{-/-}) [Edelstein et al., 1999]. La injecció d'apo(a) evidencia que la generació de fragments F₁ és controlada mitjançant l'activitat MMP-12 atorgant a aquest enzim un paper important en la fisiopatologia de la Lp(a).

Tots els animals injectats amb fragments F1 mostren en orina fragments de mida més petita suggerint que els fragments d'apo(a) són sotmesos a un segon trencament durant el trànsit renal mitjançant un mecanisme independent de NE i MMP-12.

L'alt grau d'homologia entre MMP-12 de ratolí i la humana [Shapiro et al., 1993] i el fet que en plasma humà es trobi espontàniament fragments de mida similar a aquells trobats en el plasma de ratolí al que s'ha injectat apo(a), fa que els autors d'aquest treball especulin sobre la possibilitat d'extrapolar els resultats obrint un nou camp en la investigació de l'acció de la Lp(a).

Altres dos enzims actius en la matriu extracel·lular, la col·lagenasa IV d'origen bacterià i la estreomelisina-1 (MMP-3) [Scanu, 1998] també són capaços de tallar l'apo(a) ja sigui en la seva forma lliure o unida a LDL. En cada cas, la seqüència de tall es localitza en el connector entre els *kringle* IV₄ i IV₅, encara que la posició de l'enllaç peptídic és diferent que la diana de l'elastasa pancreàtica o leucocitària. És interessant remarcar que en líquid sinovial del genoll de pacients amb artritis reumatoidea, s'ha trobat fragments d'apo(a) que segons l'anàlisi electroforètic presenten una mida comparable als generats *in vitro* per l'acció de l'elastasa leucocitària [Scanu, 1998].

1.2.6.3. Processos lipolítics

La fosfolipasa A₂ i l'esfingomielinasa, representen dues classes d'enzims que romanen actius en la paret de l'artèria. Ambdós han demostrat ser capaços de modificar, les LDL i la Lp(a) *in vitro*.

Les LDL modificada per fosfolipasa A₂ s'uneix amb més facilitat que les LDL nativa al proteoglicà, vesican [Hurt-Camejo et al., 1997]. Altrament la Lp(a) modificada per la fosfolipasa A₂ s'uneix a lisina amb més afinitat que la Lp(a) nativa, probablement perquè en el tractament es posa al descobert el LBS II de l'apo(a) [Hoover-Plow et al., 1998]

L'esfingomielinasa per altre part, promou la desestabilització i l'agregació de les LDL, procés que s'ha relacionat amb la patogènia d'aquesta partícula [Xu i Tabas, 1991]. No hi ha dades disponibles sobre si l'enzim exerceix el mateix efecte en la Lp(a). És important destacar però, que la digestió de Lp(a) amb esfingomielinasa no modifica la capacitat d'aquesta d'unir-se a la lisina [Hoover-Plow et al., 1998].

1.2.7. Funcions fisiològiques de la Lipoproteïna (a)

El paper fisiològic de la Lp(a) en els humans roman encara incert. De fet els individus amb concentracions plasmàtiques de Lipoproteïna (a) baixes o nul·les no presenten cap tipus de malaltia o síndrome de deficiència.

La integració de descobriments recents sobre l'estructura i metabolisme d'aquesta partícula lipoproteica ha permès formular algunes hipòtesis relacionades amb les avantatges evolutives que pot representar sintetitzar partícules com la Lp(a) [Lippi et al., 1998].

1.2.7.1. La Lipoproteïna (a) facilita la reparació dels teixits

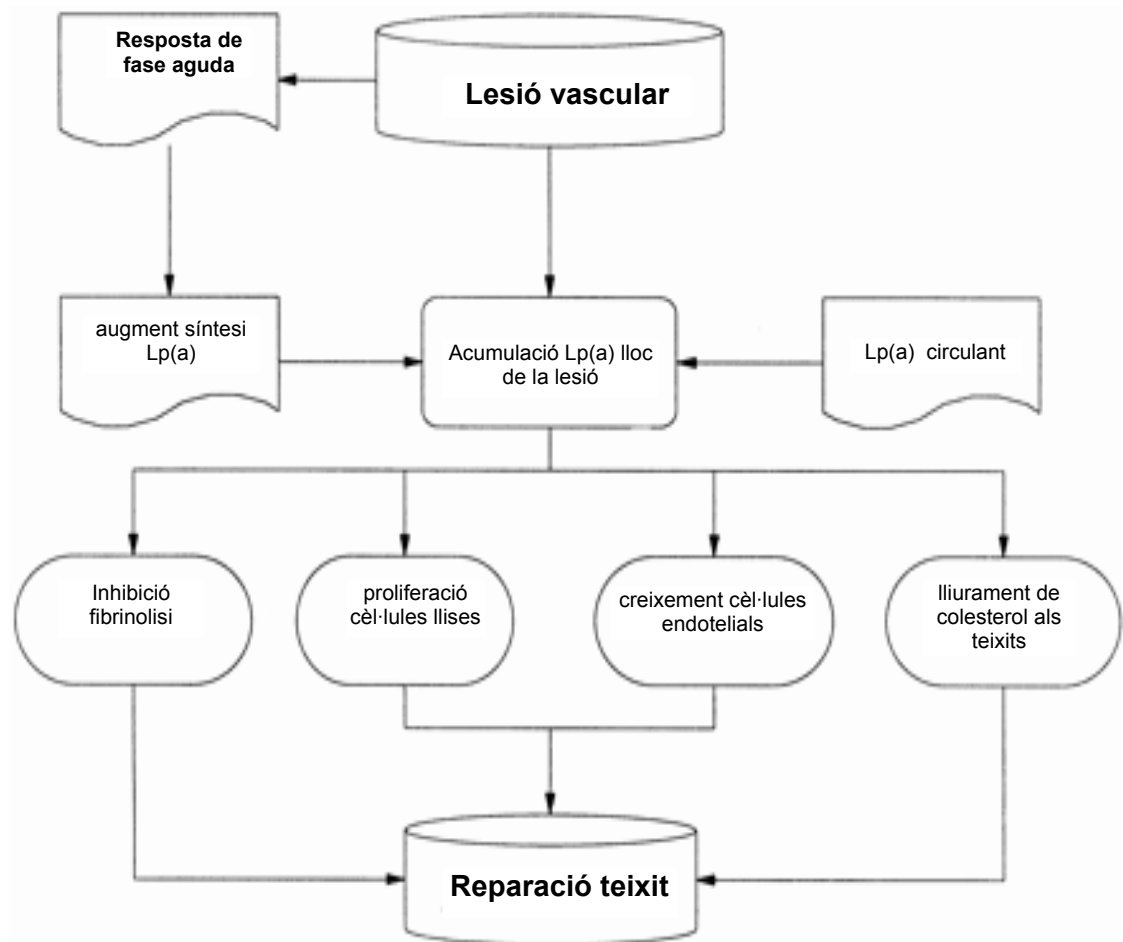
No és descabellat pensar que en el passat la Lp(a) hagi ofert avantatges evolutives als humans promovent o accelerant la cicatrització de les ferides i la reparació dels teixits danyats i les lesions vasculars. Aquesta hipòtesi es recolza en diverses evidències biològiques.

La Lp(a) es comporta com un reactant de fase aguda. [Lippi et al., 1998]. El gen de l'apo(a) conté diverses seqüències que responen a l'acció de la Interleukina-6 (IL-6) [Wade et al., 1993]. La IL-6 genera un augment marcat de la síntesi de mRNA, dosi depenent, que condueix a l'acumulació de partícules de Lp(a) en cultius d'hepatòcits [Ramharack et al., 1998]. La capacitat de la Lp(a), mitjançant la funció LBS, de ser reconeguda per receptors de superfície de cèl·lules endotelials, macròfags, fibroblastes i plaquetes [Hughes et al., 1997] facilitaria aquest procés. Si bé encara no està del tot clar si la partícula de Lp(a) és internalitzada directament o pel contrari és sotmesa a una degradació extracel·lular prèvia, la gran quantitat de colesterol que transporta pot ser extret fàcilment i utilitzat en el lloc on s'acumula.

A més del seu efecte reparador, la Lp(a) mostra característiques de factor de creixement. Promou el creixement de les cèl·lules endotelials de la vena umbilical en un efecte sinèrgic amb factor de creixement dels fibroblastes i insulina [Takahashi et al., 1996] i en cultiu, incrementa la proliferació de cèl·lules vasculars llises inhibint l'activació del factor de transformació del creixement β [Grainger et al., 1994].

Un procés versemblant començaria per la producció de dany vascular que produiria una resposta de fase aguda generada de forma concomitant per l'alliberament de varis mediadors entre els quals la IL-6 que estimularia la síntesi hepàtica d'apo(a) i l'augment de Lp(a) en la circulació. Poc després la Lp(a) s'acumularia en el lloc de la lesió i s'uniria als receptors de les diferents cèl·lules presents i a la fibrina inhibint la lisi del coàgul. Al mateix temps les propietats de factor de creixement promourien la reparació del dany vascular assegurant la regeneració gràcies a la gran quantitat de colesterol transportat. En la figura 5 es mostra un esquema de la funció de la Lp(a) en la reparació del teixit

Figura 5 Visió esquemàtica de la funció de la Lp(a) en la reparació dels teixits.



Adaptat de [Lippi i Guidi, 2000].

La concentració de Lp(a) no es veu modificada pels hàbits alimentaris. És possible doncs, que fa uns milions d'anys en els primats, amb hàbits alimentaris molt diferents dels nostres i amb concentracions plasmàtiques de colesterol total i LDL-colesterol més baixos que els nostres, la quantitat de colesterol transportat per la Lp(a) pogués representar una font important de substrats per la regeneració i el creixement. La colocalització de l'apo(a) amb apoB en teixits en procés de cicatrització recolza aquesta hipòtesi [Yano et al., 1997]. El fet que tant sols en un cinc per cent de les mostres es trobi apoB sense apo(a) suggereix que l'origen d'aquesta apoB és la Lp(a) i no pas les LDL.

1.2.7.2. La Lipoproteïna (a) i el càncer

La relació clínica entre la Lp(a) i el càncer és encara poc clara. La concentració de Lp(a) sovint està augmentada en els pacients amb aquesta patologia respecte els controls sans independentment del tipus i grau de malignitat del tumor [Wright, 1989].

L'angiostatina, fragment del plasminogen que es genera per proteolisi en processos cancerígens inhibeix la neovascularització de tumors i metàstasis [O'Reilly, 1997]. Tenint en compte el grau d'homologia de l'apo(a) amb el plasminogen, és plausible que els fragments d'apo(a) generats en la degradació fisiològica de la Lp(a) tinguin propietats similars i redueixin el creixement i l'extensió dels tumors. Malgrat ser atractiva, la hipòtesi presenta algunes dificultats. Per una part la Lp(a) té una funció semblant a la del factor de creixement amplament reconeguda que entra en contradicció amb un eventual efecte inhibitori de l'angiogènesi. Per l'altre l'administració sistemàtica de proteïnes amb *kringles* no inhibeix la neovascularització i el creixement de metàstasis en els tumors primaris.

1.2.7.3. La lipoproteïna (a) pot ser un succedani de l'ascorbat

Segons la teoria del premi Nobel Linus Pauling [Rath, Pauling 1990] la malaltia cardiovascular és una condició degenerativa induïda per la manca crònica d'ascorbat, en la que la gran deposició extracel·lular de Lp(a) representa un mecanisme defensiu de caire biològic molt potent. Aquesta teoria es basa en la consideració que la Lp(a) es troba en primats i conillets d'índies, espècies que han perdut la capacitat de síntesi *de novo* de vitamina C, en el fet que en animals d'experimentació l'administració d'ascorbat a dosis 40

mg/kg de pes/dia prevé l'acumulació de Lp(a) i el desenvolupament de lesió arterioscleròtica [Rath, Pauling 1990] i en que ambdues molècules podrien compartir algunes propietats bàsiques.

Des de les hores però, no ha estat publicat cap altre estudi experimental que relacioni la Lp(a) amb l'ascorbat en humans. Els estudis posteriors han estat incapaços de demostrar la presència de material immunoreactiu semblant a la Lp(a) en plasma o mRNA en el fetge del conill d'índies suggerint que el material identificat originalment per Rath i Pauling podrien ser proteïnes o polipèptids amb reactivitat creuada [Lawn et al., 1995] i finalment el suplement amb altes dosis d'ascorbat en pacients amb malaltia coronària prematura no produeix un descens important de la concentració plasmàtica de Lp(a). Tot plegat indicaria que la relació entre la Lp(a) i la vitamina C necessita més investigació per ser confirmada.

2. Concentració de Lipoproteïna (a) en plasma i el seu significat en la patologia humana

Actualment encara es desconeixen alguns aspectes relatius al metabolisme i possible funció de la Lp(a). Malgrat tot, les evidències que la relacionen amb la patologia vascular varen aparèixer molt aviat en nombrosos estudis i des de les hores les concentracions elevades en plasma s'han considerat factor de risc independent de patir malaltia cardiovascular.

La concentració de Lp(a) pot variar fins a mil vegades entre diferents individus però es manté remarcablement constant amb l'edat, la dieta i la major part dels tractaments coneguts efectius en la reducció dels nivells plasmàtics d'altres lipoproteïnes.

2.1. Contribució dels polimorfismes de mida de l'apoproteïna (a) a la concentració plasmàtica de Lipoproteïna (a)

La mida de l'apo(a) es relaciona de forma inversa amb la seva concentració plasmàtica [Utermann et al., 1987]. Ambdues característiques estan regulades pel gen de l'apo(a) i cosegreguen juntes. La mitjana de la concentració plasmàtica de Lp(a) en individus amb isoformes petites, és superior a la dels individus amb isoformes grans. Si prenem com exemple la classificació d'Utermann, la concentració mitjana de Lp(a) dels individus tipus B és 10 vegades més alta que dels individus tipus S₄. En la taula 2 es mostren els resultats

que relacionen la mida del gen, de la proteïna i la concentració plasmàtica de Lp(a) obtinguts en dos estudis citats en la bibliografia [Utermann, 1989; Kraft et al., 1992]. En individus heterozigots la concentració de Lp(a) tendeix a ser quasi igual a la suma de les concentracions assignades a les seves respectives isoformes.

Els estudis en cultius cel·lulars d'hepatòcit de mona suggereixen que aquesta correlació està relacionada amb l'eficàcia de processament postranscripcional de l'apo(a) [White et al., 1994], en concret amb la glicació de la proteïna. En aquest procés, que té lloc en el retícul endoplasmàtic, les isoformes més grans romanen més temps en aquest orgànul i tenen per aquesta causa més possibilitats de ser degradades.

Malgrat la variació en la concentració plasmàtica de Lp(a) associada a un mateix al·lel heretat per individus diferents és inferior a 2,5 vegades [Perombelon et al., 1994], en individus no relacionats la mateixa isoforma pot variar fins a dues-centes vegades indicant que altres factors poden també controlar la concentració plasmàtica de Lp(a)

La distribució de la concentració plasmàtica de Lp(a) presenta variacions ètniques importants [Helmhold et al., 1991]. Mentre en la població caucàsica i asiàtica està fortament esbiaixada a l'esquerra, en afroamericans és quasi normal. Aquests darrers, presenten concentracions de Lp(a) varies vegades més elevades que els individus de raça blanca. És important remarcar que les concentracions són també més elevades en cada fenotip individualment [Rotimi et al., 1997]. Aquestes diferències han portat alguns autors a formular la hipòtesi que el control genètic de les concentracions de Lp(a) és diferent en la població africana que la caucàsica [Scholz et al., 1999].

En la població caucàsica aproximadament el 90% de la variabilitat en la concentració plasmàtica de la Lp(a) està regulada per la seqüència del gen de l'apo(a) [Boerwinkle et al., 1992]. Prop d'un 70% d'aquesta variació pot ser explicada pel polimorfisme de mida de l'apo(a) [Boerwinkle et al., 1989]. En la població de raça negra en canvi, la regulació que el gen exerceix sobre els nivells plasmàtics es redueix a un 78% [Mooser et al., 1997] mentre tant sols el 38% d'aquesta variació pot ser explicat pel polimorfisme de mida de la proteïna [Kraft et al., 1996].

Les diferències que s'estableixen entre la contribució del polimorfisme de mida de la proteïna i el que és explicat genèticament, fan pensar que altres polimorfismes així com

altres gens i en menor mesura factors no genètics tenen un paper en la regulació de la seva expressió.

2.2. Altres factors reguladors de les concentracions plasmàtiques

2.2.1. Factors genètics

El gen de l'apo(a) presenta altres polimorfismes de seqüència que han estat relacionats amb els nivells de síntesi de la proteïna i que podrien explicar part de la contribució no atribuïda al polimorfisme de mida.

La concentració de Lp(a) ha estat relacionada amb el polimorfisme de repetició d'un pentanucleòtid (TTTTA)_{n= 7-11} situat en l'extrem 5', en la regió promotora del gen a 1,4 Kb de la seqüència senyal. [Mooser et al., 1995]. Dels 10 genotips diferents que genera, els al·lels de 8 i 9 repeticions són els més freqüents, mentre els de més de 9 repeticions són comuns en individus de raça caucàsica i els de menys, en individus de raça negra. Alguns autors, han trobat un efecte multiplicador en la interacció d'aquest polimorfisme amb el de mida de la proteïna [Rosby i Berg., 2000].

Una altra mutació, +93 C/T en la regió no traduïda de l'extrem 5' introdueix un codó addicional ATG d'inici de la transcripció que *in vitro* redueix fins un 60% la traducció de la proteïna [Zysow et al., 1995]. Aquest polimorfisme mostra un impacte significatiu en la concentració de Lp(a) en africans però no en caucàsics, probablement perquè en individus caucàsics el seu efecte queda emmascarat pel desequilibri d'unió de l'al·lel +93T amb els al·lels de mida intermèdia i amb l'al·lel de 9 repeticions del polimorfisme del pentanucleòtid [Kraft et al., 1998].

Altres polimorfismes detectats en l'anàlisi de la seqüència de nucleòtids del gen de l'apo(a) es troben en la posició -773 i en la posició +121 i consisteixen en el canvi d'una base (G/A). [Ichinose i Kuriyama, 1995]. D'aquests, el que correspon a la posició +121 de la transcripció s'associa amb una regulació positiva en la transcripció del gen.

Recentment la substitució de G/A en la posició +1 de la regió connectora del *kringle* IV₈ s'ha associat amb deficiència congènita de Lp(a) en plasma [Ogorelkova et al., 1999]. Aquest polimorfisme d'una sola base (SNP) que es dona amb relativa freqüència (6%) en individus

de raça caucàsica i no en africans podria contribuir a explicar fins un 25% dels al·lels nuls detectats.

Taula 2 Relació entre isoforma d'apo(a), mida dels fragments obtinguts en la digestió del gen amb l'enzim de restricció KpnI, número de repeticions del *kringle* IV i concentració plasmàtica de Lp(a) en una població de raça caucàsica

Nom isoforma	Massa molecular kDa*	Mida fragment digerit amb KpnI Kb	Nombre de <i>kringles</i> IV ₂	Concentració mitjana Lp(a) mg/L*	Freqüència % **
F	<450	37-49	11-13	#	< 0.2
B	≈ 500	55-66	14-16	617	1.2
S ₁	≈ 550	72-82	17-19	344	3.8
S ₂	≈ 600	88-99	20-22	245	11.2
S ₃	≈ 650	105-116	23-25	102	13.7
S ₄	> 700	121-210	26-42	< 57	70.1

Pocs individus

* (Utermann, 1989)

** (Kraft et al., 1992)

Els mateixos autors [Ogorelkova et al, 2001] han identificat fins a 14 SNP en diferents exons i regions flanquejants d'introns de KIV_{6,8,9 i 10}, alguns dels quals mostren efectes significatius en les concentracions plasmàtiques de Lp(a) quan es té en compte la raça.

Encara que els polimorfismes identificats certament no poden explicar totalment les diferències en les concentracions de Lp(a) entre individus amb la mateixa isoforma ni tampoc les diferències en la mitjana de Lp(a) plasmàtica en races diferents, suporten la hipòtesi que les mutacions tant en les regions codificadores com en la regió del promotor contribueixen a la variabilitat en la concentració plasmàtica entre persones de la mateixa raça i entre races diferents.

2.2.2. Factors no genètics

Entre els factors no genètics que poden afectar els nivells plasmàtics de Lp(a) es troben les hormones i algunes malalties.

L'administració d'esteroids anabolitzants [Albers et al., 1984] o estrògens [Sacks et al., 1994] s'ha associat a descensos significatius en les concentracions plasmàtiques de Lp(a). L'administració d'hormona del creixement [Olivecrona et al., 1993], factor I de creixement [Olivecrona et al., 1995] o el tractament substitutiu amb hormones de les tiroides en l'hipotiroïdisme [de Bruin et al., 1993] es relaciona en canvi amb un augment en la concentració de Lp(a). El mecanisme d'acció d'aquestes hormones en la modulació dels nivells plasmàtics de Lp(a) és desconegut.

Els nivells plasmàtics de Lp(a) en les malalties renals han estat abastament estudiats. Els pacients sotmesos a diàlisi [Thillet et al., 1993], amb insuficiència renal no tractada [Barbagallo et al., 1993] i amb síndrome nefròtica [Kanno et al., 1992], presenten concentracions elevades. S'ha trobat una correlació positiva entre la severitat de la proteïnúria i els nivells de Lp(a) [Joven et al., 1995], probablement reflectint l'increment en la síntesi hepàtica provocada pel descens de la pressió oncòtica secundària a la pèrdua d'albumina [Karadi et al., 1989].

La relació entre diabetis i la concentració de Lp(a) ha estat motiu de controvèrsia en la literatura científica, la qual generalment sembla recolzar un efecte directe d'aquesta malaltia en la concentració, independentment del seu tractament [Joven i Vilella, 1991], [Utermann, 1995].

S'han trobat també augments de Lp(a) plasmàtica en processos inflamatoris, preferentment en el marc d'una reacció de fase aguda [Ledue et al., 1993], que es podrien explicar per la disposició d'aquesta partícula a lliurar els lípids necessaris per reparar els teixits danyats. Malgrat que recentment els resultats d'altres investigadors han entrat en clara contradicció amb aquesta hipòtesi [Mooser et al., 2000].

Altres patologies com el Lupus eritomatós sistèmic [Borba et al., 1994] l'artritis reumatoidea [Rantapaa-Dahlqvist et al., 1991] i preclàmsia [Wang et al., 1998] determinen també augments significatius.

2.3. Metabolisme de la Lipoproteïna (a)

La Lp(a) no és un producte metabòlic d'altres lipoproteïnes [Krempler et al., 1979], el seu catabolisme tampoc implica la conversió en altres lipoproteïnes [Krempler et al., 1980] i la seva concentració plasmàtica és una conseqüència directa de la seva taxa de síntesi.

2.3.1. Síntesi de la Lipoproteïna (a)

Encara que s'ha trobat quantitats apreciables de mRNA d'apo(a) en els testicles i el cervell, el fetge sembla ser l'òrgan de síntesi predominant, ja que és l'únic que també sintetitza apoB i que per tant pot facilitar l'acoblament amb les LDL. L'evidència més directa del paper del fetge en la síntesi d'apo(a) la donen els estudis en malalts sotmesos a trasplantaments terapèutics de fetge. Aquests pacients poden canviar totalment les característiques genètiques de l'apo(a) i adquirir el fenotip del fetge del donant [Kraft et al, 1989].

Els mecanismes pels que es regula la síntesi d'apo(a) són relativament desconeguts. Recentment alguns autors han proposat que part de les diferències en la concentració plasmàtica de Lp(a) podria explicar-se per les diferències en el paper que activadors i repressors tenen en cada individu [Pati i Pati, 2000].

En certa mesura, aquests mecanismes han estat deduïts de la comparació amb la síntesi en primats. El promotor d'apo[a] de primats comparteix un 98% d'homologia amb la regió equivalent dels humans però es diferencia d'aquella per l'absència de dos dels polimorfismes descrits en la regió promotora, el polimorfisme de repetició del pentanucleòtid (TTTTA)_n i el SNP de la posició +93 de la regió no traduïda [Ramharack et al., 1996]. Els primats solen presentar concentracions més elevades de Lp(a). Si bé una part important d'aquestes diferències es poden explicar per la relació inversa entre polimorfisme de mida i concentració, també s'assenyala el promotor com a responsable de l'increment de síntesi. De fet, en experiments de transfecció, el promotor de primat confereix al gen d'apo(a) una activitat 5 cops superior que a la del promotor humà. [Huby et al., 2001].

S'ha descrit que l'expressió hepàtica del gen de l'apo(a) està regulada parcialment per la regió no traduïda del promotor, compresa entre els nucleòtids +88 a +130 que és sensible a la interacció amb el factor hepàtic, HNF-1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) present en abundància en aquest òrgan [Wade et al., 1994]. Però com s'ha demostrat en experiments de transfecció de cèl·lules HepG2 el promotor d'apo(a) per si sol genera uns nivells de transcripció relativament baixos. Sembla probable doncs, que la transcripció òptima com la de la majoria dels gens, pugui dependre de la presència d'una o més regions potenciadores situades a una certa distància del promotor basal.

En aquest sentit s'han trobat un parell de regions amb zones reguladores de la transcripció. Una d'elles a 26 Kb del promotor en direcció 5', requereix de la interacció dels factors de la transcripció Sp1 i PPAR1 [Wade et al., 1997], l'altre en la mateixa direcció, però a 20 Kb de l'inici de la transcripció, conté una seqüència sensible als factors de transcripció. [Yang et al., 1998].

Amb freqüència, apareixen nous estudis que impliquen diferents regions de la zona del promotor en l'activació de la transcripció com la que compren els nucleòtids -703 a -640 (64 parells de bases) que s'uneix a múltiples factors específics del fetge i activa la transcripció en cèl·lules hepàtiques [Handa et al., 2002].

A banda de les seqüències que responen als diferents factors de transcripció, se'n ha identificat d'altres sensibles al retinoid [Ramharack et al., 1998] o als estrògens [Boffelli et al., 1999].

2.3.2. Acoblament de l'apoproteïna (a) a les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL)

Estudis *in vitro* suggereixen que la unió entre LDL i l'apo(a) té lloc fora de la cèl·lula de forma que l'apo(a) sintetitzada de nou, és secretada i fixada a la superfície de l'hepatòcit mitjançant els seus *kringles*. En aquesta localització, pot ser capturada per l'apoB i alliberada de la cèl·lula com a partícula lipoproteica [White et al., 1993]. Probablement la fixació de l'apo(a) a la superfície de la cèl·lula pot facilitar la interacció amb lipoproteïnes que contenen apoB i prevenir la lliure circulació d'apo(a) en el plasma on podria participar en interaccions perjudicials amb d'altres components de la superfície cel·lular.

L'acoblament de la Lp(a) té lloc en dues fases. En la primera, es forma un complex làbil entre les LDL i l'apo(a) per interacció entre els *kringle* IV₅₋₈ i un grup de lisines de l'apoB [Kostner et al., 1997]. Aquesta unió es pot dissociar amb l'addició de lisina, àcid ϵ -aminohexòic (ϵ -AAH) o compostos similars [Frank et al., 1995]. En una segona etapa, es forma un pont disulfur entre un residu de cisteïna lliure localitzat en el *kringle* IV₉ (Cys⁴⁰⁵⁷) (numeració, segons McLean 1997), i una cisteïna de l'apoB [Koschinsky et al., 1993].

L'anàlisi de l'acoblament de l'apo(a) amb diverses apoB truncades; apoB95 i apoB97, ha demostrat que la regió compresa entre els aminoàcids 4330 i 4397 d'aquesta proteïna, juguen un paper clau en la unió covalent amb l'apo(a). [McCormick et al., 1997]. És important ressaltar que aquesta és una regió rica en lisines. Així mateix la seqüència entre els aminoàcids 680 (apoB15) i 781 (apoB18) està implicada en l'associació no covalent amb apo(a) i s'uneix específicament a un o més del *kringles* KIV₅₋₈ de l'apo(a) [Gabel et al., 1998]. El residu Lys⁶⁹⁰ de l'apoB18 s'ha determinat com a crític en el procés d'unió no covalent [Becker et al., 2001]. Basant-se també en proves d'acoblament d'apoB truncades s'ha proposat el residu Cys⁴³²⁶ com a responsable de l'enllaç sulfidril amb l'apo(a) [Gabel et al., 1994]. Estudis recents amb ratolins transgènics han donat suport a aquesta hipòtesi [Cheesman et al., 2000].

2.3.3. Catabolisme de la Lipoproteïna (a)

Encara no s'ha determinat amb certesa el lloc i el mecanisme pel qual la Lp(a) s'extrau de la circulació. Si bé pot ser degradada mitjançant la via del receptor de LDL, s'acumulen evidències suggerint que *in vivo* aquesta no és la via catabòlica més important.

Els experiments *in vitro* amb cèl·lules HepG2 han demostrat que la Lp(a) s'uneix al receptor de les LDL però que ho fa amb afinitat inferior a les LDL [Kostner, 1993]. La unió és inespecífica i quasi insaturable mentre la quantitat de Lp(a) internalitzada és baixa. Una observació similar s'ha obtingut en experiments amb fibroblasts.

Diversos estudis han intentat esbrinar *in vivo* la implicació dels receptors de LDL en l'extracció de la Lp(a) del plasma i la relació entre la seva deficiència i els nivells plasmàtics elevats.

Les persones amb hipercolesterolèmia familiar (HF) presenten concentracions aixecades de Lp(a) amb independència de la isoforma heretada [Bowden et al., 1994]. Aquestes juntament amb les de LDL incrementen encara més el seu risc de patir una malaltia cardiovascular [Lingenhel et al., 1998]. Per tant, els pacients amb HF defectius en el receptor de LDL constitueixen un model adient pels estudis del catabolisme de Lp(a). Mentre que la internalització i degradació de Lp(a) per fibroblasts d'aquests pacients és comparable a les obtingudes amb fibroblasts d'individus sans, la degradació de LDL és virtualment zero [Kostner et al., 1991]. Els resultats suggereixen que probablement aquesta no sigui la causa dels nivells elevats de Lp(a) plasmàtica. És important ressaltar també que la teràpia amb estatines que se sap incrementa dràsticament el nombre de receptors de LDL en el fetge no té un efecte reductor sobre la Lp(a) plasmàtica [Kostner et al., 1989].

El conjunt d'observacions anteriors demostren que el receptor de LDL si està implicat en el catabolisme de la Lp(a), hi juga un paper menor. Ha d'haver-hi per tant altres mecanismes o altres receptors implicats en la captació de Lp(a).

Recentment un estudi *in vivo* ha comparat parelles de germans homozigots i heterozigots per hipercolesterolèmia familiar i ha demostrat que els homozigots, presenten quasi el doble de Lp(a) plasmàtica que els seus germans heterozigots [Kraft et al., 2000]. Els autors proposen que les mutacions en el gen del receptor tenen un efecte directe en les concentracions plasmàtiques de Lp(a). Descartada la via del receptor de LDL el repte continua sent donar explicació als mecanismes pels quals en aquests pacients la Lp(a) tampoc s'extreu de la circulació sanguínia amb la mateixa eficiència que els individus sans.

Els models d'experimentació animal, assenyalen el ronyó i el fetge com els òrgans més importants en la captació de LDL i Lp(a). Els càlculs atribueixen al fetge un 60% de la captació de LDL i un 50% de la de Lp(a). El ronyó per la seva part capta 1.6 vegades més Lp(a) que LDL, suggerint que aquest òrgan reté preferentment Lp(a) i que la capacitat de captació és específica. Tenint en compte que *in vivo* el fetge té un paper cabdal en l'extracció de la Lp(a) del plasma i, considerant que com s'ha esmentat anteriorment, *in vitro* les cèl·lules hepàtiques internalitzen molt poca Lp(a), alguns autors [Kostner et al., 1997] han proposat un mecanisme alternatiu de catabolisme pel qual la Lp(a) podria ser degradada parcialment *in vivo* i d'aquesta forma, els fragments degradats podrien ser captats pel fetge.

La hipòtesi de Kostner i els seus col·laboradors té el seu origen en l'observació de dos processos que la fan plausible. Tant en plasma com en orina es poden detectar fragments d'apo(a) i el tractament de la Lp(a) i l'apo(a) amb algunes proteases genera patrons específics de fragmentació.

L'apo(a) s'excreta en orina en fragments de la porció amino-terminal. Aquests fragments tenen un pes molecular d'entre 35 i 160 kDa segons el nombre de *kringles* IV₂ de la isoforma plasmàtica i poden trobar-se àdhuc en l'orina de pacients que presenten concentracions plasmàtiques no immunodetectables [Moose et al., 1996]. La concentració de fragments en orina, sembla ser proporcional a la concentració plasmàtica de Lp(a). Es calcula que aproximadament el 0.1% de la quantitat de Lp(a) catabolitzada diàriament pot ser extreta del plasma en forma de fragments amino-terminal d'apo(a) mitjançant el ronyó. Paral·lelament en plasma es troben fragments, des de 25-30 kDa, la mida estimada d'un *kringle*, fins a ~200 kDa [Mooser et al., 1996] corresponents també a la posició amino-terminal de la proteïna. La seva concentració està directament relacionada amb els nivells plasmàtics de Lp(a). Tot plegat mostra forces evidències que els fragments d'apo(a) plasmàtics poden tenir el seu origen en la Lp(a) i apo(a) circulant i que aquests podrien ser l'origen dels fragments urinaris.

És un fet rellevant, que la mida dels fragments sigui igual tant en pacients amb isoformes petites com grans, malgrat que recentment ha estat descrit un patró de fragmentació d'apo(a) associat a isoformes petites caracteritzat pel predomini d'un fragment la mida del qual està relacionada amb la mida de l'isoforma original. [Gonbert et al., 2001].

Constatada l'existència de fragments d'apo(a) tant en plasma com en orina, diverses investigacions s'han adreçat a esbrinar-ne la causa. Com s'ha esmentat anteriorment, alguns dels enzims de la família de les serin-proteases com l'elastasa [Edelstein et al., 1996], metal·loproteïnasa [Edelstein et al., 1997] o col·lagenasa [Kostner et al., 1997] hidrolitzen la Lp(a) en una certa extensió donant lloc a fragments específics. De tots ells els generats per les col·lagenases són comparables als obtinguts en orina de pacients

S'ha estudiat l'efecte que té el tractament de Lp(a) amb col·lagenasa en la interacció dels fragments generats amb els receptors LDL de cèl·lules HepG2. En un cultiu amb cèl·lules HepG2 que sobreexpressen receptors de LDL, s'ha demostrat que les LDL natives o tractades amb col·lagenasa, presenten una captació similar. Com era d'esperar, la captació de la Lp(a) nativa no tractada és significativament més baixa que la de LDL. Després del

tractament amb col·lagenasa però, la quantitat de fragments captats per les cèl·lules hepàtiques es dobla i s'equipara a la de LDL.

Amb totes les dades exposades, Kostner i col. han proposat un mecanisme quantitativament important per explicar el catabolisme de la Lp(a). Segons aquest model, la Lp(a) podria ser tallada per proteases específiques del tipus col·lagenasa. L'actuació de la col·lagenasa produiria l'alliberament d'un fragment amino-terminal, que contindria les repeticions del *kringle* IV₂. La partícula romanent amb un pes inferior a 100 kDa restaria formada per LDL i una porció d'apo(a) carboxi-terminal incapaç de bloquejar la interacció de les LDL amb els receptors cel·lulars i seria per tant aclarida del plasma de forma similar a aquesta lipoproteïna. En la figura 6 es mostra un esquema del metabolisme proposat per la Lp(a).

2.4. Significat de la Lipoproteïna (a) en la patologia humana

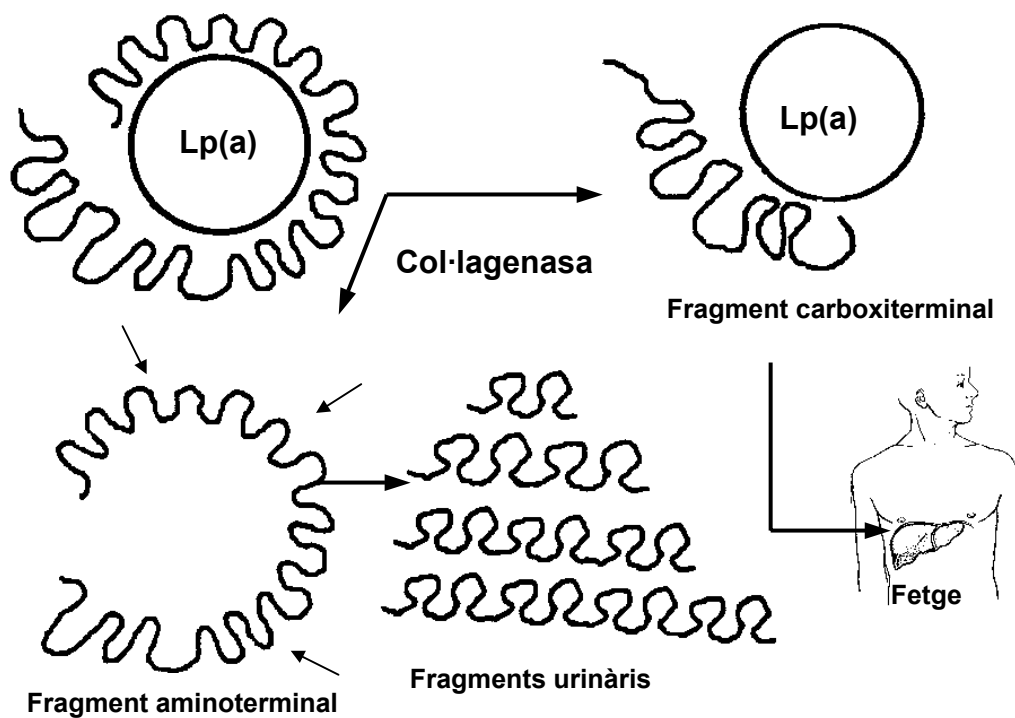
Concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a) s'han associat a la malaltia arterial coronària silent, a l'infart agut de miocardi (IAM), a les malalties cardiovasculars perifèriques i a l'infart cerebral [Kronenberg et al., 1996]. Habitualment, s'han considerat predictives d'IAM en pacients de mitjana edat [Seed et al, 2001] i constitueixen l'anomalia lipoproteica familiar més freqüent entre pacients amb infart agut de miocardi prematur [Pay et al., 1997].

Degut a les seves característiques fisicoquímiques i funcionals s'ha atorgat a Lp(a) un paper pont entre el procés trombogènic i aterogènic [Scanu, 1988; Cremer et al., 1994; Bostom et al., 1996; Wild et al., 1997]. Això no obstant alguns d'aquests estudis han obtingut resultats discrepants [Jauhiainen et al, 1991; Ridker et al., 1993; Alftan, 1994] que han creat una important confusió en l'estudi de la seva patologia.

S'han proposat algunes raons per explicar aquesta aparent contradicció. Degut a la seva complexitat intrínseca, tant genètica com estructural i metabòlica, és necessari aplicar condicions rigoroses d'estandardització dels protocols per extreure conclusions dels resultats de les investigacions que es duen a terme, [Scanu, 2001], però també l'efecte de l'emmagatzematge de les mostres en la determinació de la concentració plasmàtica de Lp(a) ha estat una possible font de discrepància ja que molts d'aquests estudis s'han basat en mostres conservades a diferents temperatures i diferents períodes de temps. [Kronenberg, 1996]. Ha estat intenció del nostre grup contribuir a l'aclariment d'aquesta controvèrsia

estudiant l'efecte que un llarg període de temps, mes de 5 anys, pot tenir sobre la concentració de Lp(a) i la influència que el polimorfisme de mida podria exercir sobre aquesta pèrdua.

Figura 6 Esquema del metabolisme de la Lp(a) proposat per Kostner i col



Adaptat de Kostner et al, 1997

2.4.1. Capacitat aterogènica de la Lipoproteïna (a)

Les propietats aterogèniques de la Lp(a) es troben íntimament relacionades amb les de les LDL. de forma que el potencial cardiovascular de la Lp(a) sembla ser més important en pacients hipercolesterolèmics [von Eckardstein et al., 2001].

Hi han prou evidències per explicar el paper de la Lp(a) en la gènesi, el desenvolupament i la complicació de la lesió ateroscleròtica. Material amb característiques immunoreactives de Lp(a) ha estat localitzat en la paret vascular de diversos vasos arterials incloent l'aorta [Jurgens et al, 1993] i la coronària [Rath et al, 1989]. La quantitat relativa d'apo(a) dipositada en la lesió, s'ha relacionat de forma significativa amb la seva extensió i amb els nivells plasmàtics de Lp(a) [Pepin et al.,1991]. L'acumulació d'apo(a) es pot donar en les seves formes degradada, lliure i oxidada. Un estudi recent però, podria modificar parcialment aquests resultats ja que s'ha detectat mRNA d'apo(a) no així d'apoB, en la paret dels vasos tant d'adults amb aterosclerosi com en infants sans, el que podria indicar que mentre tota les LDL trobada en les artèries té el seu origen exclusivament en el torrent circulatori, l'acumulació de Lp(a) podria en part, ser deguda a la producció *in situ* d'apo(a) en la paret del vas [Fu et al, 2001].

Dos han estat fins ara els mecanismes descrits que podrien facilitar la deposició de la Lp(a) a la paret del vas:

La defensina alliberada pels neutròfils durant el procés de fagocitosi facilita la unió de Lp(a) a la paret vascular [Bdeir et al., 1999].

També s'ha observat que en el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica es produeix l'augment de la síntesi d'heparanasa induït per la presència de LDL oxidada. Aquest enzim és el responsable del descens de glicosaminoglicans tipus heparan sulfat i de l'augment de dermatan sulfat i condroitin sulfat i de facilitar d'aquesta forma la retenció de LDL en la matriu. Aquest canvi sembla ser a la vegada el responsable de l'augment de la fixació de Lp(a) a la fibronectina de la matriu [Pillarsetti et al., 1997].

Indirectament la deposició de Lp(a) es pot fer a través de macròfegs ja que s'ha demostrat que receptors específics, l'activitat dels quals és induïda per colesterol, són capaços de captar i internalitzar Lp(a) reconeixent un domini d'apo(a) diferent dels que s'impliquen en la funció LBS [Keesler et al, 1996].

S'ha descrit també la seva intervenció en altres mecanismes:

1) *La Lp(a) indueix la secreció de substàncies quimiotàctiques i molècules d'adhesió*

Les LDL oxidades però no les intactes, indueixen l'expressió de molècules d'adhesió de monòcits en cèl·lules endotelials i de múscul llis [Cushing et al., 1990]. Donada l'associació en la placa d'ateroma, de Lp(a) i macròfegs, s'ha examinat la capacitat d'aquesta partícula per induir la secreció de factors d'activitat quimiotàctica sobre monòcits en cèl·lules endotelials [Poon et al., 1997]. S'ha comprovat que la Lp(a) indueix la secreció de factors quimiotàctis al medi de cultiu, atribuïbles en la seva totalitat a l'apo(a). Aquesta inducció a diferència de les LDL és causada per l'apo(a) no oxidada. [Haque et al., 2000].

La Lp(a) oxidada té també la capacitat d'induir l'expressió de molècules d'adhesió en cultius de cèl·lules endotelials. Aquesta secreció provoca l'adhesió dels monòcits activats a les esmentades cèl·lules estimulants la seva diferenciació a macròfegs [Ragab et al., 1996]. L'increment de l'adhesió de leucòcits a l'endoteli, es presenta com un procés crucial en el desenvolupament de l'aterosclerosi

2) La Lp(a) mostra propietats de factor de creixement per diversos teixits vasculars

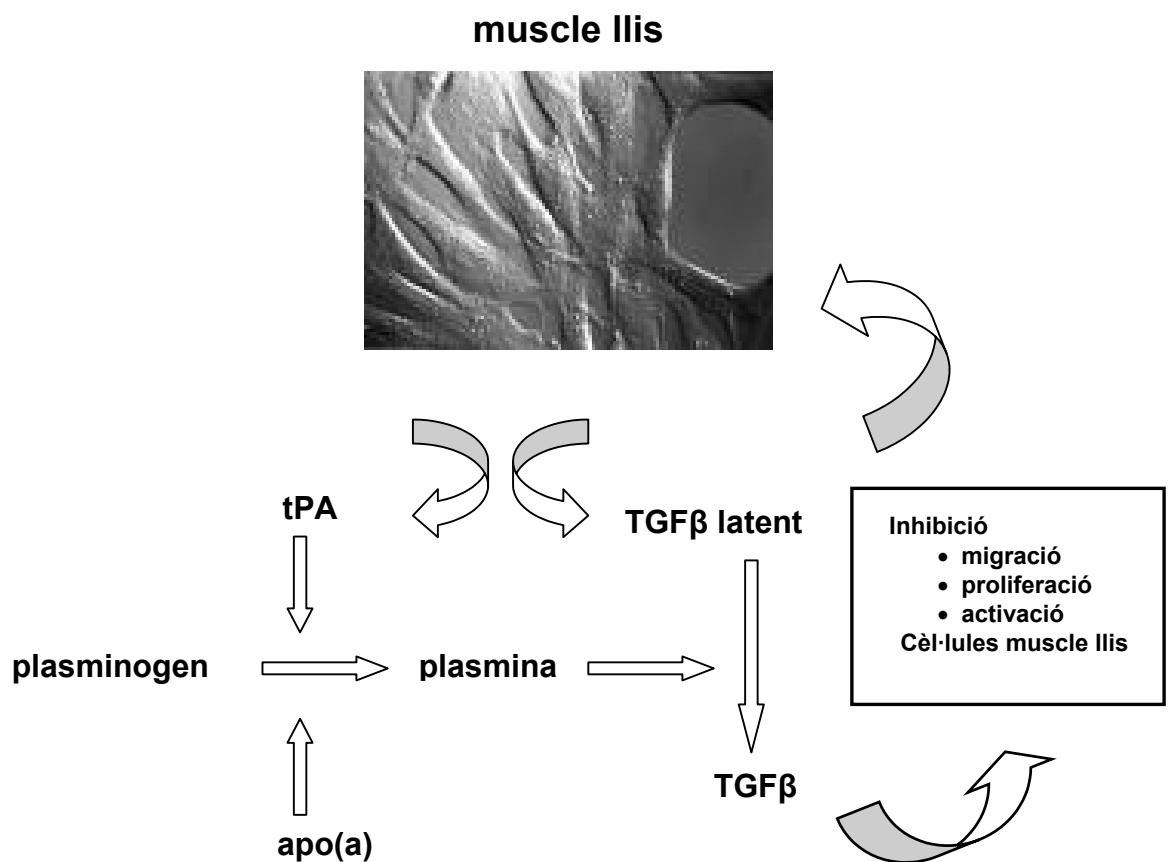
A més del seu paper en la fibrinolisi la plasmina està implicada en altres processos com l'activació de la citoquina, Factor de Transformació del Creixement β (TGF β). Aquesta citoquina que es produeix usualment com una forma latent inactiva és activada proteolíticament per la plasmina i sembla participar en la regulació de la progressió de l'aterosclerosi [Grainger et al., 1993 i 1994]. En resposta a varis agents mitògens que actuen en el lloc de la lesió ateroscleròtica, les cèl·lules vasculars del múscul llis (VSMC) migren al lumen i proliferen per formar una íntima que repari el dany produït. El TGF β és responsable d'inhibir la migració d'aquestes cèl·lules i restaurar l'equilibri. Quan s'inhibeix de forma competitiva l'activació del plasminogen a plasmina, la Lp(a) bloqueja l'activació del TGF β latent. En la figura 7 s'esquematitza el paper de l'apo(a) en l'activació del TGF β

3) La Lipoproteïna (a) altera la capacitat vasodilatadora de l'endoteli

L'alteració de la funció de l'endoteli és un dels primers successos que té lloc en l'aterogènesi, de fet es detecta ja en infants amb hipercolesterolèmia familiar. En models animals i en humans ha estat demostrada una correlació espai temporal entre disfunció endotelial i aterosclerosi coronària. L'alteració de l'endoteli, ha pogut ser induïda experimentalment per l'hipercolesterolèmia i particularment per les LDL.

El grau d'alteració de la dilatació, és relaciona amb les concentracions plasmàtiques de Lp(a) [Sorensen et al, 1994] Concentracions elevades de Lp(a) poden predir una resposta anormal del vas a l'acetilcolina suggerint que els nivells plasmàtics d'aquesta lipoproteïna són potents predictors de disfunció endotelial en pacients normocolesterolèmics [Ioka et al, 2002]. L'alteració està causada per Lp(a) oxidada com s'ha comprovat en un model de ratolins transgènics [Rubanyi et al., 2000].

Figura 7 Interacció de l'apo(a) en el mecanisme d'activació del TGF β .



Adaptat de Grainger i Metcalf, 1995

2.4.2. Capacitat trombogènica de la Lipoproteïna (a)

L'augment de la concentració plasmàtica de Lp(a), ha estat observat en pacients afectats de diverses alteracions trombòtic-oclusives com ara: l'embolisme pulmonar [Csaszar et al, 1995], l'oclusió de la vena retinal central [Tavola et al., 1995] o interferències en la circulació placentària causant de retard en el creixement fetal. [Berg et al., 1994]. Endemés els nivells elevats de Lp(a) són altament predictius de tromboembolisme postquirúrgic en intervencions vasculars i endovasculares [Lippi et al, 1998].

Diversos han estat els mecanismes plausibles proposats per explicar el potencial antifibrinolític de la Lp(a), una considerable part dels quals rau en la seva similitud molecular amb el plasminogen. El més reconegut és la inhibició competitiva de la unió del plasminogen i la seva activació en la superfície de la fibrina, cèl·lules endotelials i plaquetes en proporció directa a la seva concentració.

Harpel i col, han demostrat que la força d'interacció entre l'apo(a) i la fibrina s'incrementa en presència de compostos amb radicals sulfidril com ara l'homocisteïna, la cisteïna, el glutatió i la N-acetilcisteïna [Harpel et al., 1992] una observació particularment atractiva que podria proporcionar un veritable sinergisme entre Lp(a) i homocisteïna en la intricada gènesi de les alteracions trombòtiques.

Altres estudis han implicat la Lp(a) en nous processos potenciadors de la seva capacitat trombogènica:

1) *La Lp(a) interfereix en la producció de tPA i PAI*

La Lp(a) juntament amb altres lipoproteïnes, té un efecte inhibidor de la secreció de tPA en les cèl·lules endotelials [Levin et al., 1994]. Alhora, *in vitro*, especialment en la seva forma oxidada, incrementa fins a dues vegades la síntesi endotelial i la secreció de PAI-1. [Ren et al., 1997], suggerint que l'oxidació de la Lp(a) amplifica el seu efecte antifibrinolític i trombòtic. Altrament el tPA s'uneix de forma reversible a la Lp(a) fixada en la superfície cel·lular inhibint l'activació del zimogen del plasminogen (Glu-Plasminogen) mitjançada per aquesta proteasa [Sangrar et al., 1997].

2) *La Lp(a) interfereix en la funció de les plaquetes per mecanismes divergents*

En el primer procés, clarament trombogènic, la Lp(a) competeix amb el fibrinogen per la unió als receptors de plaquetes en un mecanisme depenent de la lisina inhibint la seva activació pel tPA [Ezratty et al., 1993]. El complex glicoproteic GP IIb-IIIa ha estat identificat com el lloc d'unió de la Lp(a) a les plaquetes.

Per altre banda, com a conseqüència de la lesió vascular, el teixit connectiu, preferentment col·lagen, queda exposat a la llum del vas induint l'adhesió de les plaquetes. Des del moment que es produeix el contacte de les plaquetes amb el subendoteli, s'inicia la seva contracció en un mecanisme depenent de Ca^{+2} que conduirà a l'agregació. L'augment de calci es realitza per l'alliberament d'ADP dels grànuls intracitoplasmàtics i la síntesi de tromboxà A₂. La contracció promou al seu temps la secreció d'altres components intraplaquetars com ara serotonina, factors plaquetars i factors mitògens. La incubació de plaquetes amb LDL i VLDL a concentracions fisiològiques té un efecte potenciador de l'agregació induïda per col·lagen mentre les HDL presenten un efecte oposat. Contràriament al que es podria pensar, la Lp(a) inhibeix aquesta agregació [Gries et al, 1996], suggerint el caràcter no proagregant de l'apo(a) a diferència de les LDL.

3) *Altres mecanismes implicats en els processos trombòtics*

La capacitat d'interacció de la Lp(a) amb components de la coagulació, rics en residus de lisina, ha comportat la cerca d'altres mecanismes que donin suport a una implicació més directa d'aquesta partícula al procés trombòtic.

Un potencial candidat a interaccionar amb la Lp(a) és el *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) que té nombroses lisines en els seu extrem carboxi-terminal. La via extrínseca de la coagulació comença quan el factor VII s'uneix al seu receptor cel·lular, *Tissue Factor-mediated coagulation* (TF). El complex funciona després com a potent enzim que activa el factor X i condueix finalment a la generació de trombina. El *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) és el regulador endogen més important del TF i forma un fort complex amb ambdós factors de la coagulació VII i X.

In vitro, la Lp(a) i l'apo(a) i el plasminogen, no així les LDL, són capaços d'unir-se a TFPI. A més, la Lp(a) inhibeix la seva activitat de forma depenent de la concentració, mentre el plasminogen no té aquest efecte [Caplice et al., 2001]. Aquestes dades suggereixen un nou mecanisme pel qual la Lp(a) mitjançant la funció LBS de l'apo(a) promouria la trombosi.

2.4.3. Paper dels factors genètics en la capacitat aterotrombòtica de la Lipoproteïna (a)

Que el locus de l'apo(a) tingui un efecte dominant en els nivells plasmàtics de Lp(a) i que aquests a la seva vegada es relacionin amb la malaltia cardiovascular, subratlla la importància del gen de l'apo(a). Ara bé, valorar la contribució global del gen de l'apo(a) a la capacitat aterotrombòtica no és senzill si es té en compte que la major part dels individus tenen dos al·lels de mida diferent amb efectes diferents en el potencial aterotrombòtic de la Lp(a) [Scanu i Fless, 1990; Utermann, 1995].

Ja que els processos postranscripcionals actuen afavorint l'acumulació en el plasma de isoformes petites, els individus que hereten una apo(a) de baix PM incrementen el risc de patir una malaltia cardiovascular. Reforça aquesta hipòtesi la demostració *in vitro* que les isoformes petites tenen més avidesa per la fibrina immobilitzada [Hervio et al., 1993]. I els estudis epidemiològics que troben que els pacients amb infart de miocardi tendeixen a presentar isoformes petites (< 23 *kringles*) quan es comparen amb els controls en els què s'incrementa la freqüència de formes intermèdies o grans [Wild et al., 1997; Kronenberg et al., 1999].

Malgrat tot el concepte d'una relació inversa entre la mida de l'apo(a), la concentració plasmàtica de Lp(a) i el risc cardiovascular no és compatible amb un seguit d'observacions. (i) En la major part dels estudis fets en afroamericans els nivells de Lp(a) no es correlacionen amb un increment en el risc de patir malaltia cardiovascular. (ii) El punt de tall de la concentració de Lp(a) a considerar com a patològica és incert degut a la gran variació ètnica i per la manca d'estandardització de les determinacions. (iii) Existeixen evidències de què el potencial aterotrombòtic de la Lp(a) pot ésser influenciat per altres factors com els nivells plasmàtics de LDL, HDL o homocisteïna [Cantin et al., 1998].

Independentment dels nivells plasmàtics, les mutacions que afecten la funció d'unió a la lisina del *kringle* IV₁₀ poden disminuir o augmentar el potencial cardiovascular de la partícula lipoproteica [Scanu et al., 1994]. Al contrari, els individus que exhibeixen un fenotip de "superunió" podrien patir un risc cardiovascular més elevat [Scanu et al., 1997]. Malgrat tot

no hi ha encara evidències clíniques de què aquestes dues darreres observacions o d'altres per descriure tinguin una influència real.

2.4.4. Paper dels factors postranscripcionals en la capacitat aterotrombòtica de la Lipoproteïna (a)

L'observació, *in vitro*, de modificacions en la Lp(a) planteja la pregunta de si successos similars tenen lloc *in vivo*. És important ressaltar que la localització de la Lp(a) es dona principalment en àrees de la paret de l'artèria afectes de processos ateroscleròtics [Rath et al., 1989; Pepin et al., 1991] si bé es coneix poc de la seva naturalesa com a Lp(a) intacta o modificada, apo(a) lliure o fragmentada. Durant la transferència del plasma a la paret de l'artèria, la Lp(a) probablement pateix un seguit de canvis estructurals que depenen de la naturalesa de la partícula i de l'estat funcional de les estructures macromoleculares i els components vasculars. Comparativament, les LDL ha rebut més atenció en aquest procés i se'n coneix més del seu poder aterogènic.

Consideracions similars a les descrites per les LDL poden ser aplicades al component LDL de la Lp(a). El component LDL d'aquesta partícula pot incorporar-se a l'acumulació de partícules de LDL de l'intima arterial i contribuir a la transformació de les cèl·lules musculars llises i els macròfags en cèl·lules escumoses. En absència de trencament dels ponts disulfur però, les LDL pot romandre unida a l'apo(a) i seguir el destí de la Lp(a). Entre aquests es troba la producció de mini-Lp(a) per acció de metal·lo-proteinases [Edelstein et al, 1996; 1997].

L'apo(a) per la seva part se li atribueixen propietats protrombòtiques degut a la seva capacitat entre altres d'interferir en la generació de plasmina [Miles et al., 1989], d'unir-se directament a la fibrina [Loscalzo et al, 1990], d'inhibir la formació de β -TGF [Grainger et al., 1993, 1994] o d'unir-se a diferents components de la matriu extracel·lular [Klezovitch et al., 1998]. Considerant la localització de l'apo (a) principalment en les àrees ateroscleròtiques on es detecta una inflamació subjacent, una qüestió sorgeix en l'estudi dels mecanismes protrombòtics d'aquesta apoproteïna. Quina és la contribució dels fragments d'apo(a) a aquest procés?

Scanu i els seus col·laboradors han postulat que en aquestes àrees hi actuen les elastases generant fragments que tenen capacitat d'unir-se a components de la matriu extracel·lular [Klezovitch et al., 1998]. Emergeix per tant un nou concepte, que en l'artèria inflamada es generen fragment bioactius que tenen capacitat aterogènica.

També s'ha trobat que l'apo(a) indueix l'adquisició d'activitat quimiotàctica en monòcits [Poon et al., 1997] i augmenta l'expressió de molècules d'adhesió [Ragab et al., 1996] que facilita el reclutament de leucòcits en l'endoteli i la seva migració a la matriu subendotelial. De nou en aquest cas els enzims alliberats per aquestes cèl·lules poden modificar l'apo(a) i generar fragments amb diferents capacitats aterotrombogèniques.

HIPOTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi

El kringle IV₁₀ de l'apo(a) és el principal responsable de la unió d'aquesta proteïna a residus de lisina. Aquesta propietat, anomenada funció LBS (*Lysine Binding Site*) sembla jugar un paper clau en la capacitat aterotrombòtica de la lipoproteïna (a)

La funció LBS de la Lp(a) varia en la població. Aquesta variabilitat és deguda tant a la possible existència de polimorfismes de seqüència de l'apo(a) com a altres factors heterogenis entre els que es troba el polimorfisme de mida de la proteïna i la composició lipídica i glucídica.

La consideració de la concentració plasmàtica de Lp(a) com a factor de risc independent en el desenvolupament de la malaltia cardiovascular pot ser modificat per la contribució de la funció LBS a la capacitat trombogènica de la partícula

Objectius

Objectiu 1. Valorar la funció LBS de la lipoproteïna(a) en pacients amb malaltia arterial coronària prematura

Objectiu 2. Examinar la relació que existeix entre el polimorfisme de mida de l'apo(a), la concentració plasmàtica de Lp(a) i l'activitat LBS, en aquests pacients

Objectiu 3. Cercar mutacions en la seqüència d'aminoàcids del *kringle* IV₁₀, que puguin ser causants de modificacions en la funció LBS.

Objectiu 4. Investigar l'efecte que té la conservació de les mostres emmagatzemades un llarg període de temps, en les concentracions plasmàtiques de Lp(a)

Estudi 1

Impact of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity on the lysine binding function of lipoprotein(a) in early onset coronary artery disease
JM Simó J Joven E Vilella, M Ribas, MA Pujana IM Sundaran J Hammel
J Hoover-Plow. *Thromb Haemost* 2001 85(3):412-7

Estudi 2

Polymorphisms in human apolipoprotein(a) kringle IV-10 and coronary artery disease: relationship to allele size, plasma lipoprotein(a) concentration, and lysine binding site activity
JM Simó J Joven E Vilella, M Ribas, L Figuera, C Virgos
IM Sundaran J Hoover-Plow.
J Mol Med (2001) 79 294-299

Estudi 3

Instability of Lipoprotein(a) in plasma stored -70°C: Effects of concentration apolipoprotein(a) genotype , and donor cardiovascular disease
JM Simó, J Camps, E Vilella, F Gómez, A Paul and J Joven.
Clin Chem (2001) 47:9 1673-1678

Impact of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity on the lysine binding function of lipoprotein(a) in premature coronary artery disease

Josep M. Simó^a, Jorge Joven^{*a}, Elisabet Vilella^a, Montserrat Ribas^a, Miguel A. Pujana^b,
Indirana M. Sundaram^c, Jeffrey P. Hammel^d, Jane L. Hoover-Plow^{†c},

^a Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain

^b Institut de Recerca Oncològica

^c Joseph J. Jacobs Center for Thrombosis and Vascular Biology, Dept. Molecular Cardiology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio

^d Dept. of Biostatistics and Epidemiology, Cleveland Clinic Foundation

*Address reprint requests to Dr. Jorge Joven at Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Calle Sant Joan s/n, 43201, Reus, Spain. Tel +34 977 310300, Fax +34 977 312569, e-mail jjoven@grupsgs.com

†Corresponding Author: Jane Hoover-Plow, Ph.D., Department of Molecular Cardiology/NB50, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio, 44195; Tel (216) 445-8207, Fax (216) 444-9263, e-mail hooverj@ccf.org

Running Title: Lp(a) LBS function in CAD

Summary

Elevated plasma Lp(a) is an independent risk factor for cardiovascular disease. Unique to Lp(a) is the apoprotein, apo(a) which can vary from 250-800 kDa in molecular weight. Small isoforms are also associated with the risk of cardiovascular disease. The purpose of this study was to examine the association of Lp(a) concentration, apo(a) size, and Lp(a) lysine-binding site(s) (LBS) function in patients with premature heart disease, and age-matched controls. Mean values of Lp(a) were significantly higher in the patients than for the age-matched group. The smallest molecular weight isoform for each subject had significantly fewer kringles for the patients than the age-matched controls. There was a significant correlation between LBS activity and kringle number in the single-banded phenotypes of the patients, but not the controls. LBS activity was significantly higher in patients in the small isoforms (≤ 18 kringles) compared to controls. The odds ratio for coronary artery disease for high LBS activity and high Lp(a) concentration was 4.4 ($p = 0.002$) and for high LBS activity in small isoforms was 10.1 ($p = 0.002$). In the patients, Lp(a) concentration was higher, apo(a) size was smaller, and LBS activity higher in the small isoforms compared to the controls. This study suggests an association of high LBS activity in small isoforms of Lp(a) with disease in humans.

Key words: Lipoprotein(a), apo(a) size, lysine binding site function, myocardial infarction

Introduction

Numerous studies have demonstrated that plasma lipoprotein (a) [Lp(a)] concentrations are elevated in patients with coronary artery disease [CAD] (for review (1)), but some prospective studies have failed to find an association between initial plasma Lp(a) concentration and the occurrence of myocardial infarction (2). Lp(a) is a class of lipoprotein particles resembling low density lipoproteins (LDL) in which the apoB-100 is covalently linked to a highly polymorphic glycoprotein, apolipoprotein (a) [apo(a)], a multikringle structure with a high degree of homology to plasminogen (3). Apo(a) contains multiple copies of the plasminogen-like kringle 4 (KIV) domain (4). These kringles are similar but not identical to each other and 10 distinct types of kringles have been identified (KIV types 1 through 10). The tandem repeats of KIV type 2 constitute the molecular basis of Lp(a) isoform size heterogeneity and most Caucasian individuals (94%) have two apo(a) alleles that contain different numbers of KIV repeats, ranging from 3 to > 40 (5). The distribution of plasma Lp(a) is highly skewed towards lower levels and in general there exists an inverse association between the number of KIV repeats, the size of apo(a) isoforms, and plasma Lp(a) concentrations (6).

Certain of the kringles of apo(a), like K4 of plasminogen function as lysine binding sites (LBS). The LBS consists of a trough lined by three aromatic residues flanked on one end by two anionic residues and at the other end by two cationic residues (7). The KIV type 10, contributes most of the lysine affinity of apo(a), but KIV types 5-8, also contain LBS (8). The LBS mediate the interaction of Lp(a) with Lys residues in fibrin, cells, and extracellular matrix components (9-12). The LBS activity of Lp(a) has been shown to play a key role in the pathogenic activity of apo(a). Wild-type apo(a) transgenic mice show a marked increase in the development of lipid lesions and deposition of apo(a) in the aorta compared with a strain of mice expressing an apo(a)

in which the two key anionic residues (Asp55, Asp57) were replaced by alanine, resulting in a 70% loss of the LBS activity (13,14). In humans and Rhesus monkeys, a naturally occurring polymorphism has been described for single point substitution (Trp72 to Arg) that nearly eliminates lysine binding of intact Lp(a) (15,16). This finding also suggests that apo(a) isoforms might show variability in LBS function. It has been recently shown that Lp(a) particles containing distinct apo(a) isoforms display functional heterogeneity for fibrin and monocyte binding, with the low molecular mass isoforms having the highest affinity (17). A logical step was to assess LBS function of Lp(a) in patients with CAD, with a recently developed accurate and simple immunoassay that can quantify LBS activity (14,18). Therefore, in this study, we have examined the relationship of apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, plasma concentration and LBS activity of Lp(a) in patients who have survived an early onset myocardial infarction.

Materials and Methods

Study population

The procedures used in this study complied with the ethical standards of the Hospital Universitari de Sant Joan. Blood samples were obtained from 95 male patients, who participated in a previous study (19) and had one episode of acute myocardial infarction before the age of 50 years. To ensure genetic predisposition 95 subjects were selected with no history of familial hypercholesterolemia, renal failure, liver disease, hypertension, obesity or diabetes mellitus from a group of 250 patients. The patients were compared with 95 male controls without clinical evidence of coronary disease and having a similar age (± 4 years) and BMI (± 1.1), randomly chosen from the routine health and safety-at-work checks conducted in several industrial companies in our area.

Lipid and Lipoprotein measurement

Cholesterol and triglycerides were determined enzymatically with the CHOD-PAP and the lipase/GPO/PAP methods, respectively, as previously described (20). High density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured with a homogeneous assay recently described (20).

Quantification of plasma Lp(a)

The concentration of Lp(a) in plasma was determined by immunoturbidimetry using antibodies, calibrators and standards supplied by Incstar Corporation (Stillwater, MN) (21). The specificity of the apo(a) antibodies and ability to recognize equally the different apo(a) size isoforms has already been described (22). The assay is not affected by the presence of apoprotein B, plasminogen or hyperlipidemia and shows a good correlation with a double monoclonal ELISA assay used at the Northwest Lipid Research Laboratories (21).

Apo(a) glycoprotein size determination by immunoblotting

Apo(a) phenotyping was performed by sodium dodecyl sulfate (SDS) agarose gel electrophoresis of plasma under reducing conditions followed by immunoblotting as recently described (23). In brief, 125 ng of delipidated Lp(a) was boiled for 10 min in the presence of 10 μ M dithiothreitol, 3% SDS, 0.5 mM EDTA and 22.5 mM Tris buffer, pH 8.2, and then bromophenol blue (0.1%), glycerol (1%), and α -iodoacetamide (100 mM) were added at room temperature. Agarose (1.5%) electrophoresis was performed in a GNA chamber (Pharmacia, Uppsala, Sweden) at 120 V, 4°C and during 6 h. Protein were transferred to nitrocellulose membranes and incubated sequentially with a polyclonal goat anti-human Lp(a) (BiosPacific, Emeryville, CA) and a monoclonal mouse anti-goat IgG coupled with alkaline phosphatase. Bands were made visible colorimetrically and the number of KIV repeats assigned according to standards supplied by Immuno AG (Vienna, Austria).

Apo(a) genotype determination

Apo(a) alleles were determined by a modification of the procedure described by Lackner et al (5). Leukocytes were isolated from whole blood, suspended to a final cell concentration of 2×10^7 cells/mL and embedded in low-melting-temperature agarose plugs. The separation was performed in a Gene NavigatorTM apparatus (Pharmacia) with alternating pulses of 4 s at 190 mA for 30 min, followed by 10 s pulses at 170 mA for 18 h and 6 s pulses at 170 mA for 6 h. Premade plugs containing lambda phage concatamers (Pharmacia) were used as a size standards and several samples were used as internal standards to assure accurate measurement of migration in different gels. The size-fractionated DNA was blotted to a nylon membrane and hybridized with an [³²P]dCTP radiolabeled human apo(a) KIV-specific single-stranded fragment (MP1), (5) kindly provided by Dr. Helen Hobbs, Univ. Texas Southwestern Medical Ctr, Dallas. The apo(a) alleles were designated by the estimated number of KIV encoding sequences per allele. A single KIV repeat was considered to be 5.5 kb in length.

Measurement of LBS activity

The frozen plasma samples were shipped on dry ice to Cleveland with no evidence of thawing during transit. The samples were stored at -70°C and assayed within 10 wk. of arrival. The samples were thawed only once and assayed the same day. The LBS function of Lp(a) was measured with a quantitative LBS-Lp(a) immunoassay as previously described (14). The maximum absorbance of each sample, taken at the plateau of the concentration curve (4-80 mg/L), was compared to an isolated Lp(a) reference standard. Thus, the measurement of LBS activity in this assay is not concentration dependent and LBS activity can be quantified in plasma samples with as little as 2-5 mg/L of Lp(a) protein (14). The limit of the Lp(a) concentration assay was 49 mg/L, so for samples < 49 mg/L, the plasma was assayed at 0, 1:2, and 1:4 dilutions. In the LBS-Lp(a) immunoassay (14), two-lysine analogues, ϵ -aminocaproic acid (EACA) and lysine, produced similar dose-dependent inhibition of the LBS antibody binding to Lp(a). The average IC₅₀ for EACA was 0.5 and for lysine 3.7 mmol/L. These values are in excellent agreement with values (1.3 and 3.8 mmol/L for EACA and lysine, respectively) obtained in our lysine-bead assay (24) where Lp(a) is in solution. In a preliminary study, we determined that LBS activity did not change significantly with up to 12 weeks of storage at -70°C.

Statistical analysis

Values are expressed as the mean $\pm$ SD or SEM as indicated. Statistically significant differences were set at $p < 0.05$. Multiple Kolmogorov-Smirnov one-sample tests were performed to determine the fit of the data to a normal distribution. Accordingly, the differences between groups were assessed using ANOVA or Mann-Whitney's U test following the indications of the F test. The association between variables was measured by linear regression analysis and Spearman rank correlation. The association between the likelihood of CVD and the level of LBS activity was measured by odds ratios with 95% confidence intervals within high and low levels of Lp(a) concentration and the smallest kringle number. Tests for associations

and for differences in the odds ratios were carried out using Wald statistics from logistic regression models. The analyses were performed with SPSS-PC (SPSS Inc., Chicago, IL) and SAS version 6.12 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Description of the subjects

Patients with myocardial infarction were young ($45 \text{ yr.} \pm 6$, mean $\pm$ SD), and the mean age of the control group matched patients, 45 ± 5 . There were no differences in body-mass index between the groups considered and the percentage of current or former smokers was significantly ($p < 0.005$) higher (81.2%) in patients with myocardial infarction than in controls (46.2%). Patients also showed a higher ($p < 0.05$) enrichment of cholesterol ($5.76 \pm 0.70 \text{ mmol/L}$) and triglyceride ($2.09 \pm 1.33 \text{ mmol/L}$) in apo B containing lipoproteins and lower HDL-cholesterol ($1.00 \pm 0.23 \text{ mmol/L}$) as compared with the control group (5.49 ± 0.91 , 1.66 ± 1.17 and $1.11 \pm 0.25 \text{ mmol/L}$, respectively).

Differences in plasma Lp(a) concentration and apo(a) size

The mean and median Lp(a) concentration was significantly higher in patients than age-matched controls (Table 1). In the control group, $> 77\%$ of the individuals had plasma Lp(a) concentrations less than 300 mg/L whereas only 51% of patients had plasma Lp(a) levels in this range ($p < 0.05$). The distribution of plasma Lp(a) concentration for each group is shown in Figure 1. Plasma Lp(a) concentrations were not normally distributed, and only patients had Lp(a) levels $> 800 \text{ mg/L}$. Skewness and kurtosis were higher in patients than in controls. In the whole group (all subjects), we found a total of 31 apo(a) size alleles with KIV repeat numbers ranging from 8 to 39, 96% of the subjects had two apo(a) alleles that contained different numbers of KIV repeats, and the number of homozygous subjects did not differ between groups. The largest isoform (of each subject) was equally distributed in the two groups (Fig. 2), but patients showed a significantly higher prevalence of isoforms ≤ 22 in the smallest isoform (for each subject) than controls ($p = 0.037$). Likewise, the mean kringle number of the largest isoform was not different between groups (Table 1), but the mean kringle number for the smallest isoform was higher ($p < 0.05$) in controls.

There was an inverse relationship between the size of the apo(a) alleles and the plasma concentration of Lp(a), which is consistent with data found in other studies (22,25). The Spearman rank correlation values for the relationship between the sum of the apo(a) allele sizes was significant in patients (-0.377, $p < 0.0005$) but not in controls (-0.116, $p > 0.05$). As a whole group (all subjects), there was no substantial correlation between Lp(a) concentrations and the number of KIV repeats in the largest isoform (per subject), but plasma Lp(a) concentrations (y) correlated negatively with the number of KIV repeats in the smallest isoform (per subject) (x) [$y(\text{mg/L}) = 581.44 - 16.76x$; $r = 0.315$, $p < 0.0005$]. Lp(a) concentration at various kringle numbers is depicted in Fig. 3. Lp(a) concentration is significantly higher for the isoforms of 16-18 and 19-22 kringles (Fig. 3) in the patients than the controls. The apo(a) size of ≤ 22 KIV kringles was more prevalent in patients (74%) than controls (62%). Lp(a) concentration was significantly higher in the patients (400 ± 344 , $n = 72$) with smaller apo(a) isoforms (≤ 22 kringle number) compared to the age-matched controls (180 ± 166 , $n = 69$), but not with larger isoforms (> 22 kringles).

LBS activity and its relationship to Lp(a) concentration and size

Although there was a trend toward higher values in patients, the mean LBS activity of Lp(a) was not significantly different between groups (Table 1). The frequency of LBS activity was normally distributed in both groups (data not shown), but the peak frequency of LBS activity was shifted toward higher LBS activity values in the patients (70-80%) compared to the control group (50-60%). There was a strong and positive correlation between plasma Lp(a) concentration and the LBS activity ($r = 0.524$, $p < 0.0005$ for the whole group), that was observed in both groups (Figure 4). We have observed a negative association of LBS activity with expressed isoform in single-banded phenotypes (Figure 5) but this association was only significant ($r = -0.632$, $p = 0.0005$) in the patients (Figure 5). Thus, in the patients, both Lp(a)

concentration and LBS activity of the small isoforms were higher than in controls. LBS activity of the single-banded phenotypes was 49% for patients and 47% for controls, but if we consider only those with kringle numbers ≤ 22 the difference between patients ($65\% \pm 2$, mean $\pm$ SEM, $n = 48$) and controls ($54\% \pm 2$, $n = 38$) is statistically significant. As found in other studies, Lp(a) concentration and apo(a) size are independent risk factors (model 1) for CVD in this study (Table 2). LBS activity is not an independent risk factor, but high LBS activity becomes a significant risk factor when considered with high Lp(a) concentration ($p = 0.003$) or low kringle number ($p = 0.004$) (Table 2). The odds ratio for high LBS activity and high Lp(a) concentration is 4.4 and for high LBS activity and low kringle number the odds ratio is 10.1.

Discussion

In this study of patients with an early onset myocardial infarction, we document elevated plasma Lp(a), a preponderance of small apo(a) isoforms, and an association of elevated Lp(a) and high LBS activity with the small isoforms compared to controls. This study demonstrates an association of the LBS function of Lp(a) with cardiovascular disease in humans. Numerous and extensive clinical studies have indicated that elevated plasma Lp(a), particularly values above 300 mg/L, is a major independent risk factor for CAD. While this generalization is not supported in all studies or all populations, many investigators have reached similar conclusions (reviewed in (1)). Several studies also demonstrate a high prevalence of low molecular weight apo(a) isoforms in patients with CAD (26,27). In a recent study, Gazzaruso et al (28) found that Lp(a) with small apo(a) isoforms (280-640 kDa) was associated with two or more stenosed coronary vessels (75% of patients), compared to only 24% of the patients with high molecular weight isoforms (655-790 kDa). African-Americans (29) and African populations (30) have high concentrations of Lp(a), but the elevated Lp(a) is of the larger isoform size and is not as great a coronary disease risk as elevated small size isoforms found in Caucasians (31). In our study, patients with apo(a) kringle numbers between 16 and 22 of the smallest isoform had significantly elevated Lp(a) concentration compared to controls. Our results indicate that it is not only the elevated concentration of Lp(a), but elevated Lp(a) in subjects with small apo(a) isoforms contribute to the CAD risk.

The importance of the LBS function of Lp(a) in the development of atherosclerosis has been demonstrated in transgenic mice. Atherosclerosis is reduced in transgenic mice carrying apo(a) with a mutation in the KIV-10 kringle in which ASP 55 and ASP 57 are replaced by

ALA, and LBS activity is reduced (13,14). In another study (32), a recombinant adenovirus with an apo(a) construct was injected into the apoB transgenic mice. Three apo(a) constructs were studied, wild-type, a mutation of TRP 72 substituted for ARG in the KIV-10 kringle, and the Rhesus monkey construct with the TRP to ARG mutation in KIV-10 and the absence of a KV kringle. Both of these mutations have markedly reduced LBS activity (14). Lesion formation was reduced in both mutant constructs compared to the wild-type apo(a). In a clinical study, Karmansky et al. (33) examined lysine-binding species of Lp(a) in two groups of subjects with CAD, one with severe (2 or 3-vessel) and the other with moderate (one vessel) disease. The Lp(a) concentration of both the Lys(+) and Lys(-) species were higher in patients with severe disease than patients with moderate disease. These authors did not examine apo(a) size in this study. In a cell culture system, we have demonstrated (34) that modifications of the LBS function, alter retention in the extracellular matrix. Modifications of Lp(a) which selectively increase LBS function also selectively increase binding to the matrix.

In addition to the observation in several studies (26,27,35) that the low-molecular isoforms are associated with CAD, studies have demonstrated that smaller molecular forms of Lp(a) that have a higher affinity for fibrin (36) and a greater antifibrinolytic effect (37) than large isoforms, and small molecular weight forms have a lower binding affinity for macrophages than the higher molecular weight forms (17). Our results suggest that properties which increase retention in the vessel wall (LBS function) and binding to fibrin and cells (small isoforms) are associated with Lp(a) of patients with CAD.

Although the distribution of the alleles in our study was in Hardy Weinberg equilibrium, the apo(a) isoforms detectable by immunoblotting are not. This suggests that the methods currently used to analyze the apo(a) protein do not detect all of the apo(a) gene products. Since a

significant percentage of isoforms may not be detectable the analysis was made with subjects showing the single banded phenotype, and the conclusions are similar to those obtained with the genotype. This is not surprising if we accept that the detection of an isoform is related to its size, and undetected isoforms may be from larger alleles than those coding for detectable proteins. Other authors (5,38) consider the apo(a) gene itself as an important determinate of the plasma levels of Lp(a) and consequently of LBS activity. In our study the percent of individuals with single-banded phenotypes, similar to that observed in other studies (39-41) could represent a lack of sensitivity to detect all of the apo(a) genetic products with the electrophoresis and immunodetection methods (42). Other factors, such as, rapid clearance, inefficient synthesis or secretion could also affect plasma concentrations.

The increased LBS activity found in the small isoforms of the patients could be due to either sequence polymorphisms or post-translational modifications. Sequence polymorphisms of Lp(a) which have been identified to date do not exhibit enhanced LBS function (15,16,43). The Lp(a) LBS immunoassay measures the LBS activity of Lp(a). Certain kringle of apo(a) (KIV types 5-8, LBS II) have LBS activity and are not available at the surface of most intact Lp(a) particles or are occupied by lysines from apoB. The LBS II is unavailable in the intact Lp(a), but can be measured in the isolated apo(a), and could be the site of enhanced LBS activity in the small isoforms. It is unclear whether the LBS II is available in vivo under certain circumstances, such as after enzymatic or chemical modifications. Substitutions of amino acids in the LBS pocket of KIV 10 which could enhance LBS activity, e.g. K1 of plasminogen has different amino acids in the LBS pocket which results in enhanced LBS affinity compared to K4 of plasminogen and KIV type 10 of apo(a). According to the study of Rejante and Llinas (44), NMR experiments indicate the ligand-binding site of plasminogen kringle 1 is a shallow cavity

composed of Pro33, Phe36, Trp62, Tyr64, Tyr72 and Tyr74 with the double charged anionic and cationic center configured by the side chain of Asp55 and Asp57, and Arg34 and Arg71. In Plg K4 and Lp(a) KIV 10, there are two amino acid substitutions (7,45,46) which may account for the reduced affinity of Plg K4 compared to K1, and these are His33 instead of Pro33 and a Phe64 instead of the Tyr in K4 compared to K1 of plasminogen. Substitutions of these two amino acids in Lp(a) KIV 10 from His33 to Pro33, and Phe64 to Tyr64 could increase the affinity of the LBS. In plasminogen K1 these substitutions direct the ligand amino group toward Arg 34 and Arg71 (3). KV of Lp(a) could also be a potential site of mutations which could enhance LBS activity in Lp(a) (47). We previously demonstrated that certain enzymatic and chemical modification of Lp(a) may alter LBS activity, such as phospholipase A₂ or oxidation (18), and small isoforms may be more susceptible to these types of modifications resulting in altered LBS activity. Determination of the sequence polymorphisms and susceptibility to modification of low molecular weight isoforms of Lp(a) in patients with CAD and their effect on LBS function will be important to our understanding of the pathogenicity of Lp(a).

Acknowledgments

This work was supported in part by the Fondo de Investigación Sanitaria, the National Institutes of Health Grant HL 18577, and the American Heart Association, Ohio Valley Affiliate.

Reference List

1. Kronenberg F, Steinmetz A, Kostner GM, Dieplinger H: Lipoprotein(a) in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996; 33: 495-543.
2. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ: A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 1993; 270: 2195-2199.
3. Scanu AM, Edelstein C: Kringle-dependent structural and functional polymorphism of apolipoprotein(a). *Biochim Biophys Acta* 1995; 1256: 1-12.
4. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang W-J, et al: cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330: 132-137.
5. Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahmig T, Hobbs HH: Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1991; 87: 2153-2161.
6. Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C: Lp(a) glycoprotein phenotypes: Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 1987; 80: 458-465.
7. Wu T-P, Padmanabhan K, Tulinsky A, Mulichak AM: The refined structure of the ϵ -aminocaproic acid complex of human plasminogen kringle 4. *Biochemistry* 1991; 30: 10589-10594.
8. Ernst A, Helmhold M, Brunner C, Pethö-Schramm A, Armstrong VW, Müller H-J: Identification of two functionally distinct lysine-binding sites in kringle 37 and in kringles 32-36 of human apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 1995; 270: 6227-6234.
9. Rouy D, Koschinsky ML, Fleury V, Chapman J, Anglés-Cano E: Apolipoprotein(a) and plasminogen interactions with fibrin: A study with recombinant apolipoprotein(a) and

- isolated plasminogen fragments. *Biochemistry* 1992; 31: 6333-6339.
10. Klezovitch O, Edelstein C, Scanu AM: Evidence that the fibrinogen binding domain of Apo(a) is outside the lysine binding site of kringle IV-10: A study involving naturally occurring lysine binding defective lipoprotein(a) phenotypes. *J Clin Invest* 1996; 98: 185-191.
 11. Miles LA, Fless GM, Scanu AM, et al: Interaction of Lp(a) with plasminogen binding sites on cells. *Thromb Haemost* 1995; 73: 458-465.
 12. Miles LA, Sebald MT, Fless GM, et al: Interaction of lipoprotein(a) with the extracellular matrix. *Fibrinolysis Proteolysis* 1998; 12: 79-87.
 13. Boonmark NW, Lou XJ, Yang ZJ, et al: Modification of apolipoprotein(a) lysine binding site reduces atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 558-564.
 14. Hoover-Plow JL, Boonmark N, Skocir P, Lawn R, Plow EF: A quantitative immunoassay for the lysine-binding function of lipoprotein(a): Application to recombinant apo(a) and lipoprotein(a) in plasma, and modified lipoprotein(a). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 656-664.
 15. Scanu AM, Pfaffinger D, Lee JC, Hinman J: A single point mutation (Trp72-->Arg) in human apo(a) kringle 4-37 associated with a lysine binding defect in Lp(a). *Biochim Biophys Acta* 1994; 1227: 41-45.
 16. Scanu AM, Miles LA, Pfaffinger D, et al: Rhesus monkey Lp(a) binds to lysine-Sepharose and U937 monocytoid cells less efficiently than human Lp(a). Evidence for a dominant role of kringle 4₃₇. *J Clin Invest* 1993; 91: 283-291.
 17. Kang C, Durlach V, Soulat T, Fournier C, Anglés-Cano E: Lipoprotein(a) isoforms display differences in affinity for plasminogen-like binding to human mononuclear cells.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2036-2043.
18. Hoover-Plow J, Skocir P: Enzymatic and chemical modifications of lipoprotein(a) selectively alter its lysine-binding functions. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1998; 1392: 73-84.
 19. Joven J, Simó JM, Vilella E, et al: Lipoprotein(a) and the significance of the association between platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and the risk of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998; 140: 155-159.
 20. Simó JM, Castellano I, Ferré N, Joven J, Camps J: Evaluation of a homogeneous assay for high density lipoprotein cholesterol: Limitations in patients with cardiovascular, renal and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998; 44: 1233-1241.
 21. Levine DM, Sloan BJ, Donner JE, Lorenz JD, Heinzerling RH: Automated measurement of lipoprotein(a) by immunoturbidimetric analysis. *Int J Clin Lab Res* 1992; 22: 173-178.
 22. Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J, Nava ML, Patsch W, Morrisett JD: Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): Inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 1990; 31: 603-613.
 23. Martin S, Ladona MG, Pedro-Botet J, Covas MI, Rubies-Prat J: Differential expression of double-band apolipoprotein(a) phenotypes in healthy Spanish subjects detected by SDS-agarose immunoblotting. *Clin Chim Acta* 1998; 277: 191-205.
 24. Hoover-Plow JL, Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Plow EF: Comparison of the lysine binding functions of lipoprotein(a) and plasminogen. *Biochemistry* 1993; 32: 13681-13687.
 25. Kraft HG, Sandholzer C, Menzel HJ, Utermann G: Apolipoprotein(a) alleles determine lipoprotein(a) particle density and concentration in plasma. *Arterioscler Thromb* 1992;

- 12: 302-306.
26. Lindén T, Taddei-Peters W, Wilhelmsen L, et al: Serum lipids, lipoprotein(a) and apo(a) isoforms in patients with established coronary artery disease and their relation to disease and prognosis after coronary by-pass surgery. *Atherosclerosis* 1998; 137: 175-186.
 27. Klausen IC, Sjol A, Hansen PS, et al: Apolipoprotein(a) isoforms and coronary heart disease in men - A nested case-control study. *Atherosclerosis* 1997; 132: 77-84.
 28. Gazzaruso C, Geroldi D, Garzaniti A, et al: Apolipoprotein(a) phenotypes as genetic markers of coronary atherosclerosis severity. *Int J Cardiol* 1998; 64: 277-284.
 29. Marcovina SM, Albers JJ, Wijsman E, Zhang Z, Chapman NH, Kennedy H: Differences in Lp[a] concentrations and apo[a] polymorphs between black and white Americans. *J Lipid Res* 1996; 37: 2569-2585.
 30. Rotimi CN, Cooper RS, Marcovina SM, McGee D, Owoaje E, Ladipo M: Serum distribution of lipoprotein(a) in African Americans and Nigerians: Potential evidence for a genotype-environmental effect. *Genet Epidemiol* 1997; 14: 157-168.
 31. Srinivasan SR, Dahlén GH, Jarpa RA, Webber LS, Berenson GS: Racial (black-white) differences in serum lipoprotein (a) distribution and its relation to parental myocardial infarction in children: Bogalusa Heart Study. *Circulation* 1991; 84: 160-167.
 32. Hughes SD, Lou XJ, Ighani S, et al: Lipoprotein(a) vascular accumulation in mice - In vivo analysis of the role of lysine binding sites using recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1997; 100: 1493-1500.
 33. Karmansky I, Shnaider H, Palant A, Gruener N: Lysine-binding species of lipoprotein(a) in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 360-366.
 34. Hoover-Plow J, Khaitan A, Fless GM: Phospholipase A₂ modification enhances

- lipoprotein(a) binding to the subendothelial matrix. *Thromb Haemost* 1998; 79: 640-648.
35. Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, et al: Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis - Prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 1999; 100: 1154-1160.
 36. Hervio L, Girard-globa A, Durlach V, Angles-Cano E: The antifibrinolytic effect of lipoprotein(a) in heterozygous subjects is modulated by the relative concentration of each of the apolipoprotein(a) isoforms and their affinity for fibrin . *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 411-417.
 37. Hervio L, Chapman M, Thillet J, Loyau S, Anglés-Cano E: Does apolipoprotein(a) heterogeneity influence lipoprotein(a) effects on fibrinolysis? *Blood* 1993; 82: 392-397.
 38. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH: Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest* 1992; 90: 52-60.
 39. Gazzaruso C, Garzaniti A, Buscaglia P, et al: Association between apolipoprotein(a) phenotypes and coronary heart disease at a young age. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 157-163.
 40. Geroldi D, Bellotti V, Buscaglia P, et al: Characterization of apo(a) polymorphism by a modified immunoblotting technique in an Italian population sample. *Clinica Chimica Acta* 1993; 221: 159-169.
 41. Rainwater DL, Ludwig MJ, Haffner SM, VandeBerg JL: Lipid and lipoprotein factors associated with variation in Lp(a) density. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 313-319.
 42. Valenti K, Aveyrier E, Laporte F, Hadjian AJ: Evaluation of the genotyping and

phenotypic approaches in the investigation of apolipoprotein(a) size polymorphism. Clin Chim Acta 1997; 263: 249-260.

43. Prins J, Van der Hoek YY, Biesheuvel TH, Leus FR, van Rijn HJM, Kastelein JJP: The functional and clinical significance of the Met-->Thr substitution in kringle IV type 10 of apolipoprotein(a). Thromb Res 1998; 90: 125-130.
44. Rejante MR, Llinás M: Solution structure of the ϵ -aminohexanoic acid complex of human plasminogen kringle 1. Eur J Biochem 1994; 221: 939-949.
45. Ramesh V, Petros AM, Llinás M, Tulinsky A, Park CH: Proton magnetic resonance study of lysine-binding to the kringle 4 domain of human plasminogen. J Mol Biol 1987; 198: 481-498.
46. Rejante MR, Byeon I-JL, Llinás M: Ligand specificity of human plasminogen kringle 4. Biochemistry 1991; 30: 11081-11092.
47. Xue S, Green MA, LoGrasso PV, et al: Comparison of the effects of Apo(a) kringle IV-10 and plasminogen kringles on the interactions of lipoprotein(a) with regulatory molecules. Thromb Haemost 1999; 81: 428-435.

Table 1
Lp(a) plasma concentration, apo(a) size, and LBS function.

	Mean	Median	Standard deviation	Range
Plasma Lipoprotein(a) (mg/L)				
Myocardial infarction	334	297	299	< 49-1346
Age-matched controls	176*	146	160	< 49-596

apo(a) size (Kringles number)				
<u>Largest isoform</u>				
Myocardial infarction	25.24	25.00	4.42	11-34
Age-matched controls	26.12	25.00	5.10	14-39
<u>Smallest isoform</u>				
Myocardial infarction	18.61	18.00	4.48	8-30
Age-matched controls	20.41 [†]	20.00	4.77	11-34
LBS activity (%)^a				
Myocardial infarction	52.8	57.0	24.7	0-103
Age-matched controls	50.3	53.0	24.6	0-98

*p < 0.0005 with respect to patients, and [†]p = 0.008 with respect to patients. LBS activity is the percent of the reference Lp(a). Largest and smallest isoforms refer to the largest or smallest isoform determined for each subject with 2 isoforms.

Table 2.
Association of Lp(a) Concentration, Smallest kringle number, and LBS activity with CAD.

Variable	Odds Ratio (95% confidence Ratio)	p value
1) Lp(a) concentration	1.18 (1.09-1.27)	< 0.001
Smallest kringle	0.92 (0.86-0.98)	0.009
LBS Activity	1.02 (0.96-1.08)	0.49
2) Small kringle number (< 22)		
Low LBS	0.58 (0.27-1.28)	0.18
High LBS	10.10 (2.1-48.8)	0.004
3) High Lp(a) (>300mg/L)		
Low LBS	2.55 (0.97-6.7)	0.06
High LBS	4.40 (1.7-11.34)	0.002

Models considered one risk factor at a time. In models 2 and 3, a subset was evaluated, either smaller kringles (model 2) or high Lp(a) (model 3).

Figure Legends

Figure 1. Frequency distribution of plasma Lp(a) concentration in patients with myocardial infarction (Panel A, n = 95), and age-matched controls (Panel B, n = 95).

Figure 2. Frequency distribution of apo(a) alleles in patients with myocardial infarction (Panel A), and age-matched controls (Panel B). Black bars represent the smallest isoforms and white bars the largest isoforms determined for each subject with 2 isoforms.

Figure 3. Lp(a) Concentration of Various Size Isoforms (mean $\pm$ SEM). Lp(a) concentration is plotted versus the smallest kringle determined for each subject with 2 isoforms. The number of subjects per group for the various kringle sizes are: patients -- ≤ 15 , n = 28, 16-18, n = 23, 19-22, n = 21, 23-25, n = 17, > 26 , n = 6; and age-matched controls -- ≤ 15 , n = 15, 16-18, n = 25, 19-22, n = 25, 23-25, n = 14, > 26 , n = 16. Gray bars are values for patients and black bars for the controls.

Figure 4. Scatterplot of LBS activity values versus Lp(a) concentration for patients (Panel A ●) and controls (Panel B □).

Figure 5. Scatterplot of the Lp(a) LBS activity versus the number of KIV repeats of the phenotypes of single banded subjects), controls -- n = 54 (Panel A) and patients -- n = 39 (Panel B. Correlation coefficients of LBS activity for CAD patient phenotype was statistically significant ($p < 0.0005$).



Springer

Dear Author:

Please find attached the final pdf file of your contribution, which can be viewed using the Acrobat Reader, version 3.0 or higher. We would kindly like to draw your attention to the fact that copyright law is also valid for electronic products. This means especially that:

- You may not alter the pdf file, as changes to the published contribution are prohibited by copyright law.
- You may print the file and distribute it amongst your colleagues in the scientific community for scientific and/or personal use.
- You may make an article published by Springer-Verlag available on your personal home page provided the source of the published article is cited and Springer-Verlag is mentioned as copyright holder. You are requested to create a link to the published article in LINK, Springer's internet service. The link must be accompanied by the following text: The original publication is available on LINK **<http://link.springer.de>**. Please use the appropriate URL and/or DOI for the article in LINK. Articles disseminated via LINK are indexed, abstracted and referenced by many abstracting and information services, bibliographic networks, subscription agencies, library networks and consortia.
- You are not allowed to make the pdf file accessible to the general public, e.g. your institute/your company is not allowed to place this file on its homepage.
- Please address any queries to the production editor of the journal in question, giving your name, the journal title, volume and first page number.

Yours sincerely,

Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Josep M. Simó · Jorge Joven · Elisabet Vilella
Montserrat Ribas · Lúdia Figuera · Carmen Virgos
Indirani M. Sundaram · Jane Hoover-Plow

Polymorphisms in human apolipoprotein(a) kringle IV-10 and coronary artery disease: relationship to allele size, plasma lipoprotein(a) concentration, and lysine binding site activity

Received: 29 November 2000 / Accepted: 28 December 2000 / Published online: 23 February 2001
© Springer-Verlag 2001



JOSEP MARIA SIMÓ specializes in clinical chemistry and is presently Director of Clinical Laboratories in the Hospital Universitari Sant Joan de Reus. He received his M.D. degree from the Universitat de Barcelona and his Ph.D. from the Universitat Autònoma de Barcelona. His research interests focus mainly on lipoproteins, cardiovascular risk factors, and animal models for atherosclerosis.



JORGE JOVEN belongs to the staff of the Clinical Laboratories in the Hospital Universitari Sant Joan de Reus and is currently running the overall quality assurance program (ISO 9002). He received his degree in biological sciences from the Universitat Autònoma de Barcelona. His research interest is focused mainly in lipoprotein(a).

Abstract Elevated plasma levels of lipoprotein(a) [Lp(a)] represent a major independent risk factor for the development of atherosclerosis. The kringle IV type 10 of apolipoprotein(a) [apo(a)] is the primary lysine binding site (LBS) of Lp(a) and is associated with lesion formation in transgenic mice. The purpose of this study was to search for mutations in the apo(a) kringle IV type 10 which could alter the LBS activity of Lp(a) from patients with coronary artery disease. We found the DNA region of kringle IV type 10 of apo(a) to be mutable but relatively well preserved in the Spanish population. We identified a novel mutation which probably leads to a truncated form of apo(a) in a patient heterozygous for the mutation and with low lysine binding activity and low plasma Lp(a) concentration. Two other mutations have been previously identified in humans, the substitutions W81R and M75T. The W81R was not found in our sample, but the M75T mutation was present in 43% of patients with coronary artery disease and 23% of age-matched controls. The genotype TT conferred a significant risk for myocardial infarction (odds ratio 2.53). This association was not due to linkage disequilibrium with kringle IV repeats. The M75T polymorphism was not associated with the LBS function of apo(a), but it influenced plasma Lp(a) concentration.

Keywords Apoprotein(a) · Kringle IV 10 · Lysine binding site activity · Lipoprotein(a) · Mutation · Polymorphism

Abbreviations apo(a): Apolipoprotein(a) · CAD: Coronary artery disease · KIV: Kringle IV · LBS: Lysine binding site · Lp(a): Lipoprotein(a) · SSCP: Single-stranded conformational polymorphism

J.M. Simó · J. Joven (✉) · E. Vilella
M. Ribas · L. Figuera · C. Virgos
Centre de Recerca Biomèdica,
Hospital Universitari de Sant Joan,
C/Sant Joan s/n, 43201, Reus, Spain
e-mail: jjoven@grupsgs.com
Tel.: +34-977-310300, Fax: +34-977-312569

E. Vilella · L. Figuera · C. Virgos
Hospital Psiquiàtric Universitari Institut Pere Mata,
Reus, Spain

I.M. Sundaram · J. Hoover-Plow
Joseph J. Jacobs Center for Thrombosis and Vascular Biology,
Department of Molecular Cardiology,
Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation,
Cleveland, Ohio, USA

Introduction

Elevated plasma lipoprotein(a) [Lp(a)] concentrations are associated with an increased risk of coronary artery disease (CAD) [1]. Lp(a) is a lipoprotein particle that has as a protein moiety apo B-100, linked by a single disulfide bridge to a multikringle structure, apolipoprotein(a) [apo(a)], which has a high degree of homology to plasminogen [2]. The cDNAs of apo(a) and plasminogen have been cloned, and the two genes are found to be closely linked on chromosome 6 (q26–27) [3]. Apo(a) contains multiple copies of the plasminogenlike kringle IV (KIV) domain which are similar but not identical to each other, and ten distinct classes have been designated (KIV types 1–10). The tandem repeats of KIV type 2 constitute the molecular basis of Lp(a) isoform size heterogeneity (see Fig. 1A). Plasma Lp(a) concentration segregates as an autosomal quantitative dominant trait under the control of a single locus [4, 5]. In most populations there exists an inverse association between the number of KIV type 2 repeats and plasma Lp(a) concentrations [6].

The kringle domains of plasminogen contain lysine binding site(s) (LBS) which interact with the carboxyl terminal lysines of proteins, mediating binding to cells and substrates [7]. Lp(a) also exhibits LBS properties, and the KIV type 10 is the primary LBS of Lp(a) which can mediate the interaction of Lp(a) with cells [8, 9], extracellular matrices [10], and fibrin [11]. The activity of LBS plays a key role in the pathogenic activity of apo(a) [12, 13]. Two mutations of KIV type 10 have been described which reduce LBS activity, one is the substitution W72R found in rhesus monkeys [14] which corresponds in humans [15] to the W81R, according to the HSAIPOA sequence (NCBI), and a second mutation,

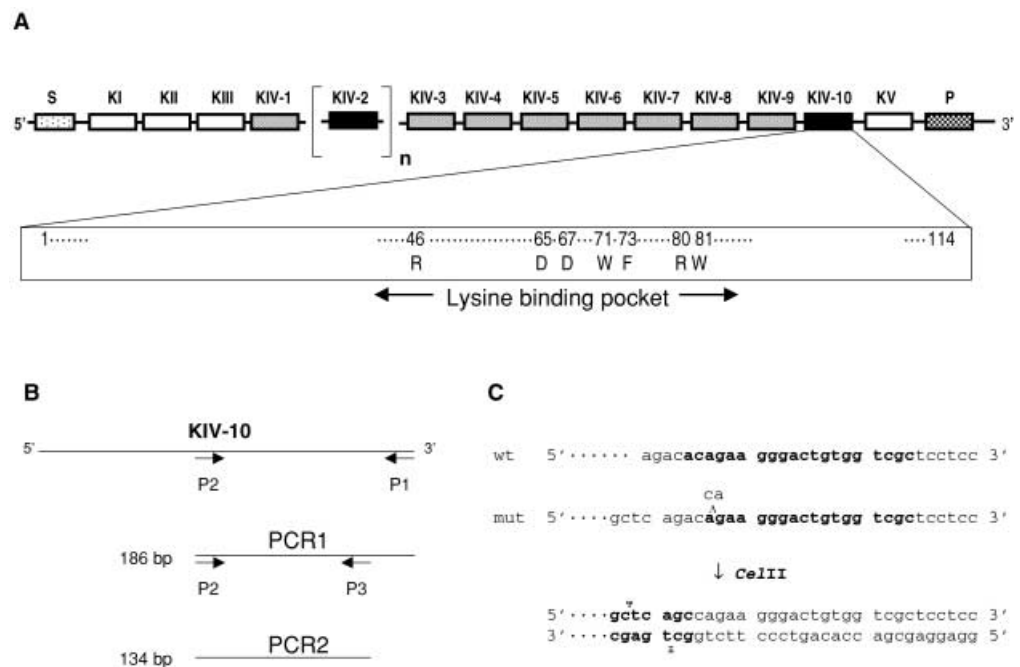
the substitution D57N, which has been reported in the chimpanzee [16]. The substitution in the chimpanzee is associated with poor fibrin binding, and a substitution of D55 and D57 to A in r-apo(a) causes reduced LBS activity but does not abolish activity [13]. Another mutation with a substitution M75T, located in the vicinity of the postulated LBS pocket, is not associated with a LBS defect [17, 18] and showed no effect on plasma Lp(a) concentration [18]. To date no mutations in KIV type 10 have been reported which increase LBS function in Lp(a), but these may be critical for identifying mechanisms of increased CAD risk. A second LBS (II) has been identified in the kringles KIV 5–8, which is important for the assembly of Lp(a) and is accessible only in isolated apo(a) [19]. The aim of this study was to search for mutations in the apo(a) KIV type 10 from patients with CAD which could relate apo(a) structure and function.

Material and methods

Study population

The procedures used complied with the ethical standards of the Hospital Universitari de Sant Joan. Blood samples were obtained from 94 male patients who participated in a previous study [20] and had had one episode of acute myocardial infarction, as defined by the criteria of the World Health Organization [21], before the age of 50 years (range 29–49). They had no history of familial hypercholesterolemia, renal failure, liver disease, hypertension, obesity, or diabetes mellitus. The patients were compared with 94 ostensibly healthy (that is to say, free of any disease, and recruited at their place of work during a routine medical examination) male controls living in the same geographic area and with a similar age (± 4 years), body mass index (± 1.1), and ethnic background (Mediterranean whites).

Fig. 1A–C Schematic representation of the human apolipoprotein(a) gene. **A** Protein domains of apo(a); S signal peptide; K kringles; P protease domain. **B** Schematic drawing of the KIV type 10 DNA sequence and localization of the primers used. **C** Localization of the CA deletion (12656–12657del, white arrowhead) and creation of the *CellII* restriction cutting sites (black arrowheads). **Bold type** P3 primer sequence; *Mu* mutant; *wt* wild type



Quantification of plasma Lp(a) and Apo(a) genotype determination

The concentration of Lp(a) in plasma was determined by immunoturbidimetry using antibodies, calibrators, and standards supplied by Incstar Corporation (Stillwater, Minn., USA) [22]. The specificity of the apo(a) antibodies has been already described, and they recognize equally the different apo(a) size isoforms [23]. The assay is not affected by the presence of apoprotein B, plasminogen, or hyperlipidemia and shows a good correlation with a double monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay used at the Northwest Lipid Research Laboratories [22]. Apo(a) alleles were determined as described elsewhere [4]. Intact DNA was digested with *KpnI* and size-fractionated by pulsed-field gel electrophoresis, blotted to a nylon membrane and hybridized with an [³²P]dCTP radiolabeled human apo(a) KIV-specific single-stranded fragment (MP1; kindly provided by Dr. H. Hobbs, Southwestern Medical Center, Dallas, Tex., USA).

Measurement of LBS activity

The LBS function of Lp(a) was measured with a quantitative LBS-Lp(a) immunoassay as previously described [13]. The assay uses a monoclonal antibody to apo(a) to selectively capture Lp(a), an anti-K IV antibody that reacts only with unoccupied LBS, and a secondary disclosing antibody conjugated to alkaline phosphatase.

Amplification of human apo(a) kringle IV-10 from genomic DNA and detection of mutations and polymorphisms

The following procedures were modifications of previously published methods [24, 25]. Genomic DNA, extracted from the frozen cellular blood component by a salting-out method, was cut with *BamHI* (5 U/μg DNA) at 37°C for 2 h to cleave all kringles other than KIV types 4, 9, and 10. The digested DNA was repurified and dissolved in Tris EDTA buffer to be used for PCR amplification with primers between residues 54 and 59 (Swiss-Prot: APOA HUMAN, P08519) (P2; 5' AGTGGCCTGACAATGAAGT) and between residues 109 and 114 (P1; 5' ACCTTGTTTCAGAAGGAGGCC) which give the PCR1 product (Fig. 1B).

Described polymorphisms at amino acid positions 75 and 81 were revealed by simultaneous digestion of the PCR1 product with *NcoI* and *MnII*, respectively, and the resulting fragments separated by electrophoresis in a 12% polyacrylamide gel and silver stained. We applied single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis to the detection of single base changes at the final product. Although the effect of temperature and the addition of glycerol, formamide, sucrose, or urea were assayed, we found the best results in the patterns of separation using precast gels (12.5% acrylamide with 2% crosslinking), run at 4°C in a GenePhor (Pharmacia). To further confirm a mutation detected by an heteroduplex in the PCR, a distinct SSCP pattern and sequence analysis, we designed a nested PCR using the primers P2 and P3 (P3; 5' GCGACCACAGTCCCTTCTGG) to introduce a restriction site for the enzyme *CelII* in the mutated allele (see Fig. 1B, C). Primers P2 and P3 also recognize an apo(a)-like gene (locus HSU19517, NCBI) that would interfere with the 134-bp product from the apo(a) gene. To avoid this problem the second PCR was prepared with the PCR1 product as template. Additionally, the fragments were directly sequenced after asymmetric PCR in a Perkin Elmer ABI Prism 310 following the indications of the manufacturer.

Other laboratory measurements

Cholesterol and triglycerides were determined enzymatically with the CHOD-PAP and the lipase/GPO/PAP methods, respectively. High-density lipoprotein cholesterol was measured with a recently described homogeneous assay [26].

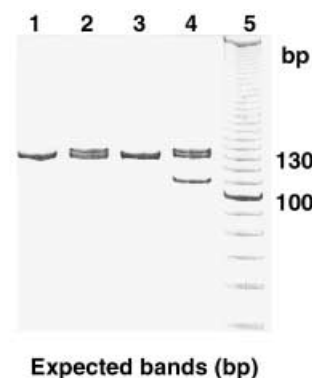
Statistical analysis

The χ^2 statistic was used to determine whether the genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium and to compare distributions of alleles and genotypes in the groups considered. The significance was set at $P < 0.05$, and a Bonferroni correction to the P value was used where necessary. Variables were expressed as mean $\pm$ SD and geometric mean for Lp(a) concentration because tests were performed in the log-transformed variable. Data were initially analyzed by Snedecor's F test for the homogeneity of variances. The mean differences between groups were assessed using paired Student's paired t test or Mann-Whitney's U test following the indications of the F test, analysis of variance was used to compare variables according to the kringle number. The strength of the association of the selected polymorphisms with the occurrence of myocardial infarction was estimated by calculating the odds ratio with Epi-Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga., USA). Linkage disequilibrium between alleles at two different loci was assessed with the Arlequin program (University of Geneva; <http://anthro.unige.ch/arlequin>) [27].

Results

Identification of SSCP polymorphisms and description of a novel mutation

Among the 188 samples screened for mutations in or near the LBS pocket only one showed an abnormal pattern of migration. This particular sample already showed a double band in the electrophoresis gels of the PCR product compatible with the existence of a small deletion in heterozygosis (Fig. 2, lane 2). Therefore the PCR product was sequenced, and a 2-bp deletion (12656–12657del) was detected at amino acid 92 in one allele.



	wt/wt	wt/mut	mut/mut
PCR2	134	134, 132 + heteroduplex	132
CelII	134	134 + 108 + 24 + heteroduplex	108 + 24

Fig. 2 Detection and confirmation of the two nucleotide deletion (12656–12657del). Restriction analysis of the PCR2 product from control (wt/wt) and sample A53 (mut mutated) DNA. The product of the PCR was digested with the restriction enzyme *CelII* following the indications of the manufacturer, separated by electrophoresis on 12% acrylamide gel and silver stained. Lanes 1, 3 wt; lanes 2, 4 mut; lane 5 10–bp ladder

To confirm such deletion a restriction analysis was performed as described in methods (Fig. 2, lane 4). This deletion is located in a dinucleotide repeat and produces a shift in the reading frame that creates a stop codon 63 bp downstream. These results suggest that a truncated protein would be produced from the translated allele. In the search for possibly undetected homozygous subjects we extended the restriction analysis to those individuals (14 patients and 17 controls) who had low plasma Lp(a) concentration (<40 mg/l), and we did not find the homozygous form of such mutation. The carrier of the described mutation had suffered an acute myocardial infarction at the age of 48 years, and clinical recovery was satisfactory.

Table 1 LBS activity and plasma Lp(a) concentration according to the kringle number of the smallest isoform in patients and controls. LBS activity is expressed as mean $\pm$ SD percentage of the reference Lp(a); Lp(a) concentration is expressed as geometric mean $\pm$ SD (mg/l)

	≤ 16	17–19	20–23	≥ 24	<i>P</i>
Patients	(<i>n</i> =35)	(<i>n</i> =22)	(<i>n</i> =20)	(<i>n</i> =17)	
LBS activity	66 $\pm$ 22	59 $\pm$ 19	41 $\pm$ 26	36 $\pm$ 20	0.0001
Lp(a)	289 $\pm$ 34	280 $\pm$ 25	101 $\pm$ 42	87 $\pm$ 32	0.001
Controls	(<i>n</i> =19)	(<i>n</i> =24)	(<i>n</i> =30)	(<i>n</i> =21)	
LBS activity	57 $\pm$ 22	57 $\pm$ 22	42 $\pm$ 26	48 $\pm$ 26	0.09
Lp(a)	166 $\pm$ 29	124 $\pm$ 32	75 $\pm$ 30	101 $\pm$ 32	0.105

Table 2 Genotype and allele frequencies for the M75T mutation at kringle IV-10 of the patients with myocardial infarction and controls (*MM* mutated, *MT* heterozygous the mutation, *TT* homozygous for the mutation)

	Myocardial infarction	Age-matched controls
Genotype		
MM	2 (2.1%)	6 (6.4%)
MT	49 (52.1%)	65 (69.1%)*
TT	43 (45.7%)	23 (24.5%)**
Allele		
M	0.282	0.406
T	0.718	0.594**

*Odds ratio 0.49 (95% CI 0.34–1.08), *odds ratio 2.53 (95% CI 1.31–4.88), ****P*=0.03

Table 3 Relevant plasmatic variables in subjects homozygous for the T allele (*M*⁻) and homozygous or heterozygous for the M allele (*M*⁺) at position 75 according to their condition of patients with myocardial infarction or age matched controls. Results are expressed as mean $\pm$ SD (HDL high-density lipoprotein)

	Age matched controls		Myocardial infarction	
	<i>M</i> ⁺ (<i>n</i> =71)	<i>M</i> ⁻ (<i>n</i> =23)	<i>M</i> ⁺ (<i>n</i> =51)	<i>M</i> ⁻ (<i>n</i> =43)
Cholesterol (mmol/l)	5.51 $\pm$ 0.92	5.36 $\pm$ 0.92	5.79 $\pm$ 0.69	5.72 $\pm$ 0.74
Triglyceride (mmol/l)	1.58 $\pm$ 0.94	1.63 $\pm$ 0.89	2.11 $\pm$ 1.57*	2.09 $\pm$ 1.02
HDL cholesterol (mmol/l)	1.12 $\pm$ 0.25	1.08 $\pm$ 0.26	1.01 $\pm$ 0.26*	1.01 $\pm$ 0.21
Lp(a) (mg/l)	170 $\pm$ 161	208 $\pm$ 158	269 $\pm$ 226**	395 $\pm$ 340***
LBS activity (%)	48 $\pm$ 25	57 $\pm$ 22	55 $\pm$ 25	53 $\pm$ 25

P*=0.04, *P*=0.003, *M*⁺ vs. *M*⁻ between the different groups; ****P*=0.03, *M*⁺ vs. *M*⁻ in the same group

Apo(a) size and differences in LBS activity and plasma Lp(a) concentration

Most individuals (96%) were heterozygous for number of KIV repeats and homozygous were distributed equally between groups. In analyzing the largest isoform of each subject, we found no difference in the distribution between patients and controls (for clarity, data are not shown). However, patients showed an statistically significant lower size for the smallest isoform than matched controls (18.6 $\pm$ 18 vs. 20.4 $\pm$ 20, *P*=0.008). The apo(a) size was divided into quartiles in order to explore its relationship with LBS activity and plasma Lp(a) concentration. There were only significant results for the smallest isoform (Table 1). The lower the kringle number, the higher the LBS activity and plasma Lp(a) concentration were, but this trend was statistically significant only in patients. This was further confirmed with Spearman's rank correlation values for the relationship between the sum of the apo(a) allele sizes and plasma Lp(a) concentration, which was significant in patients (-0.38, *P*<0.0005) but not in controls (-0.12, *P*=0.064).

Frequency of W81R and M75T substitutions

The W81R substitution was not found in our population sample, which suggests that this is infrequent in the Spanish population; all subjects studied were homozygous for W at position 81. The genotype and allele frequencies for the M75T polymorphism at KIV type 10 of the patients with myocardial infarction and controls are shown in Table 2. The distribution of the genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium but differed significantly between patients and controls. The frequency of the T allele was significantly higher in patients than in controls. Significantly fewer patients had the MT genotype than controls, and, conversely, the genotype TT was significantly more prevalent among the patients (Table 2). Homozygosity (TT) conferred a significant risk for myocardial infarction (odds ratio 2.53, 95% confidence interval, 1.31–4.88).

Influence of M75T substitution on relevant variables

The TT genotype conferred risk to myocardial infarction in our sample; therefore subjects were grouped accord-

ing to the M75T genotype, and relevant variables were reassessed. Subjects with the MM or MT genotypes were considered M⁺, and those with the TT genotype M⁻ (Table 3). There were no differences in age or body mass index between the groups considered. The percentage of current or former smokers were significantly higher in patients with myocardial infarction (81%) than in controls (31%), but it was virtually the same between M⁺ and M⁻ individuals. Patients also had a higher enrichment of cholesterol and triglyceride in apoB containing lipoproteins and lower high-density lipoprotein cholesterol than controls, but the difference was significant only in M⁺ subjects. There was no association between LBS activity and the M75T mutation. Patients had a significantly lower number of kringles (smallest isoform) than controls; The M⁻ subjects had also a significantly lower number of kringles than M⁺ subjects, both in controls (18.2±3.9 vs. 21.2±4.9; $P<0.05$) and in patients (17.5±4.3 vs. 19.4±4.8; $P<0.05$). Correspondingly there was a trend toward higher plasma Lp(a) concentration in M⁻ individuals, but this was significant only in patients (Table 3). This result could be due to a possible linkage disequilibrium between the M75T mutation and the apo(a) size, as previously described [18], but this is not confirmed in our sample.

Discussion

The KIV type 10 of apo(a) is the primary LBS of Lp(a). Transgenic mice with apo(a) mutations of KIV type 10 which have low LBS activity have reduced lesion [12]. The LBS activity is thought to mediate the pathogenic risk of Lp(a) by interfering with plasminogen binding or binding to cells and proteins by the LBS function which is unavailable to low-density lipoprotein. The purpose of this study was to search for mutations in the apo(a) KIV type 10 which could alter the LBS activity of Lp(a) from patients with coronary artery disease. We used SSCP and sequence analysis in the search for base changes at the DNA region coding for the tail end of KIV type 10 of human apo(a), and we found this region mutable but relatively well preserved. We have also found a novel mutation which consisted in a 2-bp deletion that presumably creates a truncated protein. The carrier of this mutation had undetectable levels of plasma Lp(a) and a low LBS activity. Although the mechanism underlying the pathogenic role of Lp(a) in CAD is not fully understood, this combination is considered to be either beneficial or protective. This individual, however, was a survivor of a myocardial infarction with multiple angiographically confirmed lesions in two major coronary arteries. A considerable number of subjects showed phenotypically low LBS activity and low plasma Lp(a) concentration, and the distribution was virtually the same between patients and controls (14 and 17, respectively). Therefore the presence of either low plasma LBS activity or Lp(a) concentration does not indicate protection against the presence of the early-onset disease in our sample population.

However, it is well known that Lp(a) is a risk factor primarily when interacting with other lipoprotein as well as non-lipoprotein-related risk factors [28].

The W81R substitution, which has been identified in 2% of a Chicago population, was not found in this sample or in 150 additional samples tested (data not shown), which suggests that this mutation, if present, is infrequent in the Spanish population. Furthermore, the two previously described subjects [15] were LBS defective and had a plasma Lp(a) concentration less than 10 mg/l and a single apo(a) allele of 120 kb, suggesting that this mutation can affect a major function of Lp(a). However, in our population sample we found seven subjects (four patients and three controls) with absent LBS activity and plasma Lp(a) levels less than 10 mg/l who do not bear such mutation. Therefore there is a considerable heterogeneity with respect to the LBS properties of Lp(a) which in some cases is extreme, and binding is not detected in vitro.

Another described mutation, the M75T substitution, was frequent in our population. Previous studies have determined the frequency of the M75T substitution in diverse populations [15, 18, 29, 30], and certain ethnic variation is evident. In our study the allele frequency differed significantly between patients and controls, and the genotype TT conferred a significant risk for myocardial infarction. This cannot be confirmed in whites [29], but it has been observed in Afro-Caribbeans [30]. All subjects included in the study population were unrelated whites and were born in an area that has the lowest incidence of myocardial infarction in the western world [31]. Although we recognize the limitations of association studies, these results may suggest the possibility of ethnic variation respect to the M75T substitution and that the presence of the mutation could be in linkage disequilibrium with other genetic risk factor [32] which in our sample is unrelated to the number of KIV repeats.

The putative mechanism is not related to the LBS activity because this study reveals comparable LBS activity in the M⁺ and M⁻ subjects. However, we observed that M⁻ patients possess significantly higher values of plasma Lp(a). A linkage disequilibrium between the M75T mutation and a *KpnI* allele corresponding to 18 kringles [18] has been described, but was not confirmed in our study. The difference in LBS activity is highly dependent on the number of kringles rather than on the presence or absence of the M75T substitution.

Survivors of myocardial infarction in the Spanish population are more frequently those subjects who are homozygotes for T, with high plasma Lp(a) levels, low number of kringles at the smallest isoform, and higher LBS activity. Further studies are needed to ascertain the possible relationships between these variables.

Acknowledgements This study was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 95/0162), the National Institutes of Health Grant HL 18577, and the American Heart Association, Ohio Valley Affiliate. C.V. is a predoctoral fellow financed by the Comissionat per a Universitats i Recerca (Generalitat de Catalunya).

References

- Kronenberg F, Steinmetz A, Kostner GM, Dieplinger H (1996) Lipoprotein(a) in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33:495–543
- Scanu AM, Edelstein C (1995) Kringle-dependent structural and functional polymorphism of apolipoprotein(a). *Biochim Biophys Acta* 1256:1–12
- Frank SL, Klisak I, Sparkes RS, Mohandas T, Tomlinson JE, McLean JW, Lawn RM, Lusis AJ (1988) The apolipoprotein(a) gene resides in human chromosome 6q26–27, in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Hum Genet* 79:352–356
- Lackner C, Boerwinkle E, Leffert C, Rahmig T, Hobbs H (1991) Molecular basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 87:2077–2086
- Utermann G (1989) The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 246:904–910
- Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba C, Kemmler HG, Seitz C (1987) Lp(a) glycoprotein phenotypes: inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 80:458–465
- Plow E, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow J (1995) The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J* 9:939–945
- Snyder ML, Polacek D, Scanu AM, Fless GM (1992) Comparative binding and degradation of lipoprotein(a) and low density lipoprotein by human monocyte derived macrophages. *J Biol Chem* 267:339–346
- Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Baynham P, Sebald MT, Skocir P, Curtiss LK, Levin E, Hoover-Plow J, Plow EF (1995) Interaction of Lp(a) with plasminogen binding sites on cells. *Thromb Haemostasis* 73:458–465
- Miles LA, Sebald MT, Fless GM, Scanu AM, Curtiss LK, Levin E, Plow EF, Hoover-Plow J (1998) Interaction of lipoprotein(a) with the extracellular matrix. *Fibrinolysis Proteolysis* 12:79–87
- Rouy D, Koschinsky ML, Fleury V, Chapman J, Anglés-Cano E (1992) The binding of human recombinant apolipoprotein(a) and plasminogen to fibrin surfaces. *Biochemistry* 31:6333–6339
- Boonmark NW, Lou XJ, Yang ZJ, Schwartz K, Zhang JL, Rubin EM, Lawn RM (1997) Modification of apolipoprotein(a) lysine binding site reduces atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest* 100:558–564
- Hoover-Plow JL, Boonmark N, Skocir P, Lawn R, Plow EF (1996) A quantitative immunoassay for the lysine-binding function of Lipoprotein(a). Application to recombinant apo(a) and lipoprotein(a) in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:656–664
- Scanu AM, Miles LA, Fless GM, Pfaffinger D, Eisenbart J, Jackson E, Hoover-Plow JL, Brunck T, Plow EF (1993) Rhesus monkey lipoprotein(a) binds to lysine sepharose and U937 monocytoid cells less efficiently than human lipoprotein(a). Evidence for the dominant role of kringle 4 (37). *J Clin Invest* 91:283–291
- Scanu AM, Pfaffinger D, Lee JC, Hinman J (1994) A single point mutation (Trp72 Arg) in human apo(a) kringle 4–37 associated with a lysine binding defect in Lp(a). *Biochim Biophys Acta* 1227:41–45
- Chenivresse X, Huby T, Wickins J, Chapman J, Thillet J (1998) Molecular cloning of the cDNA encoding the carboxy-terminal domain of chimpanzee apolipoprotein(a): an Asp577Asn mutation in kringle IV-10 is associated with poor fibrin binding. *Biochemistry* 37:7213–7223
- van der Hoek YY, Vittehoek ME, Beisiegel U, Kastelein JJP, Koshinski ML (1993) The apolipoprotein(a) kringle IV repeats which differ from the major repeats kringle are present in variably-sized isoforms. *Hum Mol Genet* 2:361–366
- Kraft HG, Haibach C, Lingenhel A, Brunner C, Trommendorff M, Kronenberg F, Muller HJ, Utermann G (1995) Sequence polymorphism in kringle IV 37 in linkage disequilibrium with the apolipoprotein(a) size polymorphism. *Hum Genet* 95:275–282
- Ernst A, Helmhold M, Brunner C, Pethö-Schramm A, Armstrong VW, Müller HJ (1995) Identification of two functionally distinct lysine-binding sites in kringle 37 and in kringle 32–36 of human apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 270:6227–6234
- Joven J, Simó JM, Vilella E, Camps J, Masana L, de Febrer G, Camprubí M, Richart C, Bardají A, Casao E, Pocovi M, Civeira F (1998) Lipoprotein(a) and the significance of the association between platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and the risk of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis* 140:155–159
- Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature (1979) Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. *Circulation* 59:607–630
- Levine DM, Sloan BJ, Donner JE, Lorenz JD, Heinzerling RH (1992) Automated measurement of lipoprotein(a) by immunoturbidimetric analysis. *Int J Clin Lab Res* 22:173–178
- Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J, Nava ML, Patsch W, Morrisett JD (1990) Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 31:603–613
- Pfaffinger D, McLean J, Scanu AM (1993) Amplification of human apo(a) kringle IV-37 from blood lymphocyte DNA. *Biochim Biophys Acta* 1225:107–109
- Glavac D, Dean M (1993) Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 2:404–414
- Simó JM, Castellano I, Ferré N, Joven J, Camps J (1998) Evaluation of a homogeneous assay for high density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal and hepatic disorders. *Clin Chem* 44:1233–1241
- Slatkin M, Excoffier L (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity* 76:377–383
- Hopkins PN, Hunt SC, Schreiner PJ, Eckfeldt JH, Borecki IB, Ellison CR, Williams RR, Siegmund KD (1998) Lipoprotein(a) interactions with lipid and non-lipid risk factors in patients with early onset coronary artery disease. Results from the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 141:333–345
- Prins J, van der Hoek YY, Biesheuvel TH, Leus FR, van Rijn HJ, Kastelein J (1998) The functional and clinical significance of the Met to Thr substitution in kringle IV type 10 of apolipoprotein(a). *Thromb Res* 90:125–130
- Syrris P, Schwartzman R, Jeffery S, Kaski JC, Carter N (1997) Polymorphism in apolipoprotein(a) kringle IV 37 (Met/Thr): frequency in a London population and its association with coronary artery disease. *Clin Cardiol* 20:870–872
- Tunstall H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A (1994) Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA project. *Circulation* 90:583–612
- Cohen JC, Chiesa G, Hobbs HH (1993) Sequence polymorphisms in the apolipoprotein(a) gene. Evidence for dissociation between apolipoprotein(a) size and plasma lipoprotein(a) levels. *J Clin Invest* 91:1630–1636

Instability of Lipoprotein(a) in Plasma Stored at -70°C : Effects of Concentration, Apolipoprotein(a) Genotype, and Donor Cardiovascular Disease

JOSEP M. SIMÓ, JORDI CAMPS, ELISABET VILELLA, FEDERICO GÓMEZ, ANTONIO PAUL, and JORGE JOVEN*

Background: There is considerable evidence to suggest that plasma lipoprotein(a) [Lp(a)] concentration is a cardiovascular risk factor. Confusing results in epidemiologic studies, however, suggest that the effects of storage should be further investigated. The influence of the assay method, the initial plasma Lp(a) concentration, and the apolipoprotein(a) [apo(a)] genotype are all factors that should be considered.

Methods: Blood was obtained from 65 survivors of premature myocardial infarction and 95 age-matched controls. The plasma samples were stored in sterile conditions at -70°C for 5 years in the presence of antioxidant and antiproteolytic substances. Plasma Lp(a) was measured by immunoturbidimetry, and apo(a) alleles were determined by pulsed-field gel electrophoresis and Southern blotting.

Results: Plasma Lp(a) was significantly higher in patients. The mean kringle number for the smallest isoform was also lower in patients than in controls, but no differences were found in the distribution of the largest isoform. All patients and controls were heterozygotes. During storage, mean Lp(a) decreased significantly in samples from patients (-23% ; $P < 0.001$) but not in samples from controls (-9% ; P , not significant). This was not related to the kringle number and was limited to samples with initial plasma Lp(a) concentrations between 41 and 345 mg/L.

Conclusions: Plasma Lp(a) from patients is less stable than Lp(a) from controls, and the difference is not related to distribution of apo(a) genotypes but may be

concentration-dependent. Differential sample stability may complicate the interpretation of several studies.

© 2001 American Association for Clinical Chemistry

The lipid composition of lipoprotein(a) [Lp(a)]¹ is similar to that of LDL, but the protein moiety consists of apolipoprotein B covalently linked to the highly polymorphic glycoprotein apolipoprotein(a) [apo(a)] (1). The plasma Lp(a) concentration may vary as much as 1000-fold among study participants. In addition, apo(a) has a striking homology to plasminogen and is known to have important physiologic interactions with the coagulation and fibrinolytic systems (2, 3). Consequently, it has been postulated that this particle is a potential bridge between the fields of atherosclerosis and thrombosis (4).

The role of apo(a) as potential bridge between atherosclerosis and thrombosis has been partially supported by several prospective studies (5–9), and increased plasma Lp(a) has been shown to be associated with an increased prevalence and severity of atherosclerotic vascular disease [for a review, see Ref. (10)]. Discrepant views, however, have appeared in the literature (11, 12). These views have caused considerable concern and suggest that further studies are required to clarify this question and to explore the reasons for the discrepancies. The effect of long-term storage on the measurement of plasma Lp(a) concentration is of major concern because most studies are performed with samples that have been stored at different temperatures for different periods of time. However, data in the literature are scarce and somewhat confusing (12–17). Only one of these studies (17) deals with possible apo(a) phenotype-specific changes in Lp(a)

Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, C/Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain.

*Author for correspondence. Fax 34-977-312569; e-mail jjovent@grupsgs.com. Received April 4, 2001; accepted June 21, 2001.

¹ Nonstandard abbreviations: Lp(a), lipoprotein(a); apo(a), apolipoprotein(a); and KIV, kringle IV.

concentration, and none of them investigates the stability of Lp(a) measurements in relation to the apo(a) genotype.

Our aim was to investigate the decrease in Lp(a) values in samples from controls and patients with established cardiovascular disease that had been frozen for 5 years and to analyze the relationship between such decrease and the number of kringle IV (KIV) repeats in the smallest and largest isoforms.

Materials and Methods

STUDY POPULATION AND QUANTIFICATION OF PLASMA Lp(a)

The procedures used in this study complied with the ethics standards of the Hospital Universitari de Sant Joan. As in a previous study (18), we reviewed the medical records of 1254 patients who had experienced a myocardial infarction between 1991 and 1995; we subsequently contacted, and invited to participate, all those male patients under the age of 50 (age at the onset of myocardial infarction, not current age) whose history matched the WHO definition (19) and who had no history of familial hypercholesterolemia, renal failure, or liver disease.

In a previous experiment, we found that the expected loss of Lp(a) immunoreactivity in fresh samples ($n = 20$) that were assayed and then frozen for 1 month at -70°C and reassayed was not significant and that both measurements correlated well ($r = 0.99$; 187 ± 162 vs 186 ± 171 mg/L). Therefore, to avoid interassay variation, we decided not to use fresh samples and to store samples for a maximum of 1 month to assay them in the same batch. During this period, 65 patients and 95 controls with no clinical evidence of coronary disease and who were of similar ages (± 4 years) and body mass index (± 1.3) were recruited. EDTA blood was collected and centrifuged for 10 min at 4°C and 2000g. The plasma was separated, and two aliquots were stored at -70°C . The plasma Lp(a) concentration was then measured twice: (a) after 1–25 days of storage and (b) after 1990–2014 days, ~ 5 years. Each aliquot was stored in the presence of a mixture containing an antibiotic, antioxidants, and antiproteolytics (final concentrations: gentamicin, 90 g/L; NaN_3 , 0.2 g/L, butylated hydroxytoluene, 45 $\mu\text{mol/L}$; aprotinin, 2 mg/L; and phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mmol/L). Plasma Lp(a) was measured by immunoturbidimetry in a Cobas instrument (Roche) using antibodies and calibrators supplied by Incstar Corporation (20) in the same batch; intraassay CVs were 4.6%, 2.4%, and 8.2% for pooled plasma with mean Lp(a) concentrations of 85, 207, and 825 mg/L, respectively. None of the stored specimens had been thawed before analysis. Plasma was thawed at room temperature and assayed in a time frame of 3 h. The specificity of the apo(a) antibodies and their ability to recognize equally the different apo(a) size isoforms have been described (20). The assay is not affected by the presence of apoprotein B, plasminogen, or hyperlipidemia and shows a good correlation with a double monoclonal ELISA assay used at the Northwest Lipid Research Lab-

oratories (21). As certified by the manufacturer, the source, affinity, and other relevant characteristics of the antibody did not change during the observation time. In addition, the control and calibrator materials supplied with the reagent set behaved consistently throughout the 5 years with no relevant changes in the absorbance readings.

The plasma cholesterol and triglyceride concentrations and cholesterol in the HDL were measured as described (22).

APO(A) GENOTYPE DETERMINATION

apo(a) alleles were determined by a modification of the procedure described by Lackner et al. (23). Leukocytes were isolated from whole blood, suspended to a final cell concentration of 2×10^{10} cells/L, and embedded in low-melting temperature agarose plugs. The separation was performed in a Gene NavigatorTM apparatus (Pharmacia) with alternating 4-s pulses at 190 mA for 30 min, followed by 10-s pulses at 170 mA for 18 h and 6-s pulses at 170 mA for 6 h. Premade plugs containing lambda phage concatamers (Pharmacia) were used as size calibrators, and several samples were used as internal standards to assure accurate measurement of migration in different gels. The size-fractionated DNA was blotted to a nylon membrane and hybridized with an [^{32}P]dCTP-radiolabeled human apo(a) KIV-specific single-stranded fragment (MP1) (23), kindly provided by Dr. Helen Hobbs (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX). The apo(a) alleles were designated by the estimated number of KIV-encoding sequences per allele. A single KIV repeat was considered to be 5.5 kb in length.

STATISTICAL ANALYSIS

Values are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistically significant differences were set at $P < 0.05$. For statistical assessment, the plasma Lp(a) concentrations were log-

Table 1. Characteristics of the study population.^a

Variable	Patients (n = 65)	Controls (n = 95)	P
Age, years	40.1 $\pm$ 9.2	42.4 $\pm$ 7.6	NS ^b
Body mass index, kg/m ²	27.1 $\pm$ 2.4	26.9 $\pm$ 2.9	NS
Kringle number, ^c smallest isoform	18.3 $\pm$ 4.5	20.5 $\pm$ 4.7	0.008
Kringle number, ^c largest isoform	24.5 $\pm$ 4.4	26.2 $\pm$ 5.1	NS
Current or former smokers, %	76.9	37.9	0.0001
Hypertension, %	12.3	2.1	0.0001
Type II diabetes mellitus, %	3.1	1.0	NS
Plasma cholesterol, mmol/L	6.02 $\pm$ 0.85	5.78 $\pm$ 0.82	0.04
Plasma triglycerides, mmol/L	2.64 $\pm$ 1.5	1.25 $\pm$ 0.92	0.001
HDL-cholesterol, mmol/L	0.95 $\pm$ 0.23	1.24 $\pm$ 0.12	0.0005

^a Results are expressed as mean $\pm$ SD.

^b NS, not significant.

^c All participants had two apo(a) alleles that contained different numbers of KIV repeats; the mean number is indicated.

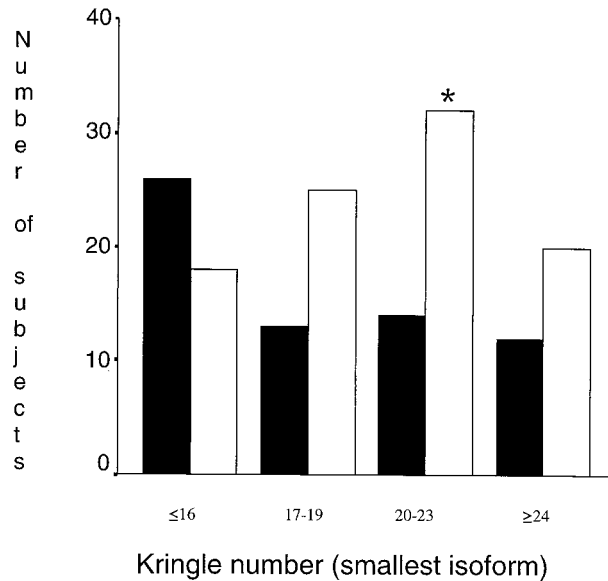


Fig. 1. Relative distribution of the smallest isoforms in the participants (n = 160) divided into quartiles according to the number of KIV repeats.

■, patients; □, controls. *, $P < 0.05$.

transformed because they did not follow a gaussian distribution (as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test). To evaluate the changes between the first and second measurements, we used the paired Wilcoxon test. The association between variables was measured by linear regression analysis and Spearman rank correlation. The χ^2 test was used to compare frequencies. Participants were divided into quartiles according to the number of KIV repeats in the smallest and largest isoforms, or to the plasma Lp(a) concentration. The Kruskal-Wallis ANOVA by ranks was used to investigate the possible decrease in Lp(a) values among individuals of the different groups considered. The analyses were performed with SPSS-PC (SPSS Inc.).

Results

Patients were young and nonobese, but some conventional risk factors were present. Proportionally more

Table 2. Plasma Lp(a) in survivors of myocardial infarction and controls before and after storage for 5 years at -70°C .

	Lp(a), ^a mg/L		
	Patients (n = 65)	Controls (n = 95)	All (n = 160)
First measurement at baseline	302 ± 280 ^{b,c} (275)	177 ± 153 (144)	228 ± 222 ^d (163)
Second measurement 5 years later	231 ± 210 ^b (178)	162 ± 139 (113)	190 ± 174 (126)

^a Results are expressed as mean ± SD (median).

^b Significantly different from values obtained in controls: $P < 0.01$.

^{c,d} Significantly different from values obtained in the second measurement:

^c $P < 0.001$; ^d $P < 0.05$.

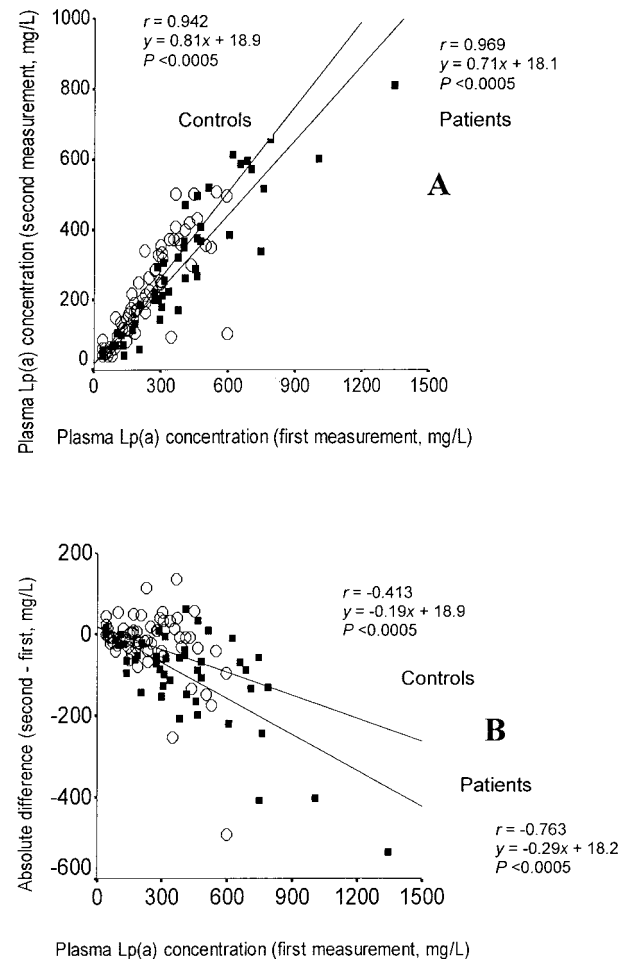


Fig. 2. Regression (A) between first and second measurements and bias plot (B) comparing the initial measurement and the difference between both measurements in patients (■) and controls (○).

patients than controls smoked or had hypertension. There were also two patients and one control with type II diabetes mellitus (Table 1). Sixty patients were receiving low-dose aspirin, 25 were receiving hypolipidemic agents, and 3 were receiving β -blockers. Most patients stated that they had substantially changed some life-style factors. They had decreased the total caloric intake, and on medical advice, cholesterol-rich foods had been substituted with fish, vegetables, and fruits. Most patients also stated that they had reduced the consumption of coffee and alcohol and increased physical exercise. Patients showed higher plasma triglyceride and cholesterol concentrations and a lower HDL-cholesterol concentration than age-matched controls.

In the whole group, we found a total of 28 apo(a) size alleles with KIV repeats numbers of 12–38. There were no homozygous individuals: they all had two apo(a) alleles that contained different numbers of KIV repeats. The mean kringle number of the largest isoform was the same between groups (Table 1), but for the smallest isoform, it

Table 3. Percentage of change in plasma Lp(a) concentration between first and second measurement in each quartile of the kringle number of the smallest and largest isoforms.

	Kringle number (smallest isoform)				P (ANOVA)
	≤16	17-19	20-23	≥24	
Patients					
n	26	13	14	12	
Mean ± SD, %	-12.6 ± 16.7	-26.8 ± 17.3	-14.7 ± 20.2	-14.5 ± 31.3	0.240
95% confidence interval, %	(-19.3 to -5.8)	(-37.3 to -16.4)	(-26.4 to -3.1)	(-34.4 to 5.3)	
Controls					
n	18	25	32	20	
Mean ± SD, %	-1.5 ± 19.9	-11.7 ± 25.9	2.1 ± 27.6	-1.1 ± 17.7	0.187
95% confidence interval, %	(-11.4 to 8.4)	(-22.4 to -1.0)	(-7.9 to 11.9)	(-9.4 to 7.1)	
	Kringle number (largest isoform)				
	≤22	23-25	26-29	≥30	
Patients					
n	18	22	18	7	
Mean ± SD, %	-16.9 ± 18.3	-22.4 ± 21.9	-6.4 ± 18.9	-20.6 ± 25.6	0.106
95% confidence interval, %	(-26.0 to -7.8)	(-32.1 to -12.6)	(-15.8 to 3.1)	(-44.3 to 3.1)	
Controls					
n	22	26	20	27	
Mean ± SD, %	-2.7 ± 19.5	1.2 ± 31.2	-2.9 ± 14.9	-7.1 ± 26.1	0.675
95% confidence interval, %	(-11.3 to 5.9)	(-11.4 to 13.8)	(-9.9 to 4.1)	(-17.4 to 3.2)	

was lower in patients. The largest isoform (of each participant) was equally distributed in the two groups (data not shown), but there were some differences in the distribution of the smallest isoform (Fig. 1). Patients were relatively more frequent in the group with a kringle number ≤16 and less frequent in the group of those with ≥20. Plasma Lp(a) was also significantly higher in patients (Table 2). There was an inverse relationship between the size of the apo(a) alleles and the plasma concentration of Lp(a) that was significant in patients ($r = -0.421$; $P < 0.005$) but not in controls ($r = -0.112$; $P > 0.05$). The plasma Lp(a) concentration in samples ($n = 160$) stored for 5 years at -70°C decreased by 17%, which was significant ($P < 0.05$). In patients, these values decreased more evidently (-23% ; $P < 0.001$) than in controls (-9%), in whom the difference did not reach statistical significance (Table 2). There was a strong positive correlation between the first and the second measurements (Fig. 2A). Linear regression analysis for the combined control and patient values, excluding the two aberrant Lp(a) values for control samples and including the measurements of <600 mg/L, gave a nearly perfect correlation ($r = 0.989$; $P < 0.0005$). Patients clearly showed a larger decrease in plasma Lp(a) values between first and second measurements compared with controls. This was even more evident when we plotted the initial measurement vs the absolute difference between both measurements (Fig. 2B). This excess loss of reactivity or decreased Lp(a) was not related to the kringle number of either the smallest or largest isoforms. Samples from patients showed a uniform loss of reactivity of Lp(a) during storage regardless of genotype, and this was considerably

higher than in controls (Table 3). Correspondingly, the changes in Lp(a) over time did not correlate with the number of KIV repeats ($r = 0.09$; P , not significant).

The difference between patients and controls was also evident when we compared the mean relative percentage of Lp(a) difference between the two measurements in participants divided into quartiles according to the initial plasma Lp(a) concentration (Table 4). There was no appreciable change over time in participants with plasma Lp(a) <41 mg/L ($n = 54$), who were 34% of the sample. As the initial plasma Lp(a) concentration increased in patients, the relative Lp(a) decrease over time became smaller ($P < 0.05$). This trend, however, was not significant in controls. Table 4 also shows that Lp(a) decreased to a greater extent only in those patients whose initial plasma Lp(a) concentration was between 41 and 345 mg/L. When plasma Lp(a) was either <41 mg/L or >345 mg/L, the decrease of Lp(a) in patients and controls was similar.

Discussion

It is common practice in clinical and epidemiologic studies to store one or more aliquots of plasma from participants. Samples are usually stored for years and at -70°C or lower. This approach, although used extensively, is not valid when the long-term stability during storage of the component to be measured has not been determined. It is generally assumed, however, that any deterioration affects all of the specimens to the same extent.

Our results indicate that this is not the case for plasma Lp(a) concentrations in patients with established cardiovascular disease. A significant decrease in Lp(a) values

Table 4. Percentage of change in plasma Lp(a) concentration between first and second measurements in each quartile of initial plasma Lp(a) concentration.

	Initial plasma Lp(a) concentration, mg/L			
	≤40	41–163	164–345	≥346
Patients				
n	21	6	14	24
Mean ± SD, %	1.4 ± 6.5	−40.1 ± 38.5	−35.7 ± 40.2	−28.1 ± 30.2
95% confidence interval, %	(−1.3 to 4.0)	(−120.5 to 23.4)	(−89.5 to −18.2)	(−42.3 to −13.6)
Controls				
n	33	20	26	16
Mean ± SD, %	2.7 ± 11.0	−13.5 ± 23.4	−5.1 ± 22.2	−22.9 ± 60.7
95% confidence interval, %	(−1.4 to 6.6)	(−104.2 to 41.2)	(−13.9 to 3.8)	(−66.1 to 12.7)
P	0.485	0.043	0.0038	0.532

was detected in stored samples, but this was more evident in patients than in controls. Not all patient samples and only some control samples showed decreased Lp(a) values after prolonged storage. However, after 5 years of storage, the difference in plasma Lp(a) concentration between patients and controls was still significant. If we assume that Lp(a) values decrease proportionally over time, this difference would disappear in a few more years. The change in measured Lp(a) was not related to the number of KIV repeats in the largest or smallest isoforms. This was unexpected and contradicted previously reported findings, although the participants were quite different in this study and sample storage time was for 5 years compared with 25 months (17). It is well known that there is an inverse correlation between the number of KIV repeats of apo(a) and plasma Lp(a) concentrations (23, 24). Likewise, it is also well known that low-molecular weight apo(a) isoforms with their associated high plasma Lp(a) concentrations are found more frequently among patients with established cardiovascular disease than in healthy controls (25). Our sample further confirmed these two facts (see Fig. 1 and Tables 1 and 2), but their lack of relationship with a decrease in plasma Lp(a) was evident (Table 3).

It is also possible that the higher the Lp(a) concentration, the higher will be the decrease in Lp(a) values or loss of Lp(a) immunoreactivity over time. This was true in terms of the absolute difference between the initial and the final measurement. Again, the samples from patients and controls behaved differently. Both measurements were significantly and negatively correlated in both patients and controls, but the correlation in controls was not significant if the two outlier values observed in Fig. 2B were excluded. When samples were divided into quartiles according to the initial plasma Lp(a) concentration, we found that the relative changes were also different in both groups. If plasma Lp(a) was either very low or very high, patients and controls behaved similarly, but the patients with median values showed a larger decrease in Lp(a) values than controls with similar initial Lp(a) values (Table 4). However, we recognize that there is no logical reason that this effect did not also occur for the highest

and lowest quartiles of the Lp(a) concentration range, and it deserves further confirmation.

During the follow-up, the reagents and the control and calibrator materials behaved consistently, which made it unlikely that the discrepancy could be attributable to an artifact of the assay method. Moreover, Lp(a) measured in samples stored for 5 years correlated significantly ($P < 0.0005$) with the initial values (Fig. 2A) in both patients and controls.

Storage conditions were the same for both groups but deserve further discussion. Inappropriate storage of samples may lead to the appearance of fragments that can be detected in immunoblots of reduced 4% polyacrylamide SDS gels. It is also likely to be responsible for high-molecular weight aggregates (26, 27). We did not perform electrophoretic studies to determine whether this is so, but we consider that a significant effect in our case is unlikely because samples were stored in sterile conditions in the presence of antioxidants and proteolytic inhibitors. Although there are no standardized methods for storing samples containing Lp(a), the addition of cryopreservatives should be considered. The immunochemical properties of Lp(a) are preserved at -20°C for at least 1 year in the presence of 500 mL/L glycerol (28). More recently (29), it has been reported that Lp(a) and apo(a) can be stored for 3 years in trehalose at -80°C without aggregation or degradation.

We therefore conclude that an unknown factor unrelated to either the number of KIV repeats or to the plasma Lp(a) concentration causes a higher loss of immunoreactivity in samples from patients than in samples from controls. This factor may be related to the difference in the lipoprotein composition of the plasma; patients have higher plasma cholesterol and triglyceride concentrations and consequently a different lipid-to-apoprotein ratio (22). Moreover, other factors associated with plaque formation and the progress of atherosclerosis may possibly change the immunoreactivity of the Lp(a) particle. Our findings may help to explain the failure of some epidemiologic studies that attempted to identify Lp(a) as a risk factor for cardiovascular disease. At the same time, it may strengthen the positive results. Whatever the cause of the

decrease in Lp(a) values, if the differences in plasma Lp(a) concentration are still significant after many years of storage, we may conclude that the initial differences were extremely high.

This study was partially supported by the Fondo de Investigación Sanitaria.

References

1. Utermann G. The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 1989;246:904–10.
2. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang W-J, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;330:132–7.
3. Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989;339:301–3.
4. Scanu AM. Lipoprotein(a): a potential bridge between the fields of atherosclerosis and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:1045–7.
5. Rosengren A, Wilhelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Wedel H. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. *BMJ* 1990;301:1248–51.
6. Cressman MD, Heyka RJ, Paganini EP, O'Neil J, Skibinski CI, Hoff HF. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Circulation* 1992;86:475–82.
7. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Davis CE, et al. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *JAMA* 1994;271:999–1003.
8. Bostom AG, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PWF, Jenner JL, Ordovas JM, et al. A prospective investigation of increased lipoprotein(a) detected by electrophoresis and cardiovascular disease in women: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1994;90:1688–95.
9. Assman G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and increased lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996;77:1179–84.
10. Kronenberg F, Steinmetz A, Kostner GM, Dieplinger H. Lipoprotein(a) in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:495–543.
11. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 1993;270:2195–9.
12. Jauhiainen M, Koskinen P, Ehnholm C, Frick MH, Mänttari M, Manninen V, Huttunen JK. Lipoprotein(a) and coronary heart disease risk: a nested case-control study of the Helsinki Heart Study participants. *Atherosclerosis* 1991;89:59–67.
13. Craig WY, Poulin SE, Forster NR, Neveux LM, Wald NJ, Ledue TB. Effect of sample storage on the assay of lipoprotein(a) by commercially available radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Clin Chem* 1992;38:550–3.
14. Kronenberg F, Lobentanz EM, König P, Utermann G, Dieplinger H. Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein(a), apolipoprotein B and A-IV, total and high density lipoprotein cholesterol and triglycerides. *J Lipid Res* 1994;35:1318–28.
15. Usher DC, Swanson C, Rader DJ, Kramer J, Brewer HB. Comparison of Lp(a) levels in fresh and frozen plasma using ELISAs with either anti-apo(a) or anti-apo B reporting antibodies. *Chem Phys Lipids* 1994;67:243–8.
16. Desmarais RL, Sarembock IJ, Ayers CR, Vernon SM, Powers ER, Gimble LW. Increased serum Lp(a) is a risk factor for clinical recurrence after coronary balloon angioplasty. *Circulation* 1995;91:1403–9.
17. Kronenberg F, Trenkwalder E, Dieplinger H, Utermann G. Lipoprotein(a) in stored plasma samples and the ravages of time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1568–72.
18. Joven J, Simó JM, Vilella E, Camps J, Masana L, de Febrer G, et al. Lipoprotein(a) and the significance of the association between platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and the risk of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998;140:155–9.
19. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation* 1979;59:607–30.
20. Levine DM, Sloan BJ, Donner JE, Lorenz JD, Heinzerling RH. Automated measurement of lipoprotein(a) by immunoturbidimetric analysis. *Int J Clin Lab Res* 1992;22:173–8.
21. Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J, Nava ML, Patsch W, Morrisett JD. Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 1990;31:603–13.
22. Simó JM, Castellano I, Ferré N, Joven J, Camps J. Evaluation of a homogeneous assay for high density lipoprotein cholesterol: limitations in patients with cardiovascular, renal and hepatic disorders. *Clin Chem* 1998;44:1233–41.
23. Lackner C, Boerwinkle E, Leffert C, Rahmig T, Hobbs H. Molecular basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1991;87:2077–86.
24. Kraft HG, Köchl S, Menzel HJ, Sandholzer C, Utermann G. The apolipoprotein(a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Genet* 1992;90:220–30.
25. Sandholzer C, Saha N, Kark JD, Rees A, Jaross W, Dieplinger H, et al. Apo(a) isoforms predict risk for coronary heart disease: a study in six populations. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1214–26.
26. Klezovitch O, Edelstein C, Zhu L, Scanu AM. Apolipoprotein(a) binds via its C-terminal domain to the protein core of the proteoglycan decorin. Implications for the retention of lipoprotein(a) in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 1998;273:23856–65.
27. Edelstein C, Italia JI, Scanu AM. Polymorphonuclear cells isolated from human peripheral blood cleave lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) at multiple interkringle sites via the enzyme elastase: generation of mini Lp(a) particles and apo(a) fragments. *J Biol Chem* 1997;272:11079–87.
28. Kostner GM, Ibovnik A, Holzer H, Grillhofer H. Preparation of a stable fresh frozen primary lipoprotein(a) (Lp[a]) standard. *J Lipid Res* 1999;40:2255–63.
29. Edelstein C, Hinman J, Marcovina S, Scanu AM. Properties of human free apolipoprotein(a) and lipoprotein(a) after either freezing or lyophilization in the presence or absence of cryopreservatives. *Anal Biochem* 2001;288:201–8.

CONCLUSIONS GLOBALS

Les conclusions del treball que es presenta són

- Els pacients amb infart de miocardi prematur presenten concentracions plasmàtiques de Lp(a) més elevades que els controls
- Mentre que no es troben diferències significatives en la mida de l'al·lel gran de l'apo(a) entre pacients i controls, la mida de l'al·lel petit dels pacients és significativament més petita que la dels controls, amb predomini d'al·lells de menys de 22 *kringles*
- Es troba una relació inversa significativa entre la mida del gen i la concentració de Lp(a). Quan es separen els al·lells de cada individu segons la seva mida, aquesta relació tant sols és manté en l'al·lel petit.
- Les isoformes petites dels pacients s'associen amb concentracions plasmàtiques de Lp(a) més elevades i amb una major activitat LBS que la dels controls.
- La concentració de Lp(a) i la mida de l'apo (a) són factors de risc independent de patir una malaltia cardiovascular, no així la funció LBS. La funció LBS esdevé un factor de risc quan s'associa a concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a) o a al·lells petis amb menys de 22 *kringles*
- La seqüència d'aminoàcids del *kringle* IV₁₀ implicada en la interacció amb la lisina (*Lysine Binding Pocket*) es troba relativament ben conservada en la mostra estudiada. La mutació W81R descrita per altres autors i tributària de la pèrdua de funció LBS no es troba en la nostra mostra
- Es troba un pacient amb una mutació no descrita anteriorment. La mutació consisteix en una delecció de 2 pb. El pacient, malgrat presentar una concentració plasmàtica de Lp(a) i una activitat LBS baixa, pertany al grup de pacients amb infart prematur.
- La mutació M75T es freqüent en la nostra població. El genotip TT s'associa a un major risc de patir infart suggerint que es podria trobar en desequilibri de lligament amb altres factors genètics de risc
- Hi ha una forta correlació positiva entre la primera i la segona mesura de la concentració plasmàtica en mostres emmagatzemades a -70°C durant 5 anys.
- Es dona però una pèrdua d'immunoreactivitat durant l'emmagatzematge que no és uniforme i afecta més a les mostres dels pacients que a les dels controls. Aquesta pèrdua es més pronunciada en pacients amb valors intermedis de Lp(a) i no està relacionat amb la mida de l'apo(a)

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Albers JJ, Taggart HM, Applebaum-Bowden D, Haffner S, Chesnut CH 3rd, Hazzard WR (1984): Reduction of lecithin-cholesterol acyltransferase, apolipoprotein D and the Lp(a) lipoprotein with the anabolic steroid stanozolol. *Biochim Biophys Acta* 795:293-296.
- Albers JJ, Kennedy H, Marcovina SM (1996): Evidence that Lp[a] contains one molecule of apo[a] and one molecule of apoB: evaluation of amino acid analysis data. *J Lipid Res* 37:192-196.
- Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, Pitkaniemi J, Karvonen M, Tuomilehto J, Salonen JT, Ehnholm C (1994): Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 106: 9-19.
- Armstrong VW, Walli AK, Seidel D (1985): Isolation, characterization, and uptake in human fibroblasts of an apo(a)-free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 11:1314-1323.
- Armstrong VW, Harrach B, Robenek H, Helmhold M, Walli AK, Seidel D (1990): Heterogeneity of human lipoprotein Lp[a]: cytochemical and biochemical studies on the interaction of two Lp[a] species with the LDL receptor. *J Lipid Res* 31: 429-441.
- Aveynier E, Peronnon C, Valenti K, Laporte F (1998): Apolipoprotein (a) isoform size determination. Value and limits of high resolution phenotyping by agarose gel electrophoresis. *Ann Biol Clin* 56: 73-78.
- Bas Leerink C, Duif PF, Gimpel JA, Kortlandt W, Bouma BN, van Rijn HJ (1992): Lysine-binding heterogeneity of Lp(a): consequences for fibrin binding and inhibition of plasminogen activation *Thromb Haemost* 68: 185-188.
- Bas Leerink CB, Duif PFCCM, Verhoeven N, Hackeng CM, Leus FR, Prins J, Bouma BN, Vanrijn HJM (1994): Apolipoprotein(a) isoform size influences binding of lipoprotein(a) to plasmin- modified des-AA-fibrinogen. *Fibrinolysis* 8: 214-220.
- Barbagallo CM, Averna MR, Sparacino V, Galione A, Caputo F, Scafidi V, Amato S, Mancino C, Cefalu AB, Notarbartolo A (1993): Lipoprotein (a) levels in end-stage renal failure and renal transplantation. *Nephron* 64:560-564.
- Bard JM, Delattre-Lestavel S, Clavey V, Pont P, Derudas B, Parra HJ, Fruchart JC (1992): Isolation and characterization of two sub-species of Lp(a), one containing apo E and one free of apo E. *Biochim Biophys Acta* 127: 124-130.
- Bdeir K, Cane W, Canziani G, Chaiken I, Weisel J, Koschinsky ML, Lawn RM, Bannerman PG, Sachais BS, Kuo A, Hancock MA, Tomaszewski J, Raghunath PN, Ganz T, Higazi AA, Cines DB (1999): Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. *Blood* 94: 2007-2019.
- Becker L, McLeod RS, Marcovina SM, Yao Z, Koschinsky ML (2001): Identification of a critical lysine residue in apolipoprotein B-100 that mediates noncovalent interaction with apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 276:36155-36162.
- Berg K (1963): A new serum system type in man. The Lp-system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 59: 369-389.
- Berg K, Roald B, Sande H (1994): High Lp(a) lipoprotein level in maternal serum may interfere with placental circulation and cause fetal growth retardation. *Clin Genet* 46: 52-56.

- Bihari-Varga M, Gruber E, Rotheneder M, Zechner R, Kostner GM (1988): Interaction of lipoprotein Lp(a) and low density lipoprotein with glycosaminoglycans from human aorta. *Arteriosclerosis* 8: 851-857.
- Boffelli D, Zajchowski DA, Yang Z, Lawn RM (1999): Estrogen modulation of apolipoprotein(a) expression. Identification of a regulatory element. *J Biol Chem* 274:15569-15574.
- Boerwinkle E, Menzel HJ, Kraft HG, Utermann G (1989): Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. III. Contribution of Lp(a) glycoprotein phenotypes to normal lipid variation. *Hum Genet* 82:73-78.
- Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH (1992): Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest* 90:52-60.
- Boonmark NW, Lou XJ, Yang ZJ, Schwartz K, Zhang JL, Rubin EM, Lawn RM (1997): Modification of apolipoprotein(a) lysine binding site reduces atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest* 100: 558-564.
- Borba EF, Santos RD, Bonfa E, Vinagre CG, Pileggi FJ, Cossermelli W, Maranhao RC (1994): Lipoprotein(a) levels in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 21:220-223.
- Bostom AG, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW, Jenner JL, Ordovas JM, Schaefer EJ, Castelli WP (1994): A prospective investigation of elevated lipoprotein (a) detected by electrophoresis and cardiovascular disease in women. The Framingham Heart Study. *Circulation* 90: 1688-1695.
- Bowden JF, Pritchard PH, Hill JS, Frohlich JJ (1994): Lp(a) concentration and apo(a) isoform size. Relation to the presence of coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 4:1561-1568.
- Buechler C, Ullrich H, Ritter M, Porsch-Oezcuemez M, Lackner KJ, Barlage S, Friedrich SO, Kostner GM, Schmitz G (2001): Lipoprotein (a) up-regulates the expression of the plasminogen activator inhibitor 2 in human blood monocytes. *Blood* 97: 981-986.
- Cantin B, Gagnon F, Moorjani S, Despres JP, Lamarche B, Lupien PJ, Dagenais GR (1998): Is lipoprotein(a) an independent risk factor for ischemic heart disease in men? The Quebec Cardiovascular Study. *J Am Coll Cardiol* 31: 519-525.
- Caplice NM, Panetta C, Peterson TE, Kleppe LS, Mueske CS, Kostner GM, Broze GJ Jr, Simari RD (2001). Lipoprotein (a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood* 98: 2980-2987.
- Cheesman EJ, Sharp RJ, Zlot CH, Liu CY, Taylor S, Marcovina SM, Young SG, McCormick SP (2000): An analysis of the interaction between mouse apolipoprotein B100 and apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 275:28195-28200.
- Cremer P, Nagel D, Labrot B, Mann H, Muche R, Elster H, Seidel D (1994): Lipoprotein Lp(a) as predictor of myocardial infarction in comparison to fibrinogen, LDL cholesterol and other risk factors: results from the prospective Gottingen Risk Incidence and Prevalence Study (GRIPS). *Eur J Clin Invest* 24: 444-453.
- Csaszar A, Karadi I, Juhasz E, Romics L (1995): High lipoprotein(a) levels with predominance of high molecular weight apo(a) isoforms in patients with pulmonary embolism. *Eur J Clin Invest* 25: 368-370.

- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM (1990): Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5134-5138.
- Dahlen G, Berg K, Frick MH (1976): Lp(a) lipoprotein/pre-beta -1 lipoprotein serum lipids and atherosclerotic disease. *Clin Genet* 9: 558-566.
- Dahlen G, Ericson C, Berg K (1978): In vitro studies of the interaction of isolated Lp(a) lipoprotein and other serum lipoproteins with glycosaminoglycans. *Clin Genet* 14: 36-42.
- de Bruin TW, van Barlingen H, van Linde-Sibenius Trip M, van Vuurst de Vries AR, Akveld MJ, Erkelens DW (1993): Lipoprotein(a) and apolipoprotein B plasma concentrations in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 76:121-126.
- de la Peña A, Izaguirre R, Anglés-Cano E Lipoprotein Lp(a) and atherotrombotic disease. *Arch. Med Research* 31; 353-359
- de Rijke YB, Jurgens G, Hessels EM, Hermann A, van Berkel TJ (1992): In vivo fate and scavenger receptor recognition of oxidized lipoprotein[a] isoforms in rats. *J Lipid Res* 33: 1315-1325.
- Dudani AK, Ganz PR (1996): Endothelial cell surface actin serves as a binding site for plasminogen, tissue plasminogen activator and lipoprotein(a). *Br J Haematol* 95: 168-178.
- Edelstein C, Italia JA, Klezovitch O, Scanu AM (1996): Functional and metabolic differences between elastase-generated fragments of human lipoprotein[a] and apolipoprotein[a]. *J Lipid Res* 37:1786-1801.
- Edelstein C, Italia JA, Klezovitch O, Scanu AM (1997): Metalloproteinase-2 cleaves lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) in the linker region between kringles IV-4 and IV-5 (Abstr.) *Circulation* 96(suppl): 111.
- Edelstein C, Italia JA, Scanu AM (1997): Polymorphonuclear cells isolated from human peripheral blood cleave lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) at multiple interkringle sites via the enzyme elastase. Generation of mini-Lp(a) particles and apo(a) fragments. *J Biol Chem* 272: 11079-11087.
- Edelstein C, Shapiro SD, Klezovitch O, Scanu AM (1999): Macrophage metalloelastase, MMP-12, cleaves human apolipoprotein(a) in the linker region between kringles IV-4 and IV-5. Potential relevance to lipoprotein(a) biology. *J Biol Chem* 274: 10019-10023.
- Ehnholm C, Garoff H, Simons K, Aro H (1971): Purification and quantitation of the human plasma lipoprotein carrying the Lp(a) antigen. *Biochim Biophys Acta* 236: 431-439.
- Ehnholm C, Garoff H, Renkonen O, Simons K (1972): Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochemistry* 11: 3229-3232.
- Etingin OR, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL (1991): Lipoprotein(a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. A potential mechanism in thrombogenesis. *J Biol Chem* 266: 2459-2465.
- Ernst A, Helmhold M, Brunner C, Petho-Schramm A, Armstrong VW, Muller HJ (1995): Identification of two functionally distinct lysine-binding sites in kringle 37 and in kringles 32-36 of human apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 270: 6227-34.

- Ezratty A, Simon DI, Loscalzo J (1993): Lipoprotein(a) binds to human platelets and attenuates plasminogen binding and activation. *Biochemistry* 32: 4628-4633.
- Fless GM, Roli CA, Scanu AM (1984): Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *J Biol Chem* 259: 11470-11478.
- Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. (1985): Isolation of apolipoprotein(a) from lipoprotein(a). *J Lipid Res* 26: 1224-1229.
- Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM (1986): Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). *J Biol Chem* 261: 8712-8718.
- Fless GM, Santiago JY (1997): Molecular weight determination of lipoprotein(a) [Lp(a)] in solutions containing either NaBr or D2O: relevance to the number of apolipoprotein(a) subunits in Lp(a). *Biochemistry* 36:233-238.
- Frank SL, Klisak I, Sparkes RS, Mohandas T, Tomlinson JE, McLean JW, Lawn RM, Lusis AJ (1988): The apolipoprotein(a) gene resides on human chromosome 6q26-27, in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Hum Genet* 79:352-356.
- Frank S, Durovic S, Kostner K, Kostner GM (1995): Inhibitors for the in vitro assembly of Lp(a). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1774-1780.
- Fu L, Jamieson DG, Usher DC, Lavi E (2001): Gene expression of apolipoprotein(a) within the wall of human aorta and carotid arteries. *Atherosclerosis* 158: 303-311.
- Gabel B, Yao Z, McLeod RS, Young SG, Koschinsky ML (1994): Carboxyl-terminal truncation of apolipoproteinB-100 inhibits lipoprotein(a) particle formation. *FEBS Lett* 350:77-81.
- Gabel BR, McLeod RS, Yao Z, Koschinsky ML (1998): Sequences within the amino terminus of ApoB100 mediate its noncovalent association with apo(a). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1738-1744.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994): Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94: 2493-2503.
- Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM Jr, Morrisett JD, Dahlen GH (1983): *J Biol Chem* 258: 4582-4589.
- Gaubatz JW, Chari MV, Nava ML, Guyton JR, Morrisett JD (1987): Isolation and characterization of the two major apoproteins in human lipoprotein [a]. *J Lipid Res* 28: 69-79.
- Gaw A, Hobbs HH (1994): Molecular genetics of lipoprotein (a): new pieces to the puzzle. *Curr Opin Lipidol* 5:149-155.
- Gonbert S, Saint-Jore B, Giral P, Doucet C, Chapman J, Thillet J (2001): Molecular analysis of apo(a) fragmentation in polygenic hypercholesterolemia: characterization of a new plasma fragment pattern. : *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1353-1358.
- Gonzalez-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV (1989): Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein a compete for the same site. *Biochemistry* 28: 2374-2377.
- Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM (1993): Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science* 260: 1655-1658.

- Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC (1994): Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 370: 460-462.
- Grainger DJ Metcalfe JC. Transforming growth factor-beta: the key to understanding lipoprotein(a)? *Current Opinion in Lipidol* 6: 81-85.
- Gries A, Gries M, Wurm H, Kenner T, Ijsseldijk M, Sixma JJ, Kostner GM (1996): Lipoprotein(a) inhibits collagen-induced aggregation of thrombocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 648-655.
- Guevara J Jr, Knapp RD, Honda S, Northup SR, Morrisett JD (1992): A structural assessment of the apo[a] protein of human lipoprotein[a]. *Proteins* 12:188-199.
- Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, Fogelman AM (1992): Malondialdehyde modification of lipoprotein(a) produces avid uptake by human monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 267: 4143-4151.
- Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL (1989): Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 339: 303-305.
- Handa V, ul-Hussain M, Pati N, Pati U (2002): Multiple liver-specific factors bind to a 64-bp element and activate apo(a) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 243-249.
- Haque NS, Zhang X, French DL, Li J, Poon M, Fallon JT, Gabel BR, Taubman MB, Koschinsky M, Harpel PC (2000): CC chemokine I-309 is the principal monocyte chemoattractant induced by apolipoprotein(a) in human vascular endothelial cells. *Circulation* 102: 786-792.
- Harpel PC, Chang VT, Borth W (1992): Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10193-10197.
- Harvie NR, Schultz JS (1970): Studies of Lp-lipoprotein as a quantitative trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 66: 99-103.
- Helmhold M, Bigge J, Muche R, Mainoo J, Thiery J, Seidel D, Armstrong VW (1991): Contribution of the apo[a] phenotype to plasma Lp[a] concentrations shows considerable ethnic variation. *J Lipid Res* 32:1919-1928.
- Hervio L, Chapman MJ, Thillet J, Loyau S, Angles-Cano E (1993): Does apolipoprotein(a) heterogeneity influence lipoprotein(a) effects on fibrinolysis? *Blood* 82: 392-397.
- Hervio L, Girard-Globa A, Durlach V, Angles-Cano E (1996): The antifibrinolytic effect of lipoprotein(a) in heterozygous subjects is modulated by the relative concentration of each of the apolipoprotein(a) isoforms and their affinity for fibrin. *Eur J Clin Invest* 26: 411-417.
- Hoover-Plow JL, Boonmark N, Skocir P, Lawn R, Plow EF (1996) : A quantitative immunoassay for the lysine-binding function of lipoprotein(a). Application to recombinant apo(a) and lipoprotein(a) in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 656-664.
- Hoover-Plow J, Khaitan A, Fless GM (1998): Phospholipase A2 modification enhances lipoprotein(a) binding to the subendothelial matrix. *Thromb Haemost* 79: 640-648.

- Huby T, Schroder W, Doucet C, Chapman J, Thillet J (1995): Characterization of the N-terminal and C-terminal domains of human apolipoprotein(a): relevance to fibrin binding. *Biochemistry* 34: 7385-7393.
- Huby T, Dachet C, Lawn RM, Wickings J, Chapman MJ, Thillet J (2001): Functional analysis of the chimpanzee and human apo(a) promoter sequences: identification of sequence variations responsible for elevated transcriptional activity in chimpanzee. *J Biol Chem* 276:22209-22214.
- Hughes SD, Lou XJ, Ighani S, Verstuyft J, Grainger DJ, Lawn RM, Rubin EM (1997): Lipoprotein(a) vascular accumulation in mice. In vivo analysis of the role of lysine binding sites using recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 100: 1493-1500.
- Hurt-Camejo E, Andersen S, Standal R, Rosengren B, Sartipy P, Stadberg E, Johansen B (1997): Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. Activity of the isolated enzyme on low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 300-309.
- Hurt-Camejo E, Olsson U, Wiklund O, Bondjers G, Camejo G (1997): Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1011-1017.
- Ichinose A (1992): Multiple members of the plasminogen-apolipoprotein(a) gene family associated with thrombosis. *Biochemistry* 31:3113-3118.
- Ichinose A, Kuriyama M (1995): Detection of polymorphisms in the 5'-flanking region of the gene for apolipoprotein(a). *Biochem Biophys Res Commun* 209:372-378.
- Ioka T, Tasaki H, Yashiro A, Yamashita K, Ozumi K, Tsutsui M, Kouzuma R, Okazaki M, Nakashima Y (2001): Association between plasma lipoprotein(a) and endothelial dysfunction in normocholesterolemic and non-diabetic patients with angiographically normal coronary arteries. *Circ J* 66: 267-271.
- Jauhiainen M, Koskinen P, Ehnholm C, Frick MH, Manttari M, Manninen V, Huttunen JK (1991): Lipoprotein (a) and coronary heart disease risk: a nested case-control study of the Helsinki Heart Study participants. *Atherosclerosis* 89: 59-67.
- Joven J, Simo JM, Vilella E, Camps J, Espinel E, Villabona C. (1995) Accumulation of atherogenic remnants and lipoprotein(a) in the nephrotic syndrome: relation to remission of proteinuria. *Clin Chem* 41:908-13.
- Joven J, Vilella E. (1991). Serum levels of lipoprotein(a) in patients with well-controlled non-insulin-dependent diabetes mellitus. *JAMA* 265:1113-1114.
- Jurgens G, Chen Q, Esterbauer H, Mair S, Ledinski G, Dinges HP (1993): Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein(a). *Arterioscler Thromb* 13: 1689-1699.
- Kanno H, Saito E, Fujioka T, Yasugi T (1992): Lipoprotein(a) levels in the nephrotic syndrome. *Intern Med* 31:1004-1008.
- Karadi I, Kostner GM, Gries A, Nimpf J, Romics L, Malle E. (1988). Lipoprotein (a) and plasminogen are immunochemically related. *Biochim Biophys Acta* 960:91-97,
- Karadi I, Romics L, Palos G, Doman J, Kaszas I, Hesz A, Kostner GM (1989): Lp(a) lipoprotein concentration in serum of patients with heavy proteinuria of different origin. *Clin Chem* 35: 2121-2123.

- Keesler GA, Gabel BR, Devlin CM, Koschinsky ML, Tabas I (1996): The binding activity of the macrophage lipoprotein(a)/apolipoprotein(a) receptor is induced by cholesterol via a post-translational mechanism and recognizes distinct kringle domains on apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 271: 32096-32104.
- Klezovitch O, Edelstein C, Scanu AM (1996): Evidence that the fibrinogen binding domain of Apo(a) is outside the lysine binding site of kringle IV-10: a study involving naturally occurring lysine binding defective lipoprotein(a) phenotypes. *J Clin Invest* 98: 185-189.
- Klezovitch O, Edelstein C, Zhu L, Scanu AM (1998): Apolipoprotein(a) binds via its C-terminal domain to the protein core of the proteoglycan decorin. Implications for the retention of lipoprotein(a) in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 273: Buechler 23856-23865.
- Kochl S, Fresser F, Lobentanz E, Baier G, Utermann G (1997): Novel interaction of apolipoprotein(a) with beta-2 glycoprotein I mediated by the kringle IV domain. *Blood* 90: 1482-1489.
- Koschinsky ML, Beisiegel U, Henne-Bruns D, Eaton DL, Lawn RM (1990): Apolipoprotein(a) size heterogeneity is related to variable number of repeat sequences in its mRNA. *Biochemistry* 29: 640-644.
- Koschinsky ML, Cote GP, Gabel B, van der Hoek YY (1993): Identification of the cysteine residue in apolipoprotein(a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein B-100. *J Biol Chem* 268:19819-19825.
- Kostner GM, Avogaro O, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Qunici GB (1981): *Atherosclerosis* 38: 51-61.
- Kostner GM, Gavish D, Leopold B, Bolzano K, Weintraub MS, Breslow JL (1989): HMG CoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp(a) levels. *Circulation* 80:1313-1319.
- Kostner GM, Grillhofer HK (1991): Lipoprotein(a) mediates high affinity low density lipoprotein association to receptor negative fibroblasts. *J Biol Chem* 266:21287-21292.
- Kostner GM (1993): Interaction of Lp(a) and of apo(a) with liver cells. *Arterioscler Thromb* 13:1101-1109.
- Kostner KM, Maurer G, Huber K, Stefenelli T, Dieplinger H, Steyrer E, Kostner GM (1996): Urinary excretion of apo(a) fragments. Role in apo(a) catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:905-911.
- Kostner GM, Wo X, Frank S, Kostner K, Zimmermann R, Steyrer E (1997): Metabolism of Lp(a): assembly and excretion. *Clin Genet* 52:347-354.
- Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G (1989): Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J Clin Invest* 83:137-142.
- Kraft HG, Sandholzer C, Menzel HJ, Utermann G (1992): Apolipoprotein (a) alleles determine lipoprotein (a) particle density and concentration in plasma. *Arterioscler Thromb* 2:302-306.
- Kraft HG, Kochl S, Menzel HJ, Sandholzer C, Utermann G (1992): The apolipoprotein (a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein (a) concentration. *Hum Genet* 90:220-230.
- Kraft HG, Lingenhel A, Pang RW, Delport R, Trommsdorff M, Vermaak H, Janus ED, Utermann G (1996): Frequency distributions of apolipoprotein(a) kringle IV repeat alleles and their effects on lipoprotein(a) levels in Caucasian, Asian, and

- African populations: the distribution of null alleles is non-random. *Eur J Hum Genet* 4: 74-87.
- Kraft HG, Windeger M, Menzel HJ, Utermann G (1998): Significant impact of the +93 C/T polymorphism in the apolipoprotein(a) gene on Lp(a) concentrations in Africans but not in Caucasians: confounding effect of linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet* 7:257-264.
- Kraft HG, Lingenhel A, Raal FJ, Hohenegger M, Utermann G (2000): Lipoprotein(a) in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:522-528.
- Krempler F, Kostner G, Bolzano K, Sandhofer F (1979): Lipoprotein (a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apolipoprotein B. *Biochim Biophys Acta* 575:63-70.
- Krempler F, Kostner GM, Bolzano K, Sandhofer F (1980): Turnover of lipoprotein (a) in man. *J Clin Invest* 65:1483-1490.
- Kronenberg F, Steinmetz A, Kostner GM, Dieplinger H (1996): Lipoprotein(a) in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 33: 495-543.
- Kronenberg F, Trenkwalder E, Dieplinger H, Utermann G.(1996). Lipoprotein(a) in stored plasma samples and the ravages of time. Why epidemiological studies might fail. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1568-1572.
- Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J (1999): Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 100: 1154-1160.
- Kusumi Y, Scanu AM, McGill HC, Wissler RW (1993): Atherosclerosis in a rhesus monkey with genetic hypercholesterolemia and elevated plasma Lp(a). *Atherosclerosis* 99: 165-174.
- Lawn RM, Boonmark NW, Schwartz K, Lindahl GE, Wade DP, Byrne CD, Fong KJ, Meer K, Patthy L (1995). The recurring evolution of lipoprotein(a). Insights from cloning of hedgehog apolipoprotein(a). *J Biol Chem* 270 : 24004-24009.
- Lawn RM, Schwartz K, Patthy L (1997). Convergent evolution of apolipoprotein(a) in primates and hedgehog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11992-11997.
- *Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahmig T, Hobbs HH (1991): Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 87:2153-2161.
- Ledue TB, Neveux LM, Palomaki GE, Ritchie RF, Craig WY (1993): The relationship between serum levels of lipoprotein(a) and proteins associated with the acute phase response. *Clin Chim Acta* 223:73-82.
- Levin EG, Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Baynham P, Curtiss LK, Plow EF (1994): Lipoproteins inhibit the secretion of tissue plasminogen activator from human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 14: 438-442.
- Li XN, Grenett HE, Benza RL, Demissie S, Brown SL, Tabengwa EM, Gianturco SH, Bradley WA, Fless GM, Booyse FM (1997): Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3215-3223.
- Lindahl G, Gersdorf E, Menzel HJ, Seed M, Humphries S, Utermann G (1990): Variation in the size of human apolipoprotein(a) is due to a hypervariable region in the gene. *Hum Genet* 84: 563-567.

- Lingenhel A, Kraft HG, Kotze M, Peeters AV, Kronenberg F, Kruse R, Utermann G (1998). Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in FH. *Eur J Hum Genet* 6: 50-60.
- Lippi G, Braga V, Adami S, Guidi G (1998): Modification of serum apolipoprotein A-I, apolipoprotein B and lipoprotein(a) levels after bisphosphonates-induced acute phase response. *Clin Chim Acta* 27: 79-87.
- Lippi G, Veraldi GF, Dorucci V, Dusi R, Ruzzenente O, Brentegani C, Guidi G, Cordiano C (1998): Usefulness of lipids, lipoprotein(a) and fibrinogen measurements in identifying subjects at risk of occlusive complications following vascular and endovascular surgery. *Scand J Clin Lab Invest*; 58: 497-504.
- Lippi G, Guidi G (1999): Biochemical risk factors and patient's outcome: the case of lipoprotein(a). *Clin Chim Acta* 280: 59-71.
- Lippi G, Guidi G (2000): Lipoprotein(a) from ancestral benefit to modern pathogen?. *Q J Med* 93: 75-84
- LoGrasso PV, Cornell-Kennon S, Boettcher BR (1994): Cloning, expression, and characterization of human apolipoprotein(a) kringle IV37. *J Biol Chem* 269 : 21820-21827.
- Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM .(1990): Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 10: 240-245.
- Lundstam U, Hurt-Camejo E, Olsson G, Sartipy P, Camejo G, Wiklund O (1999): Proteoglycans contribution to association of Lp(a) and LDL with smooth muscle cell extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1162-1167.
- Magnaghi P, Citterio E, Margaretti N, Acquati F, Ottolenghi S, Taramelli R (1994): Molecular characterisation of the human apo(a)-plasminogen gene family clustered on the telomeric region of chromosome 6 (6q26-27). *Hum Mol Genet* 3:437-442.
- Magnusson S, Peterson T.E, Sottrup-Jensen, Claeys H (1975): Complete primary structure of prothrombin. Isolation structure, and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activation by thrombin. *Proteases and biological control*. Reich E., Rifkin D.B. , Shaw E. Editors. Cold Spring Harbor Laboratories. Cold Spring Harbor. NY 123-149.
- Marcovina SM, Zhang ZH, Gaur VP, Albers JJ (1993): Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American blacks and whites. *Biochem Biophys Res Commun* 191:1192-1196.
- Marcovina SM, Hobbs HH, Albers JJ (1996): Relation between number of apolipoprotein(a) kringle 4 repeats and mobility of isoforms in agarose gel: basis for a standardized isoform nomenclature. *Clin Chem* 42: 436-439.
- Martinez ML, Vega L, Mora A, Andreu L, Molina E (1993): Lipoproteína (a). *Qim Clin* 12: 414-421.
- McCance SG, Menhart N, Castellino FJ (1994): Amino acid residues of the kringle-4 and kringle-5 domains of human plasminogen that stabilize their interactions with omega-amino acid ligands. *J Biol Chem* 269:32405-32410.
- McCormick SP, Ng JK, Cham CM, Taylor S, Marcovina SM, Segrest JP, Hammer RE, Young SG (1997): Transgenic mice expressing human ApoB95 and ApoB97. Evidence that sequences within the carboxyl-terminal portion of human apoB100 are important for the assembly of lipoprotein. *J Biol Chem* 272: 23616-23622.

- McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM (1987): cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330: 132-137.
- Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Baynham P, Sebald MT, Skocir P, Curtiss LK, Levin EG, Hoover-Plow JL, Plow EF (1995): Interaction of Lp(a) with plasminogen binding sites on cells. *Thromb Haemost* 73: 458-465.
- Mooser V, Mancini FP, Bopp S, Petho-Schramm A, Guerra R, Boerwinkle E, Muller HJ, Hobbs HH (1995): Sequence polymorphisms in the apo(a) gene associated with specific levels of Lp(a) in plasma. *Hum Mol Genet* 4:173-181.
- Mooser V, Seabra MC, Abedin M, Landschulz KT, Marcovina S, Hobbs HH (1996): Apolipoprotein(a) kringle 4-containing fragments in human urine. Relationship to plasma levels of lipoprotein(a). *J Clin Invest* 97:858-864.
- Mooser V, Marcovina SM, White AL, Hobbs HH. (1996). Kringle-containing fragments of apolipoprotein(a) circulate in human plasma and are excreted into the urine. *J Clin Invest* 98:2414-2424.
- Mooser V, Scheer D, Marcovina SM, Wang J, Guerra R, Cohen J, Hobbs HH (1997): The Apo(a) gene is the major determinant of variation in plasma Lp(a) levels in African Americans. *Am J Hum Genet* 61:402-417.
- Mooser V, Berger MM, Tappy L, Cayeux C, Marcovina SM, Darioli R, Nicod P, Chiolero R (2000): Major reduction in plasma Lp(a) levels during sepsis and burns. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1137-1142.
- Naruszewicz M, Selinger E, Dufour R, Davignon J (1992): Probucol protects lipoprotein (a) against oxidative modification. *Metabolism* 41: 1225-1228.
- Ogorelkova M, Gruber A, Utermann G (1999): Molecular basis of congenital lp(a) deficiency: a frequent apo(a) 'null' mutation in caucasians. *Hum Mol Genet.* 8:2087-2096.
- Ogorelkova M, Kraft HG, Ehnholm C, Utermann G (2001): Single nucleotide polymorphisms in exons of the apo(a) kringles IV types 6 to 10 domain affect Lp(a) plasma concentrations and have different patterns in Africans and Caucasians. *Hum Mol Genet* 10:815-824.
- Olivecrona H, Ericsson S, Berglund L, Angelin B (1993): Increased concentrations of serum lipoprotein (a) in response to growth hormone treatment. *BMJ* 306:1726-1727.
- Olivecrona H, Johansson AG, Lindh E, Ljunghall S, Berglund L, Angelin B (1995): Hormonal regulation of serum lipoprotein(a) levels. Contrasting effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:847-849.
- O'Reilly MS (1997): Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* 79: 273-294.
- Pati U, Pati N (2000): Lipoprotein(a), atherosclerosis, and apolipoprotein(a) gene polymorphism. *Mol Genet Metab* 71:87-92.
- Pay S, Ozcan N, Tokgozoglu SL (1997): Elevated Lp(a) is the most frequent familial lipoprotein disorder leading to premature myocardial infarction in a country with low cholesterol levels. *Int J Cardiol* 60: 301-315.
- Pepin JM, O'Neil JA, Hoff HF (1991): Quantification of apo[a] and apoB in human atherosclerotic lesions. *J Lipid Res* 32: 317-327.

- Perombelon YF, Soutar AK, Knight BL (1994): Variation in lipoprotein(a) concentration associated with different apolipoprotein(a) alleles. *J Clin Invest* 93:1481-1492.
- Pillarisetti S, Paka L, Obunike JC, Berglund L, Goldberg IJ (1997): Subendothelial retention of lipoprotein (a). Evidence that reduced heparan sulfate promotes lipoprotein binding to subendothelial matrix. *J Clin Invest* 100: 867-874.
- Poon M, Zhang X, Dunskey KG, Taubman MB, Harpel PC (1997): Apolipoprotein(a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelial cells. *Circulation* 96: 2514-2519.
- Prins J, Leus FR, van der Hoek YY, Kastelein JJ, Bouma BN, van Rijn HJ (1997): The identification and significance of a Thr-->Pro polymorphism in kringle IV type 8 of apolipoprotein(a). *Thromb Haemost* 77: 949-954.
- Ragab MS, Selvaraj P, Sgoutas DS (1996): Oxidized lipoprotein (a) induces cell adhesion molecule Mac-1 (CD 11b) and enhances adhesion of the monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 123: 103-113.
- Rahman MN, Petrounevitch V, Jia Z, Koschinsky ML (2001): Antifibrinolytic effect of single apo(a) kringle domains: relationship to fibrinogen binding. *Protein Eng* 14: 427-438.
- Rahman MN, Becker L, Petrounevitch V, Hill BC, Jia Z, Koschinsky ML (2002): Comparative analyses of the lysine binding site properties of apolipoprotein(a) kringle IV types 7 and 10. *Biochemistry* 41: 1149-1155.
- Ramharack R, Spahr MA, Kreick JS, Sekerke CS (1996): Expression of apolipoprotein[a] and plasminogen mRNAs in cynomolgus monkey liver and extrahepatic tissues. *J Lipid Res* 37:2029-2040.
- Ramharack R, Wyborski RJ, Spahr MA (1998): The apolipoprotein(a) promoter contains a retinoid response element. *Biochem Biophys Res Commun* 245:194-197.
- Ramharack R, Barkalow D, Spahr MA (1998): Dominant negative effect of TGF-beta1 and TNF-alpha on basal and IL-6-induced lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 984-990.
- Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-Jonsson S, Dahlen G (1991): Lipoprotein (a), lipids, and lipoproteins in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 50:366-368.
- Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dietel M, Krebber HJ, Beisiegel U (1989): Detection and quantification of lipoprotein(a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis* 9: 579-592.
- Rath M, Pauling L. (1990) Hypothesis: lipoprotein(a) is a surrogate for ascorbate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:6204-6207.
- Rath M, Pauling L. (1990). Immunological evidence for the accumulation of lipoprotein(a) in the atherosclerotic lesion of the hypoascorbemic guinea pig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9388-9390.
- Ren S, Man RY, Angel A, Shen GX (1997): Oxidative modification enhances lipoprotein(a)-induced overproduction of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 128: 1-10.
- Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ (1993): A prospective study of lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 270: 2195-2199.

- Rotimi CN, Cooper RS, Marcovina SM, McGee D, Owoaje E, Ladipo M (1997): Serum distribution of lipoprotein(a) in African Americans and Nigerians: potential evidence for a genotype-environmental effect. *Genet Epidemiol* 14:157-168.
- Rosby O, Berg K (2000): LPA gene: interaction between the apolipoprotein(a) size ('kringle IV' repeat) polymorphism and a pentanucleotide repeat polymorphism influences Lp(a) lipoprotein level. *J Intern Med* 247: 139-152.
- Rubanyi GM, Freay AD, Lawn RM (2000): Endothelium dependent vasorelaxation in the aorta of transgenic mice expressing human apolipoprotein(a) or lipoprotein(a). *Endothelium* 7: 253-264.
- Sacks FM, McPherson R, Walsh BW (1994): Effect of postmenopausal estrogen replacement on plasma Lp(a) lipoprotein concentrations. *Arch Intern Med* 154:1106-1110.
- Sangrar W, Gabel BR, Boffa MB, Walker JB, Hancock MA, Marcovina SM, Horrevoets AJ, Nesheim ME, Koschinsky ML. (1997) The solution phase interaction between apolipoprotein(a) and plasminogen inhibits the binding of plasminogen to a plasmin-modified fibrinogen surface. *Biochemistry* 36:10353-10363.
- Scanu AM (1988): Lipoprotein(a). A potential bridge between the fields of atherosclerosis and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 112: 1045-1047.
- Scanu AM, Fless GM (1990): Lipoprotein (a). Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest* 85: 1709-1715.
- Scanu AM, Miles LA, Fless GM, Pfaffinger D, Eisenbart J, Jackson E, Hoover-Plow JL, Brunck T, Plow EF [1993]: Rhesus monkey lipoprotein(a) binds to lysine Sepharose and U937 monocytoid cells less efficiently than human lipoprotein(a). Evidence for the dominant role of kringle 4(37). *J Clin Invest* 91:283-291.
- Scanu AM, Pfaffinger D, Lee JC, Hinman J.A (1994): Single point mutation (Trp72-->Arg) in human apo(a) kringle 4-37 associated with a lysine binding defect in Lp(a). *Biochim Biophys Acta* 1227:41-45.
- Scanu AM, Edelstein C (1995): Kringle-dependent structural and functional polymorphism of apolipoprotein (a). *Biochim Biophys Acta* 1256: 1-12.
- Scanu AM, Atzeni MM, Edelstein C, Tonolo G, Maioli M, Klezovitch O (1997): Lipoprotein(a): identification of subjects with a superbinding capacity for fibrinogen. *Clin Genet* 52: 367-370.
- Scanu AM (1998): Atherothrombogenicity of lipoprotein(a): the debate. *Am J Cardiol* 82: 26Q-33Q.
- Scanu AM (2001): The role of lipoprotein(a) in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease and its utility as predictor of coronary heart disease events. *Curr Cardiol Rep* 3: 385-390.
- Scholz M, Kraft HG, Lingenhel A, Delport R, Vorster EH, Bickeboller H, Utermann G (1999): Genetic control of lipoprotein(a) concentrations is different in Africans and Caucasians. *Eur J Hum Genet* 7:169-178.
- Scott J (1989): Thrombogenesis linked to atherogenesis at last?. *Nature* 341: 22-23.
- Seed M, Ayres KL, Humphries SE, Miller GJ (2001): Lipoprotein (a) as a predictor of myocardial infarction in middle-aged men. *Am J Med* 110: 22-27.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ (1993): Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 268: 23824-23829.

- Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE (1994): Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest* 93: 50-55.
- Soulat T, Loyau S, Baudouin V, Durlach V, Gillery P, Garnotel R, Loirat C, Angles-Cano E (1999): Evidence that modifications of Lp(a) in vivo inhibit plasmin formation on fibrin--a study with individual plasmas presenting natural variations of Lp(a). *Thromb Haemost* 82: 121-127.
- Soulat T, Loyau S, Baudouin V, Maisonneuve L, Hurtaud-Roux MF, Schlegel N, Loirat C, Angles-Cano E (2000): Effect of individual plasma lipoprotein(a) variations in vivo on its competition with plasminogen for fibrin and cell binding: An in vitro study using plasma from children with idiopathic nephrotic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 575-584.
- Takahashi A, Taniguchi T, Fujioka Y, Ishikawa Y, Yokoyama M (1996): Effects of lipoprotein(a) and low density lipoprotein on growth of mitogen stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 120: 93-99.
- Tavola A, D'Angelo SV, Bandello F, Brancato R, Parlavecchia M, Safa O, D'Angelo A (1995): Central retinal vein and branch artery occlusion associated with inherited plasminogen deficiency and high lipoprotein(a) levels: a case report. *Thromb Res* 80: 327-331.
- Thillet J, Faucher C, Issad B, Allouache M, Chapman J, Jacobs C (1993): Lipoprotein(a) in patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 22: 226-232.
- Tulinsky A, Park CH, Mao B, Llinas M (1988): Lysine/fibrin binding sites of kringles modeled after the structure of kringle 1 of prothrombin. *Proteins* 3: 85-96.
- Utermann G, Wiegand H (1969): Separation and characterization of a lipoprotein with antigenic activity in the Lp(a) system. *Humangenetik* 8: 39-46.
- Utermann G, Weber W (1983): Protein composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *FEBS Lett* 154: 357-361.
- Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C (1987): Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 80: 458-465.
- Utermann G, Duba C, Menzel HJ (1988): Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. II. Inheritance of Lp(a) glycoprotein phenotypes. *Hum Genet* 78:47-50.
- Utermann G, Hoppichler F, Dieplinger H, Seed M, Thompson G, Boerwinkle E (1989): Defects in the low density lipoprotein receptor gene affect lipoprotein (a) levels: multiplicative interaction of two gene loci associated with premature atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4171-4174.
- Utermann G (1989): The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 246: 904-910.
- Utermann G (1995] Lipoprotein(a). En: Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, Valle D eds. Metabolic am molecular bases of inheritance disease 7th ed. Vol 2 New York McGraw-Hill: 1887-1912.
- Valenti K, Aveyrier E, Laporte F, Hadjian AJ (1997): Evaluation of the genotyping and phenotyping approaches in the investigation of apolipoprotein (a) size polymorphism. *Clin Chim Acta* 263: 249-260.

- von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G (2001): Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 37: 434-439.
- Wade DP, Clarke JG, Lindahl GE, Liu AC, Zysow BR, Meer K, Schwartz K, Lawn RM (1993): 5' control regions of the apolipoprotein(a) gene and members of the related plasminogen gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1369-1373.
- Wade DP, Lindahl GE, Lawn RM (1994): Apolipoprotein(a) gene transcription is regulated by liver-enriched trans-acting factor hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J Biol Chem* 269:19757-19765.
- Wade DP, Puckey LH, Knight BL, Acquati F, Mihalich A, Taramelli R (1997): Characterization of multiple enhancer regions upstream of the apolipoprotein(a) gene. *J Biol Chem* 272:30387-30399.
- Wang J, Mimuro S, Lahoud R, Trudinger B, Wang XL (1998): Elevated levels of lipoprotein(a) in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 178:146-149.
- Weikamp LR, Guttormsen SA, Schultz JS (1988): Linkage between the loci for the Lp(a) lipoprotein (LP) and plasminogen (PLG). *Hum Genet* 79: 80-82.
- White AL, Rainwater DL, Lanford RE (1993): Intracellular maturation of apolipoprotein[a] and assembly of lipoprotein[a] in primary baboon hepatocytes. *J Lipid Res* 34:509-517.
- White AL, Rainwater DL, Hixson JE, Estlack LE, Lanford RE (1994): Intracellular processing of apo(a) in primary baboon hepatocytes. *Chem Phys Lipids*: 67-68:123-133.
- Wight TN The extracellular matrix and atherosclerosis (1995): *Curr Opin Lipidol* 6: 326-334.
- Wild SH, Fortmann SP, Marcovina SM (1997): A prospective case-control study of lipoprotein(a) levels and apo(a) size and risk of coronary heart disease in Stanford Five-City Project participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 239-245.
- Wright LC, Sullivan DR, Muller M, Dyne M, Tattersall MHN, Mounford CE. (1989): Elevated apolipoprotein(a) levels in cancer patients. *Int J Cancer* 3: 241-244
- Xia J, May LF, Koschinsky ML (2000): Characterization of the basis of lipoprotein [a] lysine-binding heterogeneity. *J Lipid Res* 41: 1578-1584.
- Xu XX, Tabas I (1991): Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Biol Chem* 266: 24849-24858.
- Yamada S, Morishita R, Nakamura S, Ogihara T, Kusumi Y, Sakurai I, Kubo N, Sakurabayashi I (2000): Development of antibody against epitope of lipoprotein(a) modified by oxidation: evaluation of new enzyme-linked immunosorbent assay for oxidized lipoprotein(a). *Circulation* 102: 1639-1644.
- Yang Z, Boffelli D, Boonmark N, Schwartz K, Lawn R (1998): Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J Biol Chem* 273:891-897.
- Yano Y, Shimokawa K, Okada Y, Noma A (1997): Immunolocalization of lipoprotein(a) in wounded tissues. *J Histochem Cytochem* 45: 559-568.
- Ye Q, Rahman MN, Koschinsky ML, Jia Z (2001): High-resolution crystal structure of apolipoprotein(a) kringle IV type 7: insights into ligand binding. *Protein Sci* 10: 1124-1129.
- Zawadzki Z, Terce F, Seman LJ, Theolis RT, Breckenridge WC, Milne RW, Marcel YL (1988): The linkage with apolipoprotein (a) in lipoprotein (a) modifies the

immunochemical and functional properties of apolipoprotein B. *Biochemistry* 27: 8474-8481

Zysow BR, Lindahl GE, Wade DP, Knight BL, Lawn RM (1995): C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the apolipoprotein(a) gene introduces an upstream ATG and reduces in vitro translation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 58-64.

Jorge Joven Maried, cap de servei dels laboratoris clínics de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus i professor titular de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili

CERTIFICA

Que Josep Maria Simó i Sisó

Ha realitzat sota la meva tutoria la tesi doctoral **Determinats de la concentració plasmàtica de la Lipoproteïna (a) en la malaltia cardiovascular** i que aquesta està en condicions de ser presentada per obtenir el grau de Doctor

Per a què així consti i tingui els efectes oportuns signo la present

Reus 01 d'abril de 2003

Dr. Jorge Joven Maried