

PAPER DE LA GLICOSILACIÓ DE LA CLUSTERINA/APOLIPOPROTEÏNA J SOBRE LA UNIÓ I AGREGACIÓ DE LA LDL

Montserrat Moncunill Copoví

Màster en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Treball Final de Màster

Departament de Bioquímica Cardiovascular, IR Sant Pau

Tutors: José Luís Sánchez Quesada

Sònia Benítez González

Setembre 2025

AGRAÏMENTS

M'agradaria expressar el meu profund agraïment a totes les persones que han fet possible la realització del Treball de Final de Màster.

En primer lloc, en José Luís i la Sònia, els meus tutors, per haver confiat en mi des d'un inici, quan vam fer la primera entrevista, reconeixent en mi el desig d'aprendre i explorar el món de la recerca i la investigació en un àmbit diferent al que havia treballat anteriorment. La seva orientació, dedicació i implicació han estat essencials per a fer-me sentir còmode treballant al laboratori.

En segon lloc, a la Núria i al Jose per la seva paciència alhora d'explicar-me i fer-me particip dels experiments, per haver-me transmès els seus coneixements i la seva passió per la recerca i per haver dipositat la seva confiança en mi i en el meu treball. El seu consell, la seva confiança i la seva ajuda sempre que ho he necessitat han estat bàsics per a la correcta realització del treball, així com també la seva implicació, no només professional sinó també personal i emocional, creant així un bon ambient de treball al laboratori i fora d'aquest.

Vull agrair també als membres del laboratori, concretament al David, la Carla, la Raquel, la Lorena, l'Arnau, la Qi, la Chen i en Kemin per haver-me proporcionat la seva ajuda incondicional, per haver-me aconsellat i per haver fet que l'estada de pràctiques fos un moment divertit i enriquidor, per a treballar però també per a riure'ns i gaudir, dins i fora del laboratori.

Agraeixo també a l'Aya, al Mateu, la Xènia, la Jana, la Victoria, la Fiona i al Martí (tot i que hem coincidit poquet), els companys de pràctiques que estaven en una situació similar a la meua i que s'han convertit en amics que m'emporto per sempre. Gràcies per haver compartit aquesta etapa amb mi, i per a crear el millor ambient de treball: agradable, adequat i inspirador. Gràcies a ells, anar cada dia al laboratori no era una simple rutina, sinó una experiència molt divertida i satisfactòria.

Vull agrair l'Helena, la Berta i l'Alba pel suport incondicional i la seva motivació, per aguantar-me amb els meus mals de cap, per fer-me costat en totes les decisions que he pres, per acompanyar-me en el camí de la vida i per continuar formant part del meu dia a dia. Sou les persones més sanes que he conegut mai, i és un regal compartir amb vosaltres moments únics que recordaré sempre.

Gràcies als meus pares, al meu germà i als meus tiets per haver participat en les converses sobre el tema del treball, per haver-me educat i sacrificat, haver-me finançat els estudis i haver-me donat suport en totes les decisions que he pres, gràcies a ells soc la persona que avui us dona les gràcies.

Per últim, no em vull oblidar de tots els docents que he tingut i m'han format certament al llarg de la meua trajectòria estudiantil, des dels professors de parvulari, fins als de la universitat i màster. De cadascun d'ells he après alguna lliçó que m'ha permès arribar fins aquí, així que gràcies.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) represent the main cause of mortality worldwide, with the atherosclerotic disease being the most common underlying pathology. Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease characterized by arterial wall thickening due to cholesterol accumulation, which obstructs blood flux. A well-established association exists between low-density lipoproteins (LDL) cholesterol levels, LDL composition and the risk of developing atherosclerotic diseases; particularly linked to the presence of small, dense LDL. Additionally, minor apolipoproteins present in LDL and high-density lipoproteins (HDL) have an influence on their pro-atherogenic or anti-atherogenic properties. Among them, apolipoprotein J (apoJ), also known as clusterin, an extracellular chaperone with a glycosylation domain, is known to exert a protective role in the atherosclerotic disease progression through multiple molecular mechanisms, such as binding to LDL and inhibition of LDL aggregation.

Based on this knowledge, our research group aimed to express and purify human recombinant apoJ using HEK293T cells. We sought to investigate the role of the glycosylation moiety of apoJ. To achieve this goal, we used deglycosylases to generate different glycosylation-modified isoforms of apoJ in order to explore for the possible role in the interaction between apoJ and LDL, as well as their capacity to prevent LDL aggregation.

Our main findings demonstrated that apoJ had the capacity to prevent LDL aggregation, and this effect was directly proportional to the concentration of apoJ. Furthermore, glycosylation domain played a relevant role in this function, because deglycosylated apoJ partially lost its ability to prevent LDL aggregation. Additionally, this loss of functionality depended on the glycosylation degree. Finally, this post-translational modification was linked to the interaction between LDL and apoJ, with deglycosylated apoJ binding more efficiently to LDL than the glycosylated form.

LLISTAT ABREVIATURES

Apo: apolipoproteïna

APS: persulfat d'amoni

BCA: àcid bicinconínic

CBR-250: coomassie brilliant blue R 250

cdNA: àcid desoxiribonucleic complementari

CLU: clusterina

DNA: àcid desoxiribonucleic

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FBS: sèrum fetal boví

HDL: lipoproteïnes d'alta densitat

HEK293T: Human embryonic kidney 293 cells

HMG-CoA reductasa: β -hidroxi β -metilglutaril-coenzim A reductasa

IDL: lipoproteïnes de densitat intermèdia

LDL: lipoproteïnes de baixa densitat

Lp(a): lipoproteïna (a)

oxLDL: LDL oxidada

PBS: solució salina tamponada amb fosfats

PNGase F: N-Glycosidase F

P/S: Penicil·lina/Estreptomicina

psCLU: clusterina precursora secretada

sCLU: clusterina secretada

sdLDL: LDL de petita densitat

SMase: esfingomielinasa

SDS: dodecil sulfat sòdic

SDS-PAGE: electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

TBS-T: tris-buffered saline amb Tween 20

TEMED: tetrametiletildiamina

VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Introducció general a l'aterosclerosi.....	1
1.2. Bases patofisiològiques de l'aterosclerosi	1
1.2.1. Mecanismes moleculars i cel·lulars	1
1.2.2. Lipoproteïnes plasmàtiques i aterosclerosi	2
1.3. Apolipoproteïna J (apoJ)	4
1.3.1. Funcions biològiques	4
1.4. Paper de l'apolipoproteïna J en l'aterosclerosi	5
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	7
3. MATERIAL I MÈTODES	8
3.1. Obtenció d'apoJ	8
3.1.1. Cultius cel·lulars.....	8
3.1.2. Purificació d'apoJ.....	8
3.1.3. Diàlisi.....	9
3.1.4. Concentració d'apoJ	9
3.2. Caracterització de l'apoJ	9
3.2.1 Quantificació proteica	9
Autoanalitzador Cobas	9
Assaig de BCA	10
ELISA.....	10
3.2.2 Caracterització electroforètica	10
Electroforesis SDS-PAGE	10
Tinció de Coomassie	11
Tinció de glicoproteïnes	11
Transferència	11
Tinció de Ponceau.....	12
Western blot	12

3.3.	Desglicosilació d'apoJ	12
3.3.1	PNGasa F	13
3.3.2	Neuraminidasa	13
3.3.3	Endoglicosilasa H.....	13
3.4.	Separació de lipoproteïnes de una mescla de sèrums	13
3.5.	Assaig d'agregació de la LDL	14
3.6.	Assaig d'unió de l'apoJ a la LDL	15
4.	RESULTATS I DISCUSIÓ	16
4.1.	Expressió d'apoJ en les cèl·lules HEK293T	16
4.2.	Purificació d'apoJ per cromatografia per afinitat.....	17
4.3.	Deglicosilació in vitro de l'apoJ	19
4.4.	Assajos d'agregació de LDL.....	22
4.5.	Assajos d'unió de l'apoJ a la LDL.....	25
5.	CONCLUSIONS.....	27
6.	LIMITACIONS I ASPECTES PENDENTS	27
7.	BIBLIOGRAFIA	28

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Introducció general a l'aterosclerosi

Les malalties cardiovasculars (ECV) són la causa principal de mortalitat a tot el món, responsable d'aproximadament 17.9 milions de morts cada any, segons dades de l'Organització Mundial de la Salut. Entre aquestes malalties, la malaltia ateroscleròtica constitueix la base patològica més comuna, essent el procés responsable de la formació de les plaques ateroscleròtiques que poden provocar esdeveniments com l'infart de miocardi o l'ictus isquèmic (1). Està causada per múltiples factors de risc, tant genètics com ambientals, com són la *diabetes mellitus*, la hipercolesterolèmia, la hipertensió arterial, el tabaquisme, l'alimentació i el sedentarisme (2,3).

L'aterosclerosi és considerada una patologia inflamatòria vascular crònica causada en part per les interaccions de les lipoproteïnes aterogèniques amb les cèl·lules de la paret vascular com són les cèl·lules endotelials, les cèl·lules musculars llises, monòcits/macròfags, limfòcits i mastòcits (4). Aquestes lesions ateroscleròtiques suposen un engruiximent de la paret arterial majoritàriament per una acumulació de colesterol que comporta el taponament de l'artèria, obstruint el flux sanguini impedit així l'aportació de nutrients i oxigen al teixit. Si aquesta obstrucció es dona en l'artèria coronària que irriga el múscle cardíac, provoca l'infart agut de miocardi.

L'aterosclerosi no es pot revertir completament una vegada ha ocorregut, però fer canvis en l'estil de vida i tractar els nivells de colesterol pot ajudar a prevenir i reduir el procés d'acumulació lipídica, fent que les probabilitats de patir un accident vascular disminueixin considerablement (5). El tractament actual més usual i exitós són les estatines, uns inhibidors de la síntesi de colesterol endogen mediada per la HMG-CoA reductasa tenint efectes antiinflamatoris pleiotròpics més enllà, encara que s'estan investigant noves dianes terapèutiques antiinflamatòries i altres hipolipemians (6).

1.2. Bases patofisiològiques de l'aterosclerosi

1.2.1. Mecanismes moleculars i cel·lulars

Després d'aquesta visió general de l'aterosclerosi com a malaltia sistèmica, és important comprendre els mecanismes cel·lulars i moleculars que intervenen en el desenvolupament de la lesió ateromatosa.

La disfunció endotelial s'ha identificat com l'inici i l'esdeveniment clau del progrés de l'aterosclerosi, degut a una pèrdua de la capacitat de l'endoteli de modular el seu comportament fisiològic. L'endoteli és un òrgan que juga un paper important en la regulació del líquid intracel·lular i de la permeabilitat cel·lular controlant el pas de substàncies, modulant el to vascular i la

angiogènesis. Aquesta situació provoca canvis en l'estrès de la paret i en l'expressió de proteïnes a la superfície endotelial que intervenen en l'adhesió i l'activació de cèl·lules inflamatòries, generant dany vascular (7).

Una vegada l'endoteli es torna disfuncional, es dona un augment de la permeabilitat vascular i s'incrementa l'entrada de lipoproteïnes circulants, principalment de la lipoproteïna de baixa densitat (LDL). Això causa que les LDL es modifiquin i s'agreguin més fàcilment a l'espai subendotelial, un dels principals factors que promouen més disfunció i la lesió de les cèl·lules endotelials i l'expressió de molècules d'adhesió leucocitària. Aquestes molècules faciliten la unió i la migració de monòcits a la capa subendotelial (íntima arterial), on es diferencien a macròfags. Aquest fet, provoca un augment en la captació massiva de les LDL modificades per part dels macròfags, els quals esdevindran cèl·lules escumoses contribuint a la formació de l'estria lipídica (8).

Amb el temps, aquestes estries poden evolucionar cap a lesions més avançades, i la formació de la placa ateromatosa. La progressió d'aquesta estria grassa implica el paper d'una altre tipus cel·lular, les cèl·lules musculars llises (SMC). Aquestes canvien el seu fenotip contràctil a un migratori i secretor. L'evolució de la lesió provoca la migració d'aquestes cèl·lules a la capa íntima i l'augment de la seva producció de matriu extracel·lular i altres proteïnes que promouen la remodelació vascular externa i la estabilització de la lesió. La placa avançada presenta un nucli necròtic, resultat de l'apoptosi dels macròfags i SMC, ric en lípids, junt amb una eferocitosi defectuosa. És a dir, existeix una acumulació de restes cel·lulars en els teixits per un defecte en l'eliminació de les cèl·lules mortes per parts dels macròfags i altres cèl·lules fagocítiques. En aquest moment, probablement es donarà un afebliment de la capa fibrosa per un augment de la degradació per metal·loproteïnases de la matriu secretades per les cèl·lules inflamatòries. Totes aquestes característiques poden conduir a la ruptura de la placa, a la posterior exposició del nucli necròtic al flux sanguini i per tant, acabar promovent la trombosis luminal aguda (9).

1.2.2. Lipoproteïnes plasmàtiques i aterosclerosi

Les lipoproteïnes plasmàtiques són estructures complexes formades per un nucli intern hidrofòbic compost per lípids hidrofòbics apolars com els triglicèrids i els èsters de colesterol. El nucli està envoltat per una capa externa hidrofílica polar de colesterol lliure, fosfolípids i apolipoproteïnes (**Figura 1**). Aquestes últimes són essencials per al seu assemblatge i per a la realització de les seves funcions biològiques (10).

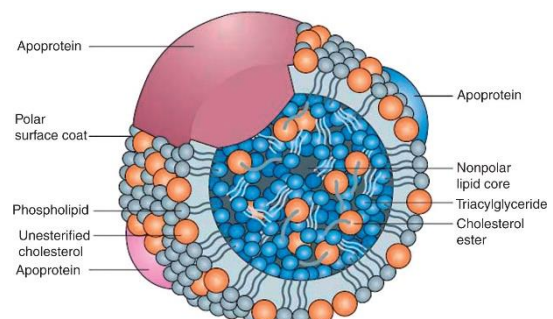


Figura 1. Estructura d'una lipoproteïna. Font: Fleischer, J. (25)

Les lipoproteïnes es classifiquen segons la seva mida, densitat i composició en diversos tipus: els quilomicrons, els quilomicrons remanents, les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), les lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL), les LDL, la lipoproteïna (a) (Lp(a)) i les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL).

Les LDL representen el producte final de la metabolització de les VLDL i les IDL, quan aquestes han estat processades per la lipoproteïna lipasa i han perdut la major part dels seus triacilglicèrids. La principal funció de les LDL és el transport de colesterol en circulació des del fetge cap als teixits perifèrics per a l'aportament de colesterol als teixits per la síntesi d'hormones esteroidals i la formació de membranes. A nivell estructural, presenten una monocapa superficial composta de fosfolípids, colesterol lliure i una única molècula d'apolipoproteïna (apo) B-100, que actua com a lligand per al receptor de la LDL (11,12).

Es coneguda la relació entre les concentracions de colesterol total i colesterol de LDL i risc cardiovascular (13). Segons *Vegunopal et al. (2023)*, existeix una relació positiva entre el colesterol LDL, la seva composició i el risc de patir malalties cardiovasculars ateroscleròtiques; concretament, associat a la presència de les partícules de LDL petites i denses (sdLDL) (14). Nombrosos estudis han evidenciat que aquestes sdLDL presenten una major capacitat aterogènica, fins i tot quan el pacient presenta nivells estàndards de LDL total. Primer de tot, les sdLDL presenten una menor afinitat pel receptor de la LDL, fet que en dificulta la recaptació hepàtica i manté les LDL en circulació. A més, aquestes sdLDL presenten una major susceptibilitat tant a oxidar-se com a agregar-se per la seva composició, pel que presenten una major afinitat pels proteoglicans que es troben a la capa subendotelial, provocant així una major acumulació de les partícules carregades de colesterol a la paret arterial (14,15).

Contràriament, les HDL presenten propietats antiaterogèniques mitjançant diversos mecanismes: redueixen la inflamació a través de l'eflux del colesterol, prevenen l'activació endotelial i milloren la producció de NO per a mantenir la integritat de la barrera, inhibeixen la degradació de la matriu extracel·lular de la capa fibrosa, impulsen la conversió als macròfags M2 antiinflamatoris i prevenen la oxidació de les LDL (16).

Però més enllà de la concentració, la composició i altres característiques qualitatives d'aquestes lipoproteïnes determinaran la seva funcionalitat i per tant el seu paper a l'aterosclerosi (17). Tanmateix, apolipoproteïnes minoritàries presents en les LDL i HDL també poden tenir un paper molt important en la seva capacitat pro- o anti-aterogènica. Específicament, es coneix que l'apolipoproteïna J (apoJ), també intervé en la modulació del risc cardiovascular a través de certs mecanismes moleculars com veurem en el següent apartat.

1.3. Apolipoproteïna J (apoJ)

L'apoJ o clusterina (CLU), és una proteïna multifuncional codificada pel gen *CLU*, ubicat en el cromosoma 8p21-p12, i àmpliament expressada als teixits humans. Aquesta proteïna destaca per la seva participació en processos de transport lipídic, protecció cel·lular i regulació de l'apoptosi. A més, és coneguda pel seu paper de xaperona, un grup de proteïnes que tenen un paper clau al control de qualitat de proteïnes, ja que s'uneixen a les proteïnes mal plegades, be per evitar la seva desnaturalització, be per facilitar-ne el seu aclariment plasmàtic.

La síntesi d'aquesta proteïna es dona a partir d'una forma precursora (psCLU) que es troba en el citoplasma. Al reticle endoplasmàtic experimenta N-glicosilació que té lloc en sis residus d'asparagina per a formar la preproteïna en una isoforma madura, el que resulta en conjunt en un augment de pes del 30%, passant de una massa proteica de 50 kDa a una massa final de 70-80 kDa (18,19). La isoforma secretada (sCLU), també anomenada apoJ, consisteix en un complex de glicoproteïna heterodimèric compost per dues cadenes polipeptídiques connectades per enllaços disulfur. Es troba distribuïda en molts teixits, així com també en fluids corporals com la sang o l'orina. Pot anar transportada unida a lipoproteïnes, a altres proteïnes com l'albumina o en forma lliure.

Cal destacar que la glicosilació de l'apoJ podria tenir una paper important, no només com a component estructural de la glicoproteïna, sinó com a modulador de la seva funcionalitat i la seva capacitat per a unir-se a les lipoproteïnes, tema en que es centrarà el present TFM.

1.3.1. Funcions biològiques

L'apoJ és considerada una xaperona extracel·lular no clàssica, ja que estabilitza proteïnes mal plegades o desnaturalitzades fora de la cèl·lula, evitant-ne l'agregació irreversible i afavorint la seva eliminació mitjançant receptors cel·lulars.

Degut a la seva estructura i composició, l'apoJ intervé en molts processos cel·lulars. L'apoJ està associada a diversos processos patològics, ja que es troba alterada o induïda en malalties degeneratives renals i varies condicions neurodegeneratives, incloent scrapie, la malaltia d'Alzheimer, epilèpsia i malaltia de Pick, així també com en malalties cardiovasculars com l'aterosclerosi (19).

Com a xaperona funcional que és, s'ha vist que l'apoJ forma complexos solubilitzats amb proteïnes sotmeses a estrès per calor o per reducció, inhibint la seva precipitació (**Figura 2**). Per tant, s'ha demostrat que la clusterina exògena pot protegir a certes línies cel·lulars de l'estrès oxidatiu i de l'estrès tèrmic (18).

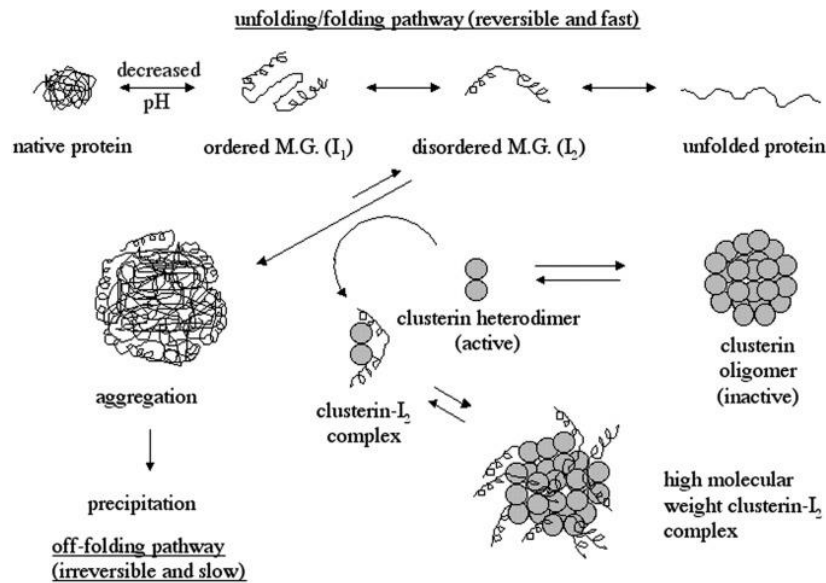


Figura 2. Esquema d'un mecanisme d'acció de l'apoJ com a xaperona extracel·lular no clàssica en cas d'una disminució de pH. Font: Poon, S. (26)

Per últim, l'apoJ es troba implicada en el transport lipídic, ja que s'associa a les HDL. Es creu que l'apoJ es transporta en sang com a dímers actius i s'uneix a algunes proteïnes com l'albumina o el fibrinogen. No obstant, una part substancial de l'apoJ plasmàtica viatja unida a les lipoproteïnes, en una proporció que oscil·la entre 10 i el 50 depenent dels autors (20). Principalment, s'uneix a la HDL (20) mantenint les seves propietats antiaterogèniques, principalment estabilitzant altres proteïnes de la HDL, com la apoA-I, la paraoxonasa o la PAF-AH (acetilhidrolasa del factor plaquetària). Més tard, mitjançant uns anàlisis proteòmics es va revelar que l'apoJ també s'uneix a les LDL (21), evitant-ne la seva agregació (22) i tenint un paper important en la aterogènesi.

1.4. Paper de l'apolipoproteïna J en l'aterosclerosi

Com ja s'ha introduït en l'apartat anterior, l'apoJ o clusterina és una proteïna multifuncional amb un paper rellevant en l'evolució de l'aterosclerosi. Diversos estudis apunten que la seva acció pot ser protectora, actuant en diferents etapes del procés aterogènic i modulant la inflamació, l'estrès oxidatiu i l'estabilitat de la placa.

Segons uns estudis experimentals recents, la pèptids mimètics derivats de la apoJ podria inhibir la formació de la placa ateromatosa i també augmentar l'estabilitat de les plaques vulnerables en ratolins amb aterosclerosi, el qual és de gran importància per a prevenir esdeveniments cardiovasculars com l'infart de miocardi o l'ictus isquèmic (23). A més, també es va observar que l'apoJ podria inhibir l'alliberació de factors inflamatoris pro-aterogènics per part de les cèl·lules inflamatòries vasculars, contribuint així a una menor activació de la resposta immunitària innata dins la lesió (23).

D'altra banda, s'ha descrit que l'apoJ exerceix un paper directe sobre la dinàmica de les lipoproteïnes. En estudis in vitro, s'ha comprovat que l'apoJ s'uneix a les partícules de LDL i actua com a inhibidor de la seva agregació. Quan es va induir l'agregació de la LDL per diferents mecanismes, la presència d'apoJ va retardar significativament l'agregació de les partícules de la LDL, a part d'una disminució de la degradació de l'apoB-100 (22,23).

Tots aquests resultats semblen indicar que efectivament l'apoJ pot tenir un paper protector global en la progressió de la malaltia ateroscleròtica. Tot i això, cal seguir estudiant amb detall els mecanismes moleculars implicats i confirmar aquestes efectes in vivo en humans, ja que la complexitat del procés aterogènic i la variabilitat individual podria afectar als resultats en estudis clínics. La millor comprensió d'aquests mecanismes, concretament l'estudi del paper de la glicosilació de l'apoJ, podria obrir noves perspectives per al desenvolupament de teràpies dirigides a modular l'activitat de l'apoJ o augmentar la seva expressió com a estratègia anti-aterogènica innovadora.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Atès que l'apolipoproteïna J s'ha descrit com una glicoproteïna amb un paper regulador o protector en l'evolució de la malaltia ateroscleròtica, es vol aprofundir en els mecanismes moleculars que podrien intervenir en aquesta funció protectora. Partim de la hipòtesi de que les glicosilacions que presenta l'apoJ poden tenir un paper important en la seva funcionalitat. Concretament, es vol determinar que la glicosilació de l'apoJ és rellevant per a determinar la seva capacitat d'unir-se a la LDL, contribuint així a modular la seva capacitat d'inhibir l'agregació de la LDL.

En base a la hipòtesi exposada, es consideren els següents objectius:

1. Expressar i purificar apoJ humana recombinant en suficient quantitat per als experiments posteriors. S'expressarà apoJ en cèl·lules HEK293T i es purificarà mitjançant cromatografia líquida.
2. Deglicosilar in vitro l'apoJ recombinant amb glicosidases diferents: PNGasa F (deglicosila tots els residus de la cadena de carbohidrats), endoglicosidasa H (deglicosila tots els residus de la cadena de carbohidrats, excepte la primera acetilglucosamina) i neuraminidasa (NMassa, deglicosila únicament l'àcid siàlic terminal de la cadena de carbohidrats)
3. Determinar el paper de la glicosilació de l'apoJ sobre la capacitat d'unió a la LDL i en el manteniment de la seva capacitat de prevenir l'agregació de la LDL

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Obtenció d'apoJ

3.1.1. Cultius cel·lulars

Es van descongelar cèl·lules HEK293T transfectades amb cDNA d'apoJ humana que ens van proporcionar el grup de Malalties Neurovasculars del Institut de Recerca de Vall d'Hebron (Dra. Mar Hernández Guillamon). L'apoJ obtinguda està totalment glicosilada i conté una cua de histidines per permetre la seva purificació (24). Es va posar el contingut del vial de les cèl·lules congelades en un tub falcon amb 10 mL de medi de descongelació (DMEM d'alta concentració de glucosa, amb L-glutamina i piruvat sòdic al 20% sèrum boví fetal (FBS) i al 1% de penicil·lina/estreptomicina (P/S)), per a després centrifugar 5 minuts a 130 g. Es va aspirar el medi i es van resuspendre les cèl·lules amb 2 mL de medi per a cultivar-les en un flascó T75 amb 10 mL de medi de descongelació. Es van afegir 60 µL de Zeocin (500 µg/mL) com a seleccionador positiu de les cèl·lules transfectades, on només aquelles que continguin el plasmidi amb el gen de l'apoJ, prosperaran. Es van incubar a 37°C amb 5% CO₂ i es va fer canvi de medi cada 2 dies. Quan les cèl·lules van estar confluent, es van tripsinitzar amb tripsina-EDTA (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) per tal de desenganxar-les i subdividir-les en 4 flascons T75 mitjançant el mateix procediment de descongelació. Per al manteniment de cèl·lules, va ser suficient amb 1 µL de Zeocin per a mL de medi de cultiu al 10% de FBS.

Quan les cèl·lules van estar confluent, es van passar a un HYPERFlask (Corning Incorporated, REF 10030, Kennebunk, ME, USA) per tal de maximitzar la superfície de cultiu disponible. Aquest tipus de recipient presenta múltiples capes internes que proporcionen una àrea total de creixement cel·lular de 1720 cm², fent que la producció d'apoJ sigui molt més eficient. Per tal de dur a terme aquest procediment, es va preparar una ampolla de medi de 550 mL DMEM amb 10% FBS on es van afegir les cèl·lules ressuspeses. Al cap de 2 dies, es va canviar el medi de cultiu a medi 0.2% de FBS i 1% de P/S. Es va recollir en un eppendorf 1 mL del sobrenedant del medi de cultiu 10% FBS per la determinació posterior de l'apoJ mitjançant ELISA.

3.1.2. Purificació d'apoJ

Per tal de purificar l'apoJ del medi de cultiu de l'HYPERFlask, es van utilitzar columnes HiScreen Ni FF amb un cromatògraf NGC 10 Medium-Pressure Chromatography Systems (Bio Rad)). Es tracta d'una cromatografia d'afinitat, en la qual l'apoJ quedarà retinguda a la columna gràcies a una cua d'histidines de l'apoJ, que s'uneix al níquel contingut en la resina de la columna. Abans de començar el procés de purificació, es va filtrar per 0.45 µm tant el tampó d'unió com el d'elució, així com també el sobrenedant que es volia purificar. Inicialment, es va equilibrar la columna amb el tampó d'unió (0.5 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.4). Una vegada equilibrada es va injectar a

la columna un volum variable de medi (fins a 500 ml) a un flux de 0.5 ml/min. Posteriorment es va eluir la mostra mitjançant un gradient progressiu de concentració, aplicant el tampó d'elució (0.5 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 0.5 M Imidazol, pH 7.4) per tal d'eluir les fraccions que continguin l'apoJ. La elució dels pics de proteïna es va monitoritzar mesurant la absorbància a 280 nm. Es van assajar diferents gradients, que es mostren al apartat de Resultats.

3.1.3. Diàlisi

Després de dur a terme el procés de purificació, les fraccions que contenien apoJ, van ser reunides i dialitzades per tal d'eliminar l'Imidazol i altres components del tampó d'elució que podrien interferir en etapes posteriors del procés experimental.

Es van col·locar totes les fraccions juntes a la membrana de diàlisi, i es va posar dins al tanc de diàlisi amb 2L del tampó, en aquest cas PBS 1X (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.0065 M Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0.0015 M KH₂PO₄), en agitació a 4°C durant tota la nit. És recomanable fer 2-3 canvis de tampó cada 2 hores aproximadament.

Per a realitzar les deglicosilacions amb Neuraminidasa i Endoglicosilasa H (Sigma Aldrich), es va realitzar una diàlisi addicional en PBS 1X suplementat amb 0.058 g CaCl₂, amb un pH de 5,5, ja que el pH òptim d'aquests enzims es àcid. En aquest cas, degut al menor volum, es va realitzar la diàlisi, prèviament a l'experiment, amb columnes de gel filtració P2 (CentriPure Columns, Zetadex Gel Filtration columns, EmpBIOTECH). En aquest cas, cal primer equilibrar-les passant 5 mL del tampó que nosaltres necessitem per a la diàlisi. Després, s'aplica la mostra i el volum de tampó restant fins a 350 µL, que es el volum màxim de les columnes. Després, es recull la mostra en el volum necessari, que depèn del volum inicial, per a tal de no diluir més de dues vegades el volum de mostra inicial.

3.1.4. Concentració d'apoJ

Per tal de concentrar la mostra d'apoJ, es van utilitzar filtres de ultracentrífuga de 50 kDa (Amicon Ultra 4), els quals primer de tot es van rentar amb aigua centrifugant-los a 1000 xg durant 15 minuts. Seguidament, es va posar la mostra d'apoJ en el centricons i es van centrifugar en les mateixes condicions fins arribar a obtenir el volum que es necessita per fer els experiments.

3.2. Caracterització de l'apoJ

3.2.1 Quantificació proteica

Autoanalitzador Cobas

La concentració d'apoJ no es va estimar de manera directa, sinó mesurant la concentració de proteïna mitjançant mètode comercial adaptat a l'autoanalitzador Cobas 6000/c501 (Roche Diagnostics, Basel) utilitzant el reactiu de proteïna total en orina (TPU3, Roche). L'apoB, es va

determinar mitjançant mètode immunoturbidimètric (apoB, Roche). L'albumina es va determinar amb el kit de albumina en orina (ALBU2, Roche).

Assaig de BCA

Amb la finalitat de quantificar l'apoJ mitjançant un mètode alternatiu, es va dur a terme l'assaig de BCA (Bicinchoninic Acid Assay) utilitzant el sistema PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), seguint les instruccions del fabricant.

ELISA

La quantificació específica de l'apoJ, es va dur a terme mitjançant ELISA. En aquest cas, es va realitzar un ELISA tipus "sandvitx" indirecte, on es posa a la placa l'anticòs de captura en el qual s'unirà l'antigen de la mostra que nosaltres afegirem. Després, es va afegir l'anticòs biotinilat, el qual reconeix específicament la nostra mostra. Tot seguit, es va afegir l'estreptavidina-HRP, unint-se a l'anticòs biotinilat (tipus indirecte). D'aquesta manera, a l'afegir la solució de substrat, reacciona amb l'enzim peroxidasa i emet llum que es pot mesurar i quantificar a l'espectrofotòmetre (Beckman Coulter AD340) a 490 nm. S'ha utilitzat el sistema DuoSet[®] ELISA Development System (R&D Systems), seguint les instruccions del fabricant.

3.2.2 Caracterització electroforètica

Electroforesis SDS-PAGE

Es van realitzar gels d'1 mm de gruix de poliacrilamida al 10% en un sistema Mini Protean Tetra Cell System (BioRad) (*Taula 1*). Es va utilitzar el tampó Tris-Glicina amb SDS 1X (Tris 24 mM, Glicina 190 mM, SDS 0.1%, pH 8.8), en condicions desnaturalitzants per a què les proteïnes perdin la seva estructura i migrin exclusivament per la seva mida. Per a preparar les mostres, es va afegir Laemmli buffer 6X (proporció 5:1 mostra-buffer). En el cas de condicions reductores, on es vol que es trenquin els ponts disulfur de les proteïnes, es preparen 25 µL de mostra més els 5 µL de Laemmli buffer amb 9% β-mercaptoetanol i es va bullir la mostra 5 minuts. Es van carregar 30 µL de mostra al gel, i 10 µL de patró de pes molecular. L'electroforesi es va fer a 30V 15 minuts i després a 100V dos hores.

Taula 1. Volums corresponents de cada component per a realitzar gels en condicions desnaturalitzants d'1 mm de poliacrilamida al 10%.

Resolving gel (gel de separació) al 10%		Stacking gel (gel d'apilament) al 4%	
<i>Reactiu</i>	<i>Volum</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Volum</i>
Acrilamida-Bisacrilamida 30% (BioRad)	2.7 mL	Acrilamida-Bisacrilamida 30% (BioRad)	0.33 mL
Tris (-HCl) 1.5 M pH 8.8 (Solució A)	2 mL	Tris (-HCl) 0.5 M pH 6.8 (Solució B)	0.31 mL
SDS 10%	0.08 mL	SDS 10%	0.028 mL
dH ₂ O	3.22 mL	dH ₂ O	1.83 mL
TEMED 99%	8 µL	TEMED 99%	2.5 µL
APS 10%	50 µL	APS 10%	25 µL

Tinció de Coomassie

Es van tenyir els gels mitjançant el blau de Coomassie, (40% metanol, 10% àcid acètic i 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250) durant uns 30 minuts aproximadament a temperatura ambient i agitació. Seguidament, es van fer rentats successius per a eliminar el blau de Coomassie amb una solució destenyidora (40 % metanol, 10% àcid acètic i 1% glicerol)) fins tenir una imatge clara de les bandes de proteïna.

Tinció de glicoproteïnes

La tinció de glicoproteïnes es va realitzar utilitzant el kit comercial PierceTM Glycoprotein Staining kit (Thermo Fisher Scientific), seguint les instruccions del fabricant, amb certes modificacions. En concret, els volums utilitzats es van reduir a la meitat, i el temps d'incubació amb la tinció de glicoproteïnes es va estendre de 15 minuts a 30 minuts, així com també es va estendre de 5 a 10 minuts el temps d'incubació amb la solució reductora.

Transferència

Per a dur a terme la transferència de les proteïnes del gel electroforètic es va utilitzar una membrana de nitrocel·lulosa de 0,2 µm. Es va usar el tampó de transferència Tris-Glicina amb SDS 0.5% suplementat amb metanol (Tris 24 mM, Glicina 190 mM, SDS 0.05%, 20% metanol, pH 8.8). Tot seguit, es va preparar el casset posant la membrana en contacte amb el gel, flanquejant aquests dos amb dos papers de filtres i fent un sandvitx amb una esponja a banda i banda del paper de filtre. Es va fer la transferència a 30V durant 2 hores en un sistema Mini Protean Tetra Cell System (BioRad).

Tinció de Ponceau

És una tinció control, en la qual es va poder comprovar si les proteïnes del gel s'havien transferit bé a la membrana, tenyint la membrana amb el reactiu de Ponceau fins a cobrir la membrana (5% d'àcid acètic glacial, 0.1% de tint vermell Ponceau i aigua fins a arribar 250 mL) màxim 15 minuts per a que no es saturi. Es va treure la solució, es va fer un rentat ràpid amb aigua i després rentats successius de 5 minuts amb TBS-T (TBS 1x al 0.1% de Tween 20) fins que ja no va quedar tinció.

Western blot

Es va realitzar el bloqueig de la membrana per a evitar unions específiques amb EveryBlot Blocking buffer (BioRad) durant 15 minuts. Passat aquest temps, es va realitzar incubació amb anticòs primari policlonal de cabra anti-apoJ (dilució 1/400, R&D) primer durant 2h a 37°C, i després incubant a temperatura ambient durant tota la nit. L'endemà, es va recuperar l'anticòs primari i es realitzen dos rentats ràpids i tres rentats de 10 minuts amb TBS-T. Seguidament, s'incuba amb l'anticòs secundari anti-cabra (1/20.000) durant 45 minuts a temperatura ambient. Per últim, es realitzen 2 rentats ràpids i 4 rentats de 10 minuts amb TBS-T abans de obtenir la imatge amb LI-COR Odyssey M a 700 nm.

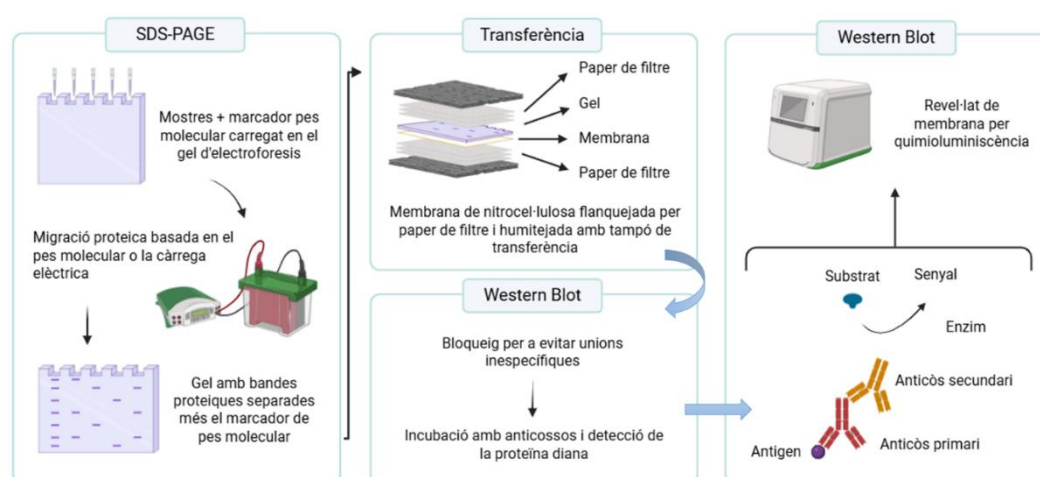


Figura 3. Explicació esquemàtica del procés d'electroforesis, transferència i western blot. Creat amb BioRender.

3.3. Desglicosilació d'apoJ

Per tal de dur a terme l'objectiu de desglicosilar l'apoJ, es van utilitzar diferents enzims, que tallen la cadena de carbohidrats a diferent punts, d'acord amb la figura següent:

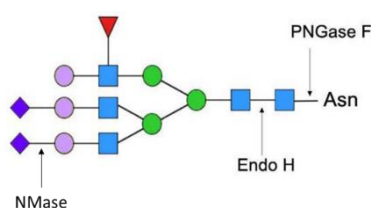


Figura 4. Punts on talla cada enzim experimentat en la cadena hidrocarbonada de la glicosilació de l'apoJ.

3.3.1 PNGasa F

És una glicosidasa que catalitza la escissió dels oligosacàrids enllaçats per nitrogen de les asparagines, i provoca la desglicosilació completa de la cadena hidrocarbonada. L'enzim es va resuspendre en 2mL del tampó 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl i 1 mM EDTA, a un pH de 7,5. Seguidament, es va incubar la apoJ purificada i dialitzada en PBS amb diferents concentracions de l'enzim (0.005 U/ μ g, 0.010 U/ μ g, 0.020 U/ μ g, 0.030 U/ μ g, 0.040 U/ μ g, 0.060 U/ μ g) incubant unes 20 h aproximadament a 37°C. El grau de desglicosilació es va valorar per electroforesi en condicions desnaturalitzants (observant la pèrdua de pes molecular) i tinció de glicoproteïna (observant la disminució de tinció).

3.3.2 Neuraminidasa

És una glicosidasa que degrada l'àcid siàlic terminal de la cadena hidrocarbonada. En aquest cas, la mostra es va dialitzar addicionalment amb el tampó especificat en l'apartat 3.1.3, ja que requereix pH àcid. Seguidament, es va incubar la mostra dialitzada amb diferents concentracions de l'enzim (0.333 mU/ μ g, 0.667 mU/ μ g, 1.333 mU/ μ g) durant unes 20 hores a 37°C. El grau de glicosilació en l'apoJ es va valorar per electroforesi en condicions no desnaturalitzants sense SDS. En aquest cas, la pèrdua de pes es molt baixa i no es pot detectar en SDS-PAGE ni tampoc per tinció de glicoproteïna. En canvi, com que el àcid siàlic te càrrega elèctrica negativa, la seva mobilitat en condicions no desnaturalitzants estarà reduïda, i tindrà menys mobilitat electroforètica que la apoJ nativa.

3.3.3 Endoglicosilasa H

És una glicosidasa amb funció similar a la PNGasa F, excepte que el primer residu de carbohidrat (normalment N-acetilglucosamina) roman unit a la proteïna. En aquest cas, la mostra es va dialitzar addicionalment amb el tampó especificat en l'apartat 3.1.3. Seguidament, es va incubar la mostra dialitzada amb una concentració de 0.400 mU/ μ g de l'enzim durant unes 24 i 48 hores aproximadament a 37°C. El grau de desglicosilació es va mesurar per electroforesi en condicions desnaturalitzants i tinció de glicoproteïna.

3.4. Separació de lipoproteïnes de una mescla de sèrums

Es van aïllar lipoproteïnes de una mescla de sèrums de voluntaris sans per poder estudiar la seva unió a l'apoJ. Es va filtrar i seguidament, es va dissoldre l'inhibidor de proteases (es posa una pastilla cada 100 mL, Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics).

A continuació, considerant que el sèrum té una densitat de 1.006 g/mL es va calcular, a partir del volum inicial de sèrum, la quantitat de KBr necessari per a portar la mostra a la densitat de la lipoproteïna que es vol aïllar utilitzant la següent fórmula:

$$\text{grams de KBr} = \frac{\text{volum (mL)} \times (\text{densitat final} - \text{densitat inicial})}{1 - (0,312 \times \text{densitat final})}$$

Primer es va separar les lipoproteïnes VLDL+IDL ajustant el sèrum a densitat 1.019 g/ml. Es van afegir els grams de KBr al pool i es va barrejar suaument. Aleshores, es va repartir el volum de pool en tubs d'ultracentrífuga de 20 mL (en cada un, màxim posar 18 mL de pool) i es va superposar una solució d'aquesta densitat fins a 20 mL. Per últim, es van posar els tubs equilibrats a la ultracentrífuga a 8°C i 36.000 rpm, mínim durant 20 hores. Posteriorment, es va aïllar VLDL+IDL mitjançant aspiració la lipoproteïna del sobrenedant.

L'infranedant resultant es va transferir a una proveta, on després es va afegir la quantitat de KBr corresponent a la densitat de la LDL (1.063 kg/L). Es torna a repetir el mateix procediment explicat anteriorment.

3.5. Assaig d'agregació de la LDL

Per tal d'avaluar si l'apoJ presenta algun efecte sobre l'agregació de la LDL, es van dur a terme assajos d'agregació de la LDL, amb absència o presència d'apoJ, tant de la forma nativa com de les diferents formes deglicosilades.

L'agregació de la LDL va ser induïda mitjançant incubació amb SMasa. Per a realitzar-ho, es va utilitzar LDL total aïllada mitjançant ultracentrifugació, tal com s'explica en l'apartat anterior. La LDL es va dialitzar en PBS, per a evitar la presència de EDTA, ja que l'enzim SMasa requereix calci i magnesi per a la seva activitat enzimàtica. La LDL (0.2 g apoB/L) es va incubar amb la SMasa (0.5 U/mL) durant 2 hores a 37°C amb agitació suau (ràtio final 38 apoB/mU SMasa). A aquesta barreja, es van afegir diferents concentracions d'apoJ nativa i d'apoJ amb diferents graus de deglicosilació, tal com s'indica en els experiments descrits en resultats, i també es va afegir Ca i Mg. La taula següent mostra les condicions d'un experiment tipus.

Taula 2. Condicions experimentals d'un experiment representatiu per a l'assaig d'agregació de la LDL. La taula mostra els volums en µL de cada component que es van afegir a la mescla.

	LDL (0,4 µg/µL)	apoJ (0,4 g/L)	PBS	SMasa (0.5 U/mL)	CaCl ₂ (0.1 M)	MgCl ₂ (0.5 M)
Control negatiu	200	0	40	0	0	0
Control positiu	200	0	28	4	4	4
apoJ nativa amb apoJ	200	7,2	20,8	4	4	4
apoJ deglicosilació baixa	200	7,2	20,8	4	4	4
apoJ deglicosilació mitja	200	7,2	20,8	4	4	4
apoJ deglicosilació alta	200	7,2	20,8	4	4	4

El nivell d'agregació de la LDL es va quantificar mitjançant cromatografia en gel filtració en una columna Superosa 6 Increase 5/150 GL (Cytiva), en un sistema cromatogràfic NGC (BioRad). Es van injectar 100 µL de cada una de les barreges i explicades a la **Taula 2**. L'elució es va monitoritzar a 280 nm i es van integrar els pics corresponents a LDL agregada i a LDL monomèrica.

En paral·lel, es va valorar l'agregació de la LDL monitoritzant l'increment d'absorbància a 450 nm en un espectrofotòmetre de plaques Synergy HT (Biotek).

3.6. Assaig d'unió de l'apoJ a la LDL

Per a avaluar si el nivell de glicosilació afecta a la capacitat de l'apoJ d'unir-se a la LDL es van realitzar assajos d'unió. Per a això, la LDL es va incubar en presència d'apoJ amb diferents graus de glicosilació durant 4 hores a 37°C en agitació molt suau. Es van assajar diferents ratios molars de apoJ/apoB com s'indica al apartat de Resultats. Després d'això, es va separar la LDL de l'apoJ no unida mitjançant ultracentrifugació, utilitzant una densitat de flotació de 1.063 kg/L (veure apartat 3.4). Es van prendre 200 µL del sobrenedant (conté la LDL i l'apoJ unida) i 200 µL del pellet (conté l'apoJ no unida). La presència d'apoJ es va estimar mitjançant western blot, i es va congelar una alíquota per a la futura determinació d'apoJ mitjançant ELISA.

4. RESULTATS I DISCUSIÓ

4.1. Expressió d'apoJ en les cèl·lules HEK293T

Per tal de confirmar l'expressió de l'apoJ humana recombinant en les cèl·lules HEK293T transfectades amb el gen humà que codifica per a la isoforma secretada (sCLU), es va recol·lectar el medi de cultiu cel·lular de l'HYPERFlask i es va determinar la presència específica de l'apoJ mitjançant western blot. A més, també es va realitzar la tinció de proteïna mitjançant el blau de Coomassie. Es va realitzar l'experiment en condicions reductores i no reductores, per tal d'observar les formes monomèriques i dimèriques de l'apoJ.

Tal com es pot observar en la **Figura 5**, es detecta l'expressió de l'apoJ en el medi de cultiu de les cèl·lules HEK293T, mentre que no es detecta en el medi de control DMEM al 0.1% de FBS sense cèl·lules. En el western blot condicions reductores, observem una banda prominent al voltant dels 35 kDa, corresponent al monòmer de l'apoJ després de que s'hagin trencat els ponts disulfur. En canvi, sota condicions no reductores, apareix una banda al voltant dels 80 kDa corresponent a l'apoJ en la seva conformació heterodimèrica.

A més, els resultats obtinguts en el western blot es corroboren de la mateixa manera en la tinció per blau de Coomassie, on es torna a observar expressió d'apoJ només en els carrils on tenim el medi de cultiu de les cèl·lules HEK293T, tant en condicions reductores com no reductores.

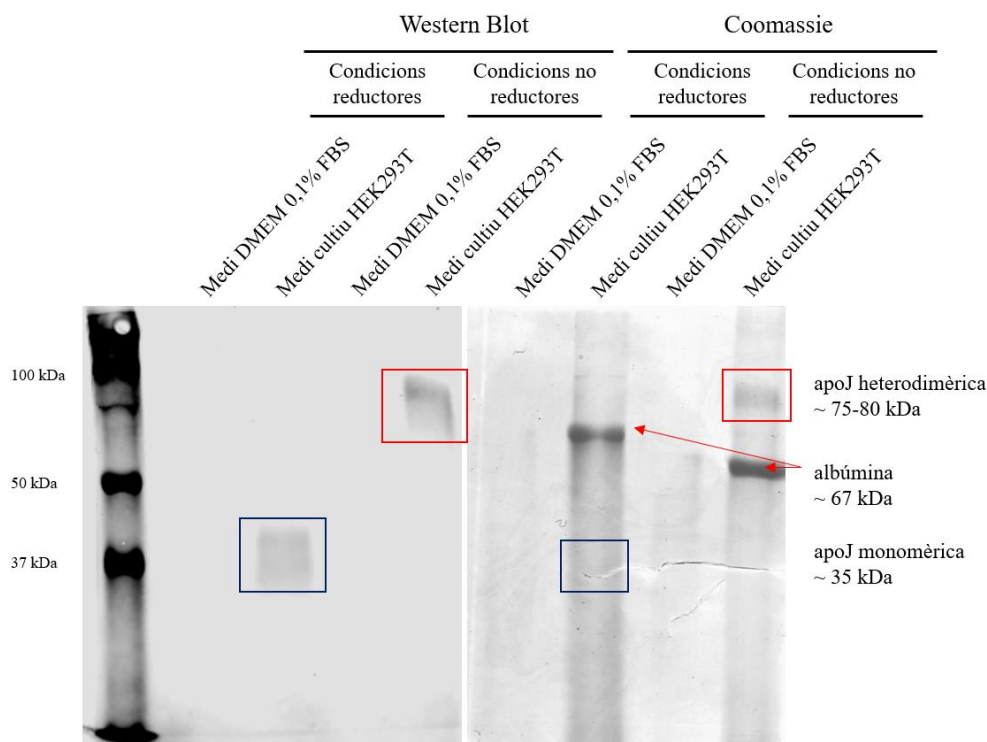


Figura 5. Detecció de l'expressió de l'apoJ humana recombinant en cèl·lules HEK293T. L'expressió es detecta en condicions reductores i condicions no reductores, tant per Western blot (esquerra) com per tinció de blau de Coomassie (dreta). S'analitza la seva expressió respecte el medi DMEM al 0.1% de FBS sense cèl·lules com a control. Els requadres vermells indiquen les bandes corresponents a l'apoJ heterodimèrica i els requadres blau marí indiquen les bandes corresponents a l'apoJ monomèrica. Les fletxes vermelles senyalen les bandes corresponents a l'albumina.

Amb aquests resultats, podem dir que l'apoJ s'expressa correctament, essent aquesta secretada a l'exterior cel·lular en la seva conformació nativa amb els enllaços disulfur.

4.2. Purificació d'apoJ per cromatografia per afinitat

Un cop confirmada l'expressió i la secreció d'apoJ en el medi de cultiu de cèl·lules HEK293T, es va procedir a la purificació mitjançant cromatografia líquida per tal d'obtenir la proteïna en estat funcional i altament purificada. A la **Figura 6**, es mostren diferents gradients de tampó Imidazol que es van utilitzar per optimitzar la purificació de l'apoJ. El tercer gradient es el més eficient i el que vam utilitzar a la resta d'experiments.

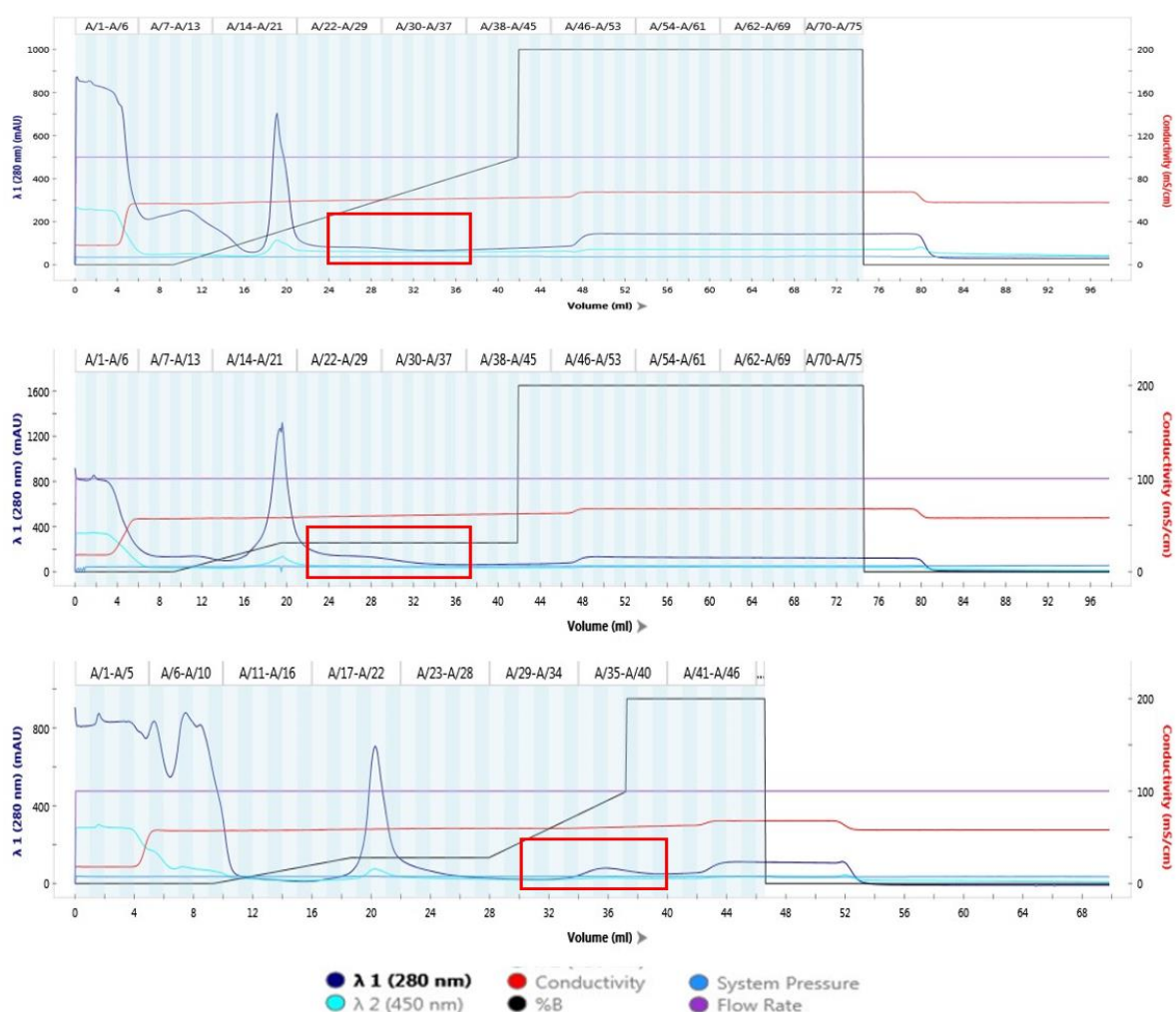


Figura 6. Perfil del gradient d'Imidazol (tampó d'elució) es van utilitzar per a optimitzar la tècnica de purificació. Els requadres vermells indiquen el segon pic corresponent al pic d'elució de l'apoJ potencialment purificada, donat per l'absorbància a 280nm.

En aquest perfil es poden distingir dos pics d'absorbància: un primer pic més alt, que correspon a les proteïnes no unides a la columna que s'elueixen en el primer augment del % de tampó d'elució. I després, s'observa un segon pic, ressaltat amb vermell, de menor intensitat que correspon a l'apoJ potencialment purificada que estava unida al níquel de la columna gràcies a la seva cua d'histidines, i que elueix quan s'aplica l'últim augment del % de tampó d'elució.

Per a verificar que realment aquest pic correspon a l'apoJ i avaluar-ne la seva puresa, es va realitzar un SDS-PAGE amb tinció de blau de Coomassie per a detectar tota la proteïna que hi havia en les diferents fraccions que vam recollir corresponents al segon pic d'absorció en condicions reductores i no reductores (**Figura 7**). S'observa clarament la presència d'una banda al voltant dels 80 kDa en condicions no reductores, la qual coincideix amb la conformació heterodimèrica de l'apoJ, i una banda d'uns 35 kDa en condicions reductores, corresponent al monòmer de l'apoJ. Aquestes bandes apareixen principalment en les fraccions corresponents al segon pic d'elució (fraccions 94-104) i les quals es troben ressaltades en vermell. En canvi, en les fraccions recollides del primer pic (fraccions 69-78) que estan ressaltades en blau marí, no s'observen bandes de massa intensitat corresponents a la mida d'apoJ.

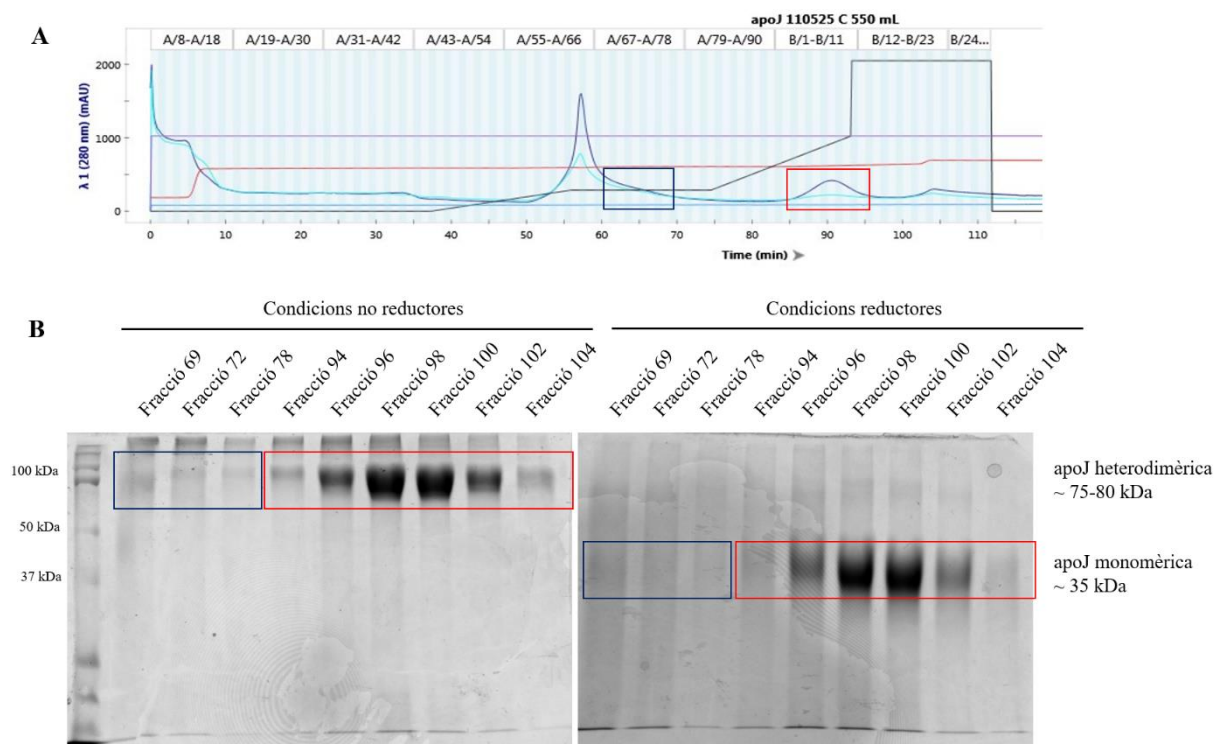


Figura 7. Purificació de l'apoJ secretada en el medi de cultiu de les cèl·lules HEK293T mitjançant cromatografia per afinitat. (A) Cromatografia de gel filtració de l'eluït de l'apoJ. La línia blau marí indica l'absorbància a 280 nm, la línia blau turquesa indica l'absorbància a 450 nm, la vermella indica la conductivitat, la línia negra indica el % de tampó d'elució, la línia blau cel indica la pressió del sistema, i la línia lila representa la ràtio de flux. Es mostren les diferents fraccions recollides pel col·lector, amb un pic principal al voltant dels 60 minuts ressaltat de color blau marí i un segon pic entre els 90-100 minuts, indicat en un requadre vermell, corresponent a l'apoJ purificada. (B) Detecció de l'apoJ purificada mitjançant tinció de blau de Coomassie en condicions no reductores (esquerra) i condicions reductores (dreta) tant del primer pic ressaltat en blau marí (fraccions 69-78) com del segon pic ressaltat en un requadre vermell (fraccions 94-104).

Amb això, realment confirmem el pic d'elució de l'apoJ present en el cromatograma, i que aquesta apoJ eluïda té un alt grau de puresa amb molt poques proteïnes contaminants rellevants, fet que permet utilitzar-la per als experiments posteriors.

4.3. Deglicosilació in vitro de l'apoJ

Amb la finalitat de determinar la rellevància de la glicosilació en l'estructura i la capacitat de prevenir l'agregació de les LDL, es van dur a terme experiments de deglicosilació enzimàtica per comprovar l'absència d'aquesta cadena hidrocarbonada.

Vam utilitzar 3 enzims diferents, el primer dels quals va ser la PNGasa F (**Figura 8**). Aquest enzim trenca l'enllaç entre l'asparagina i el primer sucre, per tant, deglicosila completament l'apoJ. Es va incubar amb concentracions creixents de l'enzim en les condicions mencionades en l'apartat 3.3.1, i es va voler observar la seva pèrdua de glicosilació realitzant un SDS-PAGE en condicions desnaturalitzants i WB. Com es pot observar en la **Figura 8A**, l'apoJ nativa no tractada amb l'enzim apareix al voltant dels 75-80 kDa en la seva conformació d'heterodímer, però quan hi ha la presència de l'enzim, aquestes bandes de l'apoJ apareixen més avall al voltant del 50-60 kDa, indicant així que hi ha hagut una pèrdua del pes molecular de la proteïna. A més, s'observa una disminució progressiva del pes molecular a mesura que augmenta la concentració de l'enzim utilitzada.

Aquesta aparent deglicosilació es confirma amb la tinció de glicoproteïna (**Figura 8B**). Aquesta tècnica ens és útil per tal de tenyir els glicans. Com es pot observar, la banda en l'apoJ no tractada amb enzims és molt intensa, indicant així la presència d'una gran quantitat de glicans. No obstant, a mesura que la concentració de la PNGasa F va augmentant, la banda va perdent intensitat de tinció, indicant així que la deglicosilació és efectiva.

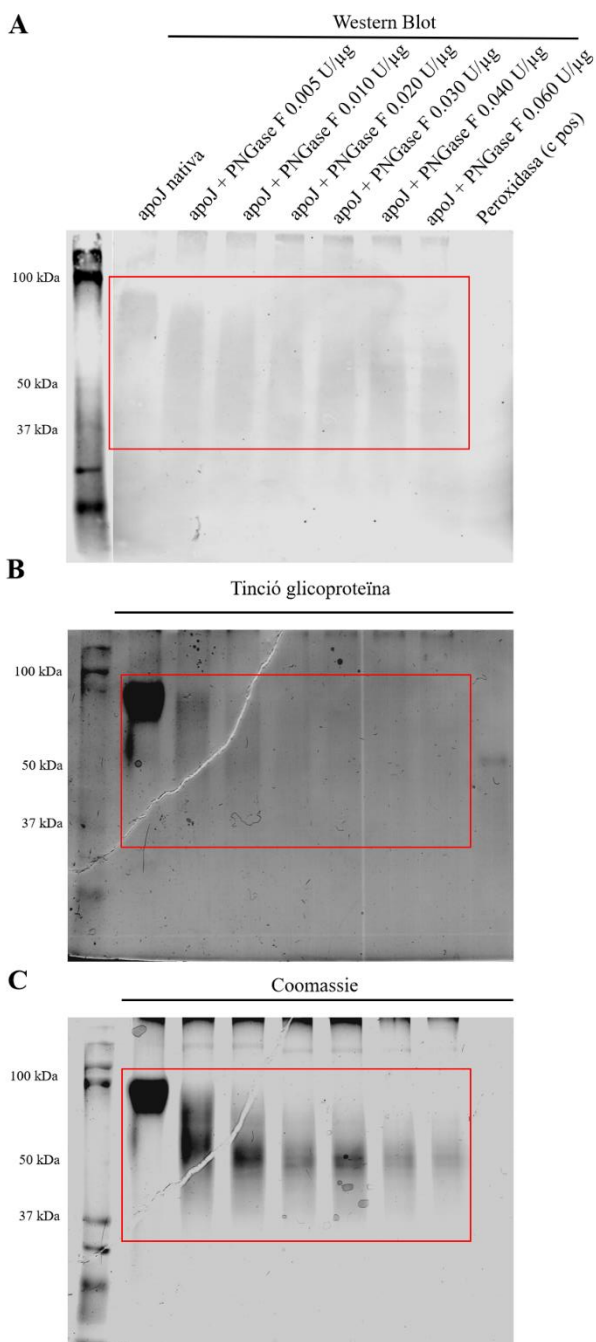


Figura 8. Avaluació de la pèrdua de glicosilació de l'apoJ mitjançant PNGasa F per SDS-PAGE en condicions desnaturalitzants. (A) Western blot de les mostres d'apoJ nativa sense tractament enzimàtic i l'apoJ tractada amb una concentració creixent de l'enzim PNGasa F (0.005 U/μg, 0.010 U/μg, 0.020 U/μg, 0.030 U/μg, 0.040 U/μg i 0.060 U/μg). Es va afegir la peroxidasa com a control positiu per a la tinció de glicoproteïna (B), la qual es va realitzar amb les mateixes mostres. (C) Tinció de blau de Coomassie de les mateixes mostres anteriors. En els tres panells indiquen les bandes corresponents a l'apoJ.

Per últim, es verifiquen els resultats amb la tinció de Coomassie (**Figura 8C**), on s'observa que la banda de l'apoJ es manté en totes les condicions, però el patró de mobilitat en funció del pes molecular canvia clarament a mesura que va augmentant la concentració de l'enzim PNGasa F.

Com a segona glucosidasa també es va utilitzar la neuraminidasa (**Figura 9**), un enzim que talla l'àcid siàlic, el residu terminal de la cadena glucídica. L'àcid siàlic presenta càrrega negativa, pel que la seva eliminació genera que l'apoJ adopti una càrrega relativament positiva. Per aquesta raó, la pèrdua d'aquest residu es detecta mitjançant electroforesi en condicions no desnaturalitzants sense SDS, en la qual les proteïnes corren per la seva càrrega elèctrica, i no pel pes molecular. Es van incubar les mostres d'apoJ amb concentracions creixents de l'enzim en les condicions mencionades en l'apartat 3.3.2, i es va observar la seva pèrdua de glicosilació realitzant l'electroforesi. Com es pot observar en la **Figura 9A**, l'apoJ nativa no tractada amb l'enzim apareix al voltant dels 80 kDa en la seva conformació d'heterodímer, però quan hi ha la presència de l'enzim, aquestes bandes de l'apoJ apareixen més amunt en el carril, indicant així que hi ha hagut una pèrdua de l'àcid siàlic, i que per tant, l'apoJ passa a tenir una càrrega positiva pel que les mostres migren més lentament. A més, no sembla observar-se diferències significatives entre les concentracions creixents de l'enzim utilitzades amb l'apoJ.

Quan realitzem la tinció de glicoproteïna (**Figura 9B**), no s'observen massa diferències entre les mostres tractades amb enzim i les no tractades, com en el cas anterior. Sembla ser coherent, perquè l'enzim deglicosila el residu terminal de la glicoproteïna, però la cadena hidrocarbonada es

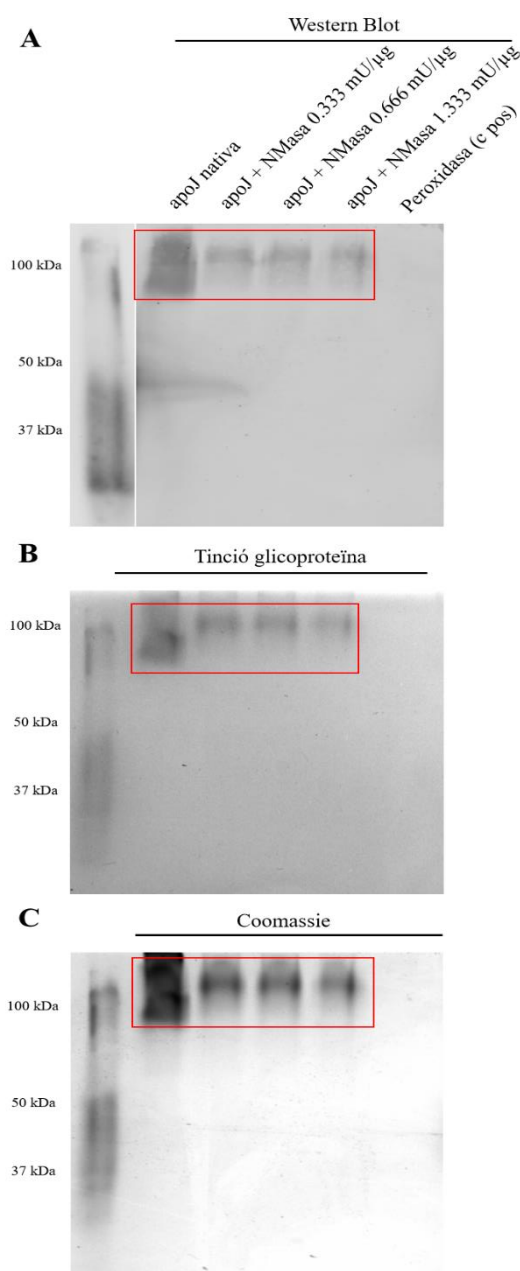


Figura 9. Avaluació de la pèrdua de glicosilació de l'apoJ mitjançant Neuraminidasa (NMase) per electroforesi en condicions no desnaturalitzants sense SDS. (A) Western blot de les mostres d'apoJ nativa sense tractament enzimàtic i l'apoJ tractada amb una concentració creixent de l'enzim Neuraminidasa (0.333 mU/μg, 0.666 mU/μg i 1.333 mU/μg). Es va afegir la peroxidasa com a control positiu per a la tinció de glicoproteïna (B), la qual es va realitzar amb les mateixes mostres. (C) Tinció de blau de Coomassie de les mateixes mostres anteriors. En els tres panells, les bandes corresponents a l'apoJ corresponen a les que estan enquadrades en vermell.

manté en l'apoJ, per tant, es manté la banda de l'apoJ tenyida com a resultat de la tinció de glicoproteïna. Com en el western blot, la banda apareix més amunt respecte l'apoJ control no tractada.

Per últim, es verifiquen els resultats amb la tinció de Coomassie (**Figura 9C**), on s'observa que la banda de l'apoJ es manté en totes les condicions, però el patró de mobilitat en funció de la càrrega elèctrica varia entre la mostra no tractada i les mostres tractades amb l'enzim Neuraminidasa.

Per acabar, es va estudiar l'efecte d'un tercer enzim, l'Endoglicosilasa H (**Figura 10**). És un enzim molt similar a la PNGasa F, deglicosilant la cadena d'hidrocarburs, excepte l'últim acetilglucosamina, (**Figura 2**). Es van incubar les mostres amb una única concentració de l'enzim en les condicions mencionades en l'apartat 3.3.3, i es va voler observar la seva pèrdua de glicosilació realitzant un SDS-PAGE en condicions desnaturalitzants. En la **Figura 10A**, es pot observar com apareix una banda al voltant dels 80 kDa, corresponent l'apoJ nativa no tractada amb l'enzim. Quan se li aplica l'enzim, no es detecta una banda clara de apoJ.

Aquesta potencial deglicosilació es confirma amb la tinció de glicoproteïna. Com es pot observar en la **Figura 10B**, la banda en l'apoJ no tractada amb enzims és molt intensa, indicant així la presència d'una gran quantitat de glicans presents en la proteïna. Tanmateix, la mostra incubada amb l'enzim, presenta una intensitat molt lleugera, essent significativament menor respecte la banda de l'apoJ nativa, el que podria indicar una menor tinció per a la pèrdua de la glicosilació.

Finalment, es verifiquen els resultats amb la tinció de Coomassie (**Figura 10C**), on s'observa que la banda de l'apoJ es manté en les dues condicions, però el patró de

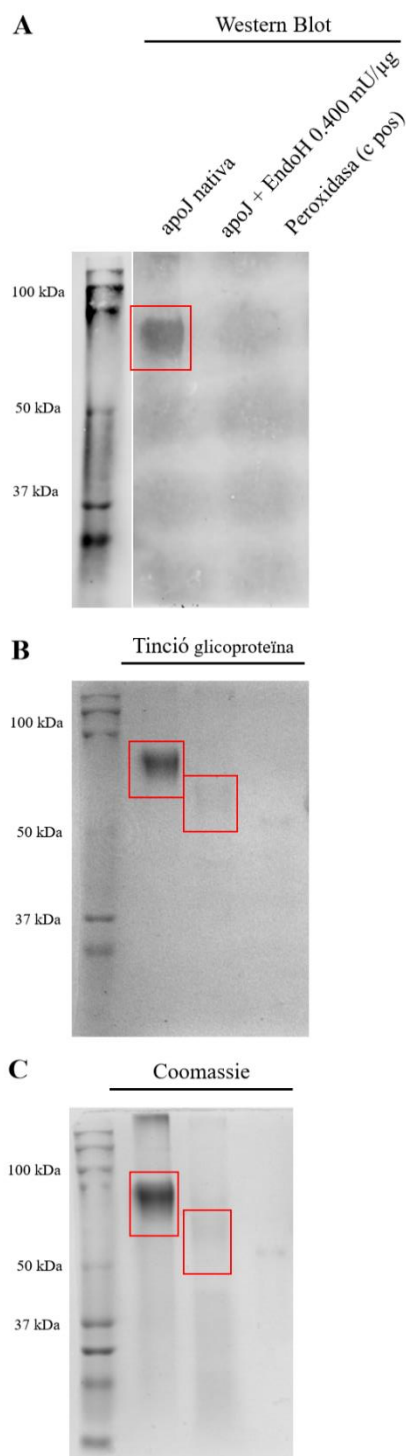


Figura 10. Avaluació de la pèrdua de glicosilació de l'apoJ mitjançant Endoglicosilasa H (EndoH) per SDS-PAGE en condicions desnaturalitzants. (A) Western blot de les mostres d'apoJ nativa sense tractament enzimàtic i l'apoJ tractada amb EndoH (0.400 mU/μg). Es va afegir la peroxidasa com a control positiu per a la tinció de glicoproteïna (B), la qual es va realitzar amb les mateixes mostres. (C) Tinció de blau de Coomassie de les mateixes mostres anteriors. Les bandes detectades d'apoJ es troben ressaltades amb requadres vermells.

mobilitat en funció del pes molecular varia significativament quan l'apoJ s'ha incubat amb la EndoH. Hi ha una banda que seria compatible amb deglicosilació, però també s'observa un rastre de bandes de baix pes molecular, que indicarien degradació de l'apoJ durant el període de deglicosilació.

Podem dir doncs, que els tres mètodes enzimàtics ens ha permès veure una deglicosilació de l'apoJ. Tenint en compte que la PNGasa F i la EndoH tenen efectes tan similars, però que la última sembla induir proteòlisis, descartem la EndoH pels següents experiments. Hem vist que la PNGasa F és més efectiva per a veure aquesta reducció de pes molecular. L'altre enzim testat, la Neuraminidasa també ens pot ser útil si es vol veure si concretament l'àcid siàlic, el residu terminal de la cadena hidrocarbonada, té algun paper en la funcionalitat i capacitat d'unió de l'apoJ a les lipoproteïnes.

4.4. Assajos d'agregació de LDL

Un cop es va haver purificat l'apoJ i es van trobar les condicions adequades per a estudiar-ne la seva capacitat funcional de les isoformes amb diferent grau de glicosilació, es va procedir amb l'objectiu de determinar si aquesta glicosilació intervé en el manteniment de la seva capacitat de prevenir l'agregació de la LDL.

Primer de tot, es van fer assajos d'agregació de LDL induïda per la esfingomielinasa (SMasa), un enzim que indueix l'agregació de les lipoproteïnes. En aquest cas es va utilitzar la cromatografia de gel filtració, on es pot quantificar el àrea del pic corresponent a la LDL agregada que es forma en presència de SMasa. La **Figura 11A** mostra un cromatograma representatiu de LDL nativa sense SMasa (monomèrica, un únic pic de LDL) i la LDL agregada per SMasa (dos pics, un de LDL monomèrica i un altre de LDL agregada). Es van provar diverses concentracions d'apoJ per a veure quina era la més adequada per a continuar amb els posteriors experiments. Per a determinar si l'apoJ podia prevenir l'agregació de la LDL, es va incubar la LDL amb diferents concentracions d'apoJ en presència de la SMasa i es va analitzar el percentatge de la LDL agregada.

Com es pot observar en la **Figura 11B**, l'agregació de la LDL quan s'indueix amb la SMasa és màxima. Pel contrari, la LDL sola o amb apoJ sense la presència de la SMasa, l'agregació de la LDL és nul·la. Pel que fa a la LDL incubada amb apoJ, s'observa que la presència de l'apoJ promou una disminució significativa de l'agregació de la LDL. A més, veiem que com més alta és la ràtio molar apoJ/apoB, menor és l'agregació de la LDL.

Aquests resultats es poden expressar també analitzant el % d'inhibició de l'agregació de la LDL (**Figura 11C**), tenint en compte que hem considerat l'agregació de la LDL induïda per la SMasa del 100%. Podem observar que amb poca concentració d'apoJ la inhibició es troba al voltant del 30%,

però a partir de la ràtio apoJ/apoB 0.11, la inhibició ja és del 50%. La màxima inhibició es dona amb la major concentració d'apoJ, superant lleugerament el 80% d'inhibició.

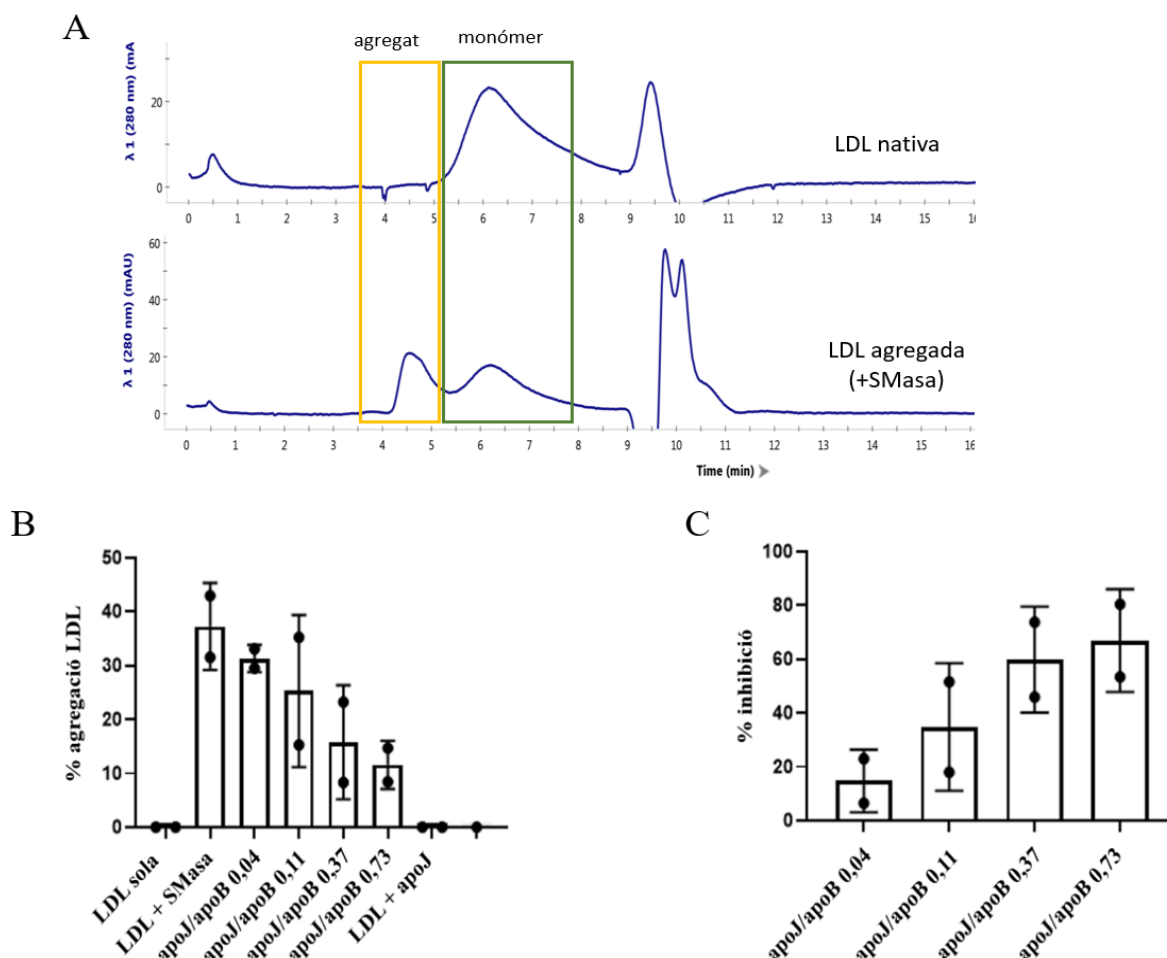


Figura 11. Determinació del paper de l'apoJ en l'agregació de la LDL induïda per esfingomielinasa (SMasa). (A) Cromatograma representatiu de la LDL nativa amb un pic corresponent a la forma monomèrica i de la LDL agregada, representada per a dos pics. Pics corresponents a la conformació monomèrica ressaltats en requadre verd, i els pics corresponents a la LDL agregada ressaltats en requadre groc. (B) Percentatge d'agregació de la LDL calculat a partir de les àrees del perfil d'absorbància mitjançant cromatografia de gel filtració. S'inclou com a control negatiu la LDL sola, i la LDL incubada amb SMasa com a control positiu. A més, tenim la LDL incubada amb diferents concentracions d'apoJ (s'indica la ràtio molar apoJ/apoB) en presència de SMasa. També es mostra LDL + apoJ sola per a descartar una possible agregació espontània. (C) Percentatge d'inhibició de l'agregació de la LDL en funció de la ràtio molar apoJ/apoB. S'ha considerat el 100% d'agregació la condició LDL + SMasa.

Podem dir, per tant, que l'apoJ prevé l'agregació de la LDL, i que aquesta és depenent de la concentració d'apoJ, ja que hem vist que com major és la concentració d'apoJ, es dona una menor agregació de la LDL perquè l'apoJ inhibeix aquesta agregació. Als següents experiments es va utilitzar la ràtio apoJ/apoB de 0.73.

Pels següents experiments es va posar a incubar l'apoJ amb l'enzim PNGasa F a diferents concentracions (0.010 U/ μ g, 0.030 U/ μ g, 0.060 U/ μ g) per a obtenir l'apoJ en forma altament deglicosilada ("high", apoJ HDegl), mitjanament deglicosilada ("medium", apoJ MDegl) i poc deglicosilada ("low" apoJ LDegl), respectivament.

En la **Figura 12A**, podem veure com augmenta progressivament l'absorbància a 450 nm, representant l'agregació de la LDL induïda amb la SMasa, i es compara amb la presència de l'apoJ nativa o l'apoJ deglicosilada (en aquest cas HDegl). Es pot observar com la major pendent de la cinètica d'absorbància (per tant, major agregació de la LDL) es dona amb la LDL sola induïda per la SMasa. Quan afegim l'apoJ nativa, veiem que l'absorbància disminueix considerablement respecte el control. Per tant, veiem que l'agregació de la LDL disminueix amb l'apoJ nativa. No obstant, quan induïm l'agregació de la LDL amb presència de l'apoJ deglicosilada, veiem que l'apoJ perd parcialment la capacitat de prevenir l'agregació de la LDL, ja que la pendent de la cinètica és menor respecte el control de la LDL més la SMasa, però no és igual d'eficient que amb presència de l'apoJ nativa.

Es va voler entrar una mica més en detall i es va voler determinar si el grau de deglicosilació intervenia en la capacitat de l'apoJ d'inhibir l'agregació de la LDL. La **Figura 12B** mostra l'efecte de les diferents formes d'apoJ sobre la formació del pic de LDL agregada. Veiem que la inhibició de l'agregació de la LDL amb presència de l'apoJ nativa és al voltant del 45%. Fixant-nos ara en el grau de deglicosilació de l'apoJ, veiem que com més deglicosilada es troba l'apoJ, hi ha menys % d'inhibició de l'agregació de la LDL. Per tant, com més deglicosilada es troba l'apoJ, menys capacitat manté per inhibir l'agregació de la LDL. El anàlisi estadístic de Friedman indica que hi ha diferències estadístiques entre els grups estudiats ($p=0.0084$).

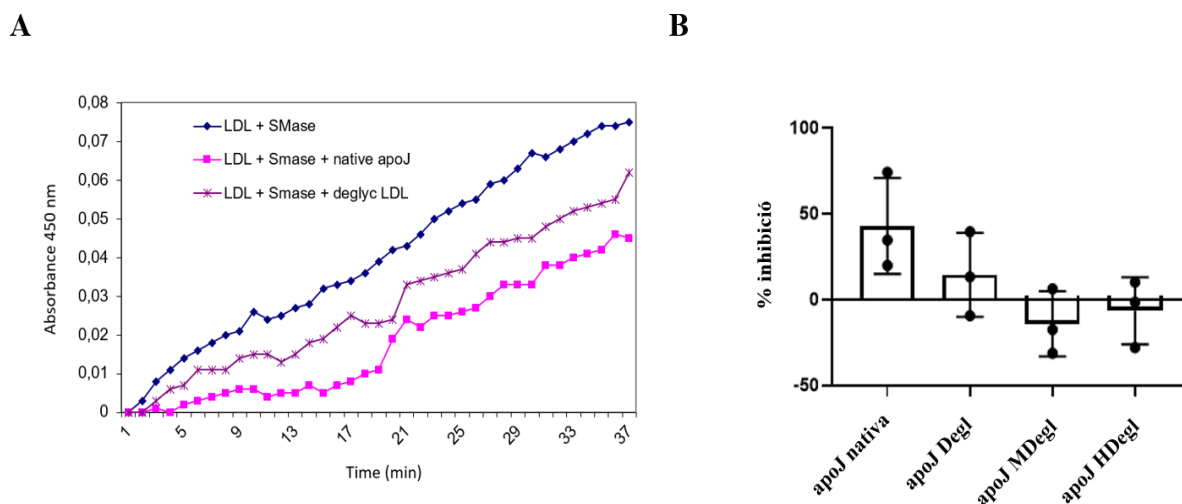


Figura 12. Determinació del paper de la glicosilació l'apoJ en la seva capacitat per a prevenir l'agregació de la LDL induïda per esfingomielinasa (SMasa). (A) Agregació de la LDL mesurada a partir de l'absorbància a 450 nm respecte el temps de tres condicions: LDL + SMasa (blau), LDL + SMasa en presència d'apoJ nativa (morat) i LDL + SMasa en presència d'apoJ deglicosilada (rosa). (B) Percentatge d'inhibició de l'agregació de la LDL en funció del grau de deglicosilació de l'apoJ comparat amb l'apoJ nativa (apoJ Degl = apoJ amb deglicosilació baixa, apoJ MDegl = apoJ amb deglicosilació mitja, apoJ HDegl = apoJ deglicosilació alta).

D'aquests resultats, podem dir que la glicosilació de l'apoJ és necessària per a que la proteïna mantingui la seva capacitat per a inhibir l'agregació de la LDL, i que aquesta és depenent del grau de deglicosilació a la qual estigui sotmesa l'apoJ.

4.5. Assajos d'unió de l'apoJ a la LDL

Finalment, es va voler estudiar si la deglicosilació de l'apoJ afectava a la seva unió a la LDL. Es va realitzar una incubació de la LDL amb l'apoJ en dues concentracions diferents, estudiant les ratios molars apoJ/apoB de 0.5 i de 1. Després de separar les lipoproteïnes per ultracentrifugació, es van separar una fracció del sobrenedant, on s'hauria de trobar la LDL sola i/o unida a l'apoJ, i una fracció de l'infranadant, on hauríem de trobar l'apoJ no unida a la LDL. La presència d'apoJ es va detectar tant per tinció de Coomassie com per Western blot.

Com es pot observar en la **Figura 13A**, veiem que en el sobrenedant no sembla detectar-se apoJ mitjançant la tinció de Coomassie. No obstant, sí que es detecta presència d'apoJ en el pellet. La ràtio apoJ/apoB de 1 és més adequada, ja que les bandes semblen de major intensitat respecte la ràtio de 0,5. A més, la intensitat de la banda d'apoJ nativa detectada és major que la de l'apoJ deglicosilada per una menor presència d'aquesta en el pellet. Això podria ser un possible indicatiu de que l'apoJ deglicosilada s'uneix més a la LDL que l'apoJ nativa. Quan es contrasten els resultats obtinguts al Coomassie mitjançant un western blot detectant específicament l'apoJ (**Figura 13B**), observem els mateixos resultats en el pellet. S'observa una major presència d'apoJ nativa en el pellet en la mostra de ràtio apoJ/apoB de 1.

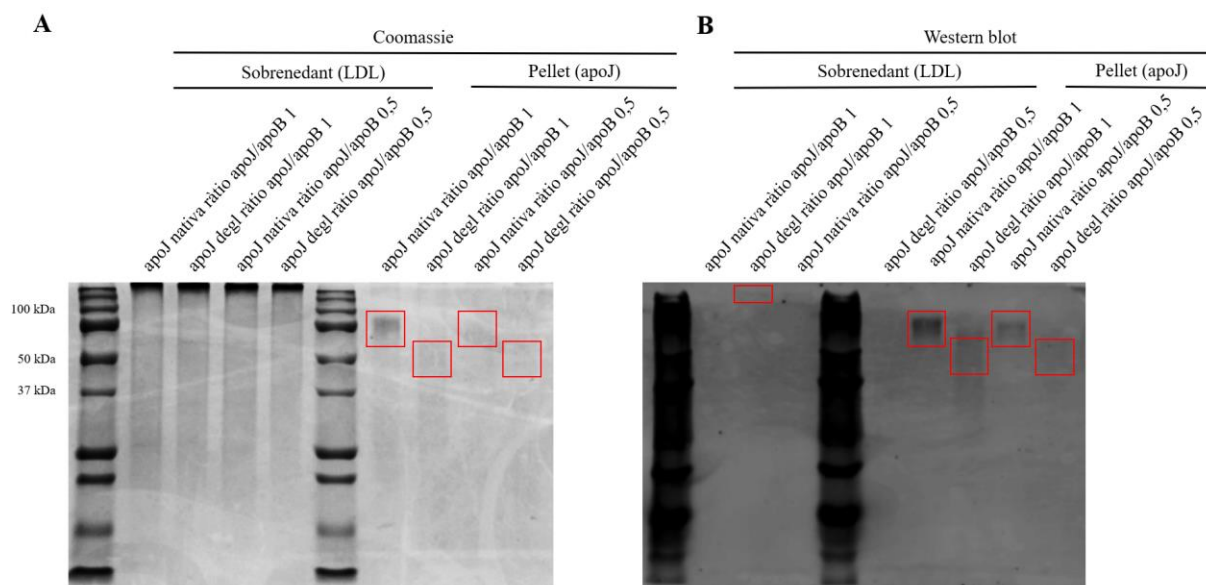


Figura 13. Determinació del paper del paper de la glicosilació l'apoJ en la seva capacitat per a unir-se a la LDL. (A) Tinció de Coomassie del sobrenedant i del pellet aconseguits a partir de la ultracentrifugació de lipoproteïnes. Es van provar dues concentracions diferents. (B) Western blot del sobrenedant i del pellet aconseguits a partir de la ultracentrifugació de lipoproteïnes. Es van provar dues concentracions diferents (ràtio molar apoJ/apoB de 1 i ràtio molar apoJ/apoB de 0.5. Les bandes corresponents a l'apoJ es troben ressaltades amb requadres vermells.

Llavors es va tornar a analitzar la unió de l'apoJ deglicosilada utilitzant la ràtio apoJ/apoB de 1. Com es pot veure en la **Figura 14**, al gel tenyit amb Coomassie es poden veure les bandes corresponents a l'apoB en la fracció de sobrenedant. Així mateix, també s'observen les bandes d'apoJ a l'infranadant corresponents a l'apoJ nativa, en canvi, la senyal és molt fluixa a l'apoJ

deglicosilada. En el western blot es poden veure les bandes d'apoJ als infranadants, però també es detecta una banda més tènue en una posició d'elevat pes molecular, aproximadament a l'alçada del de l'apoB, suggerint que l'apoJ deglicosilada es podria unir a aquesta apoB. Aquests resultats suggeririen que realment l'apoJ deglicosilada s'uneix més a la LDL que l'apoJ en conformació nativa. Tanmateix, per a confirmar aquesta possibilitat serà necessari quantificar la concentració d'apoJ mitjançant ELISA de totes les fraccions recollides que es conserven congelades a -80°C

Per tant, les nostres dades indiquen que la ràtio de apoJ/apoB de 1 és millor per a determinar la unió de la LDL a l'apoJ, i suggereixen que l'apoJ deglicosilada s'uneix amb més afinitat a la LDL que l'apoJ nativa.

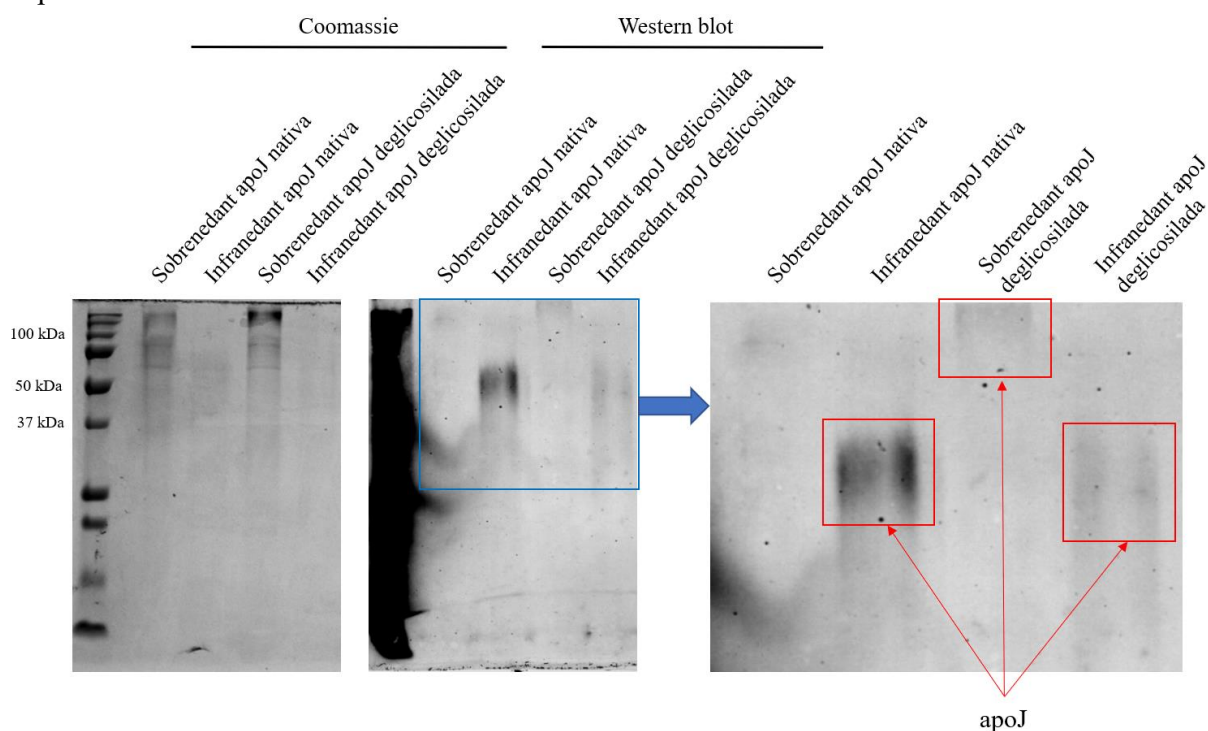


Figura 14. Anàlisi de la unió de l'apoJ deglicosilada a la LDL en una ràtio apoJ/apoB de 1. Coomassie i Western Blot del sobrenedant i de l'infranadant en una ràtio apoJ/apoB de 1, tant de l'apoJ nativa com apoJ deglicosilada. La imatge de la dreta representa el Western blot en augment (ressaltat en un requadre blau) on s'observen amb més claredat les bandes corresponents a l'apoJ, ressaltades amb requadres vermells.

En cas de confirmar-se aquests resultats, sembla paradoxal que l'apoJ deglicosilada hagi perdut la capacitat d'inhibir l'agregació de la LDL però que al mateix temps s'uneix més a l'apoB. Seran necessaris més estudis per a confirmar aquests aparentment paradoxals resultats i aprofundir en els possibles mecanismes moleculars implicats. Es pot especular amb la possibilitat que l'apoJ deglicosilada, en unir-se més fortament a l'apoB, perdria la capacitat d'actuar sobre diferents partícules de la LDL, una capacitat que si mantindria l'apoJ nativa. En qualsevol cas són necessàries més dades experimentals per a confirmar o refutar aquesta possibilitat.

5. CONCLUSIONS

El present treball ha tingut com a objectiu principal expressar apoJ humana en cèl·lules HEK293T i purificar-la, per determinar el paper de la glicosilació de l'apoJ en la seva capacitat per a interaccionar amb la LDL i per a prevenir-ne la seva agregació. A partir dels resultats obtinguts, podem extreure varies conclusions rellevants.

- S'ha aconseguit expressar i purificar apoJ humana recombinant a partir de les cèl·lules HEK293T amb un alt nivell de puresa, mantenint la seva conformació nativa i funcional.
- Els tres mètodes testats per a promoure la deglicosilació de l'apoJ han demostrat la viabilitat de modificar-ne la glicosilació in vitro. Tanmateix, la Endoglicosilasa H va ser descartada per no presentar una eficàcia suficient
- La PNGasa F ens ha permès observar una pèrdua de pes molecular degut a la seva deglicosilació, mentre que la Neuraminidasa ens ha permès veure un canvi en la càrrega elèctrica de la proteïna. D'aquesta manera, s'han obtingut diferents perfils de deglicosilació, útils per a analitzar el comportament de l'apoJ en diverses condicions.
- S'ha evidenciat que l'apoJ té la capacitat de prevenir l'agregació de la LDL, i que aquesta capacitat és depenent de la seva concentració.
- Els resultats obtinguts indiquen que la glicosilació té un paper rellevant en aquesta funció, ja que l'apoJ deglicosilada perd parcialment la capacitat de prevenir l'agregació de la LDL. Aquesta pèrdua de funció és directament proporcional al grau de deglicosilació que pateix la proteïna.
- S'ha observat que la glicosilació intervé en la interacció entre la LDL i l'apoJ. L'apoJ deglicosilada s'uneix amb més afinitat a la LDL que no pas l'apoJ nativa. A més, s'ha determinat que la millor ràtio per a estudiar aquesta interacció és la ràtio molar apoJ/apoB d'1.

6. LIMITACIONS I ASPECTES PENDENTS

Tot i els resultats obtinguts, l'estudi realitzat presenta algunes limitacions i aspectes pendents que cal considerar en futurs treballs. D'una banda, per tal de verificar i contrastar els resultats obtinguts, encara s'ha de quantificar la concentració d'apoJ per ELISA, per així poder confirmar les concentracions que es van mesurar mitjançant el mètode adaptat l'autoanalitzador. Tot i que estudis previs del mateix grup han mostrat una elevada equivalència entre mètodes la quantificació de proteïna i d'apoJ, aquesta mesura és especialment necessària en el cas dels experiments d'unió a la LDL. D'altra banda, serà necessari augmentar el nombre d'experiments realitzats d'agregació, per a poder realitzar un anàlisi estadístic més complet i robust. Per últim, queda pendent analitzar l'efecte de la deglicosilació mitjançant la Neuraminidasa, tant en la unió a la LDL com en la seva capacitat per a prevenir-ne l'agregació.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Atherosclerosis e infección | Medicina Integral [Internet]. [cited 2025 Mar 13]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-aterosclerosis-e-infeccion-10022162>
2. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2019 5:1 [Internet]. 2019 Aug 16 [cited 2025 Mar 13];5(1):1–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0106-z>
3. Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N, Nixdorff U, Lechner B, et al. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2025 Mar 13];27(4):394. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7065445/>
4. Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2025 Mar 13];72(3):151–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pin.13202>
5. Atherosclerosis: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2025 Jul 7]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000171.htm>
6. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res* [Internet]. 2019 Jan 18 [cited 2025 Mar 13];124(2):315–27. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>
7. El impacto de la detección de disfunción endotelial en la aterosclerosis: estudio mediante tomografía por emisión de positrones | Archivos de Cardiología de México [Internet]. [cited 2025 Jul 7]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-archivos-cardiologia-mexico-293-articulo-el-impacto-deteccion-disfuncion-endotelial-X1405994010493709>
8. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, et al. Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 Jul 7];9:925923. Available from: www.frontiersin.org
9. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*. 2015 Apr 13;209(1):13–22.
10. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext [Internet]. 2024 Jan 14 [cited 2025 Apr 22]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
11. Ginsberg HN. LIPOPROTEIN PHYSIOLOGY. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998 Sep 1;27(3):503–19.
12. Goldstein JL, Brown MS. A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell* [Internet]. 2015 Mar 26 [cited 2025 Apr 22];161(1):161. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4525717/>

13. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* [Internet]. 2017 Aug 21 [cited 2025 Jul 14];38(32):2459–72. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehx144>
14. Venugopal SK, Anoruo M, Jialal I. Biochemistry, Low Density Lipoprotein. *StatPearls* [Internet]. 2023 Apr 17 [cited 2025 Apr 22]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500010/>
15. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2014 [cited 2025 Jul 8];34(5):1069–77. Available from: </doi/pdf/10.1161/ATVBAHA.114.303284?download=true>
16. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Science* (1979) [Internet]. 2019 Jan 3 [cited 2025 Jul 8];111(2877):166–86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/>
17. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* [Internet]. 2000 Sep 14 [cited 2025 Jul 14];407(6801):233–41. Available from: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/35025203>
18. Wilson MR, Easterbrook-Smith SB. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2025 Jul 9];25(3):95–8. Available from: <https://www-cell-com.sire.ub.edu/action/showFullText?pii=S0968000499015340>
19. Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2025 Jul 9];34(11):1430–48. Available from: <https://www-sciencedirect-com.sire.ub.edu/science/article/pii/S1357272502000419?via%3Dihub>
20. Rull A, Martínez-Bujidos M, Pérez-Cuellar M, Pérez A, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada JL. Increased concentration of clusterin/apolipoprotein J (apoJ) in hyperlipemic serum is paradoxically associated with decreased apoJ content in lipoproteins. *Atherosclerosis* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2025 Jul 14];241(2):463–70. Available from: <https://www.atherosclerosis-journal.com/action/showFullText?pii=S0021915015013532>
21. Bancells C, Canals F, Benítez S, Colomé N, Julve J, Ordóñez-Llanos J, et al. Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J Lipid Res* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2025 Jul 21];51(12):3508–15. Available from: <https://www.jlr.org/action/showFullText?pii=S0022227520313626>
22. Martínez-Bujidos M, Rull A, González-Cura B, Pérez-Cuellar M, Montoliu-Gaya L, Villegas S, et al. Clusterin/apolipoprotein J binds to aggregated LDL in human plasma and plays a protective role against LDL aggregation. *The FASEB Journal* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2025 Jul 9];29(5):1688–700. Available from: </doi/pdf/10.1096/fj.14-264036>
23. Rivas-Urbina A, Rull A, Aldana-Ramos J, Santos D, Puig N, Farre-Cabrerizo N, et al. Subcutaneous administration of apolipoprotein j-derived mimetic peptide d-[113–

- 122]apoj improves LDL and HDL function and prevents atherosclerosis in LDLR-KO mice. *Biomolecules*. 2020 Jun 1;10(6).
24. Fernández-De-Retana S, Cano-Sarabia M, Marazuela P, Sánchez-Quesada JL, Garcia-Leon A, Montañola A, et al. Characterization of ApoJ-reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanodisc for the potential treatment of cerebral β -amyloidosis. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2025 Jul 29];7(1):14637. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5677083/>
 25. Fleischer JG, Rossignol D, Francis GA, Chan T, Lynn M, Wasan KM. Deactivation of the lipopolysaccharide antagonist eritoran (E5564) by high-density lipoprotein-associated apolipoproteins. *Innate Immun* [Internet]. 2012 Feb [cited 2025 Apr 22];18(1):171–8. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753425910394395>
 26. Poon S, Rybchyn MS, Easterbrook-Smith SB, Carver JA, Pankhurst GJ, Wilson MR. Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2002 Oct 18 [cited 2025 Jul 30];277(42):39532–40. Available from: <https://www.jbc.org/action/showFullText?pii=S0021925819723151>