



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA
IN TECNOLOGIE BIOMEDICHE IN MEDICINA CLINICA
XXVI CICLO**

**DISLIPIDEMIE ATEROGENE:
GENI COINVOLTI NELLA SINDROME DA BASSE HDL**

Coordinatore:
Prof.: SEBASTIANO FILETTI

Tutor:
Prof.: MARCELLO ARCA

Dottoranda:
GESSICA TRUGLIO

In collaborazione con Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia-Prof. MARCO LUCARELLI

Triennio Accademico 2011-2013

INDICE

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	6
CAPITOLO I: Le lipoproteine e il metabolismo delle lipoproteine.....	9
1.1 Le lipoproteine	9
1.2 Metabolismo delle lipoproteine	14
1.3 La via esogena del colesterolo.....	15
1.4 La via endogena del colesterolo	16
1.5 HLD e il trasporto inverso del colesterolo.....	17
CAPITOLO II: Le dislipidemie	21
2.1 Classificazione di Friedrickson	22
2.2 ApoA1	24
2.3 LPL	27
2.4 LCAT	30
2.5 ABCA1 e la malattia di Tangier	32
CAPITOLO III: Materiali e metodi	36
3.1 Reclutamento dei pazienti	36
3.2 Misure biochimiche	37
3.3 Estrazione del DNA genomico da buffy coat.....	37
3.4 Sequenziamento dei geni ApoA1, LPL, LCAT e ABCA1	38
3.4.1 Amplificazione del DNA	40
3.4.2 Elettroforesi su gel d'agarosio.....	47
3.4.3 Cycle sequencing	47
3.4.4 Elettroforesi capillare.....	50
3.4.5 Analisi degli elettroferogrammi	50
3.5 Saggio SNaP	51
3.5.1 Amplificazione del DNA mediante PCR multiplex.....	51
3.5.2 Purificazione dell'amplificato.....	51
3.5.3 Minisequencing.....	52

3.5.4 Elettroforesi capillare.....	54
3.6 Analisi d'espressione del gene ABCA1	55
3.6.1 Anello di linfociti-monociti da sangue venoso periferico.....	55
3.6.2 Estrazione RNA.....	55
3.6.3 RT-PCR	56
CAPITOLO IV: Risultati.....	59
4.1 Analisi del gene ApoA1	60
4.2 Analisi del gene LPL	63
4.3 Analisi del gene LCAT	70
4.4 Caso Tangier.....	72
CAPITOLO V: Discussione	81
CAPITOLO VI: Conclusioni.....	86
RINGRAZIAMENTI.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	91

“La trasformazione ci porta ad amare il mistero. Quando tutto sembra avvolto dalle tenebre e ci sentiamo abbandonati, è inutile volgere lo sguardo al passato. Dobbiamo guardare avanti.

Non dobbiamo temere ciò che accadrà domani, giacché anche ieri abbiamo avuto qualcuno che si è preso cura di noi.”

(P.C.)

Alla persona più importante della mia vita,

Mio padre.

ABSTRACT

Le dislipidemie aterogene sono alterazioni del metabolismo lipidico associate ad elevato rischio cardiovascolare. Esse sono caratterizzate da bassi valori di HDL ed elevati livelli di trigliceridi, con numerosi geni potenzialmente coinvolti. Ciò rende particolarmente complessa l'analisi mutazionale.

In una casistica pediatrica di 55 bambini con valori di colesterolo HDL < 40 mg/dl e trigliceridi >150 mg/dl, abbiamo effettuato l'analisi mutazionale di 3 geni candidati, quello per l'apolipoproteina AI (APOA1), quello per la lipoproteinlipasi (LPL) e quello per la lecitina:colesterolo aciltransferasi (LCAT). Come popolazione di controllo è stata utilizzata una popolazione costituita da 174 bambini sani. Questo è stato il primo obiettivo del progetto del dottorato.

Nel gene APOA1 sono state identificate le seguenti variazioni di sequenza: 1 nel promotore (-75G>A) e 19 introniche (8 delle quali nuove).

Nel gene LPL sono state identificate le seguenti variazioni di sequenza: 1 al 5'UTR (-281T>G), 8 esoniche (N291S, L365V, D9N, S45N (nuova), V108V, E118E, T106T, S447X) e 14 introniche. La N291S, L365V, -281T>G e la D9N sono state precedentemente descritte come varianti associate a fenotipi iperlipidemici e bassi livelli di HDL.

Le varianti identificate nel gene LPL sono state ricercate tramite saggio SNaPshot nella popolazione di controllo. La variante N291S è associata al fenotipo di dislipidemia aterogena (p=0.01).

L'identificazione delle lesioni molecolari nei geni candidati e la loro caratterizzazione risultano indispensabili al miglioramento dell'abilità diagnostica, prognostica e terapeutica di tale sindrome.

Il secondo obiettivo di questo progetto di dottorato, è stato quello di identificare mutazioni nel gene ABCA1 in un probando adulto caratterizzato da livelli molto bassi di colesterolo HDL (HDL-C: 1 mg/dl) al fine di confermare la diagnosi clinica di malattia di Tangier. L'analisi mutazionale e d'espressione del gene ha identificato due varianti introniche (1195-27 G>A; 1510-1 G>A, nuova) che provocano un difetto di splicing e portano alla produzione di una proteina tronca. Il probando è risultato essere eterozigote composto per le due varianti introniche che, quindi, possono essere associate alla malattia di Tangier.

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

I livelli di colesterolo nel plasma rappresentano il principale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari (CVD). Essendo un lipide, il colesterolo è insolubile nel plasma e richiede di essere complessato con proteine. I due principali trasportatori di colesterolo sono le low density lipoprotein (LDL) e le high density lipoprotein (HDL).

Studi epidemiologici, evidenze genetiche e trials clinici, hanno dimostrato i vantaggi di abbassare i livelli di LDL nel plasma come protezione contro le malattie cardiovascolari. (Brautbar and Ballantyne, 2011).

Inoltre molti altri studi hanno dimostrato che esiste una relazione inversa tra HDL e malattie cardiovascolari. Diverse caratteristiche delle HDL, incluso il loro contenuto in apolipoproteine, altre proteine e lipidi, le loro dimensioni, lo stato ossidativo, conferiscono alle HDL la capacità di protezione verso le malattie cardiovascolari (Francis, 2010).

Ma il ruolo protettivo delle HDL è principalmente dovuto alla loro azione nel trasporto inverso del colesterolo. In questo meccanismo il colesterolo in eccesso è portato fuori dalle cellule tramite pompe come ABCA1 verso piccole particelle ApoAI generando le HDL. Le HDL trasportano il colesterolo al fegato che verrà escreto nella bile, sia senza subire trasformazioni che dopo conversione in acidi biliari.

Diversi sono gli studi che supportano il ruolo protettivo delle HDL, indipendentemente dai livelli di altri lipidi come LDL o trigliceridi (TG) (Francis, 2010). Già nel 1951, uno studio aveva dimostrato che soggetti sani hanno alti livelli di HDL rispetto a soggetti con malattia coronarica (CAD) (Barr et al., 1951). I dati del Framingham Heart Study hanno rilevato che il 43-44% degli eventi coronarici si verifica in soggetti con livelli di HDL inferiori a 40 mg/dl e che una diminuzione dell'1% dei livelli di HDL possono aumentare l'incidenza di CAD del 3-4% (Wilson, 1990). Dall'altra parte, un aumento dell'1% di HDL diminuisce il rischio di malattia coronarica del 6% (Gordon et al., 1989).

Sulla base di questi studi epidemiologici, l'American Heart Association (AHA), ha affermato che livelli di HDL inferiori 40 mg/dl per gli uomini e di 50 mg/dl per le donne sono i principali fattori di rischio per le malattie cardiache.

La prova genetica che bassi livelli di HDL provocano CVD non è così favorevole come gli studi epidemiologici; tuttavia, i risultati degli studi genetici sono spesso confusi da altri fattori.

Studi su famiglie e gemelli hanno dimostrato che i livelli di colesterolo HDL hanno una forte determinazione genetica, con un'ereditabilità stimata tra 40 e 60% (Wang et al., 2005).

Le alterazioni delle lipoproteine costituite da un aumento delle concentrazioni ematiche di trigliceridi, ridotto colesterolo HDL e aumento delle LDL di piccole dimensioni caratterizzano un fenotipo che viene chiamato dislipidemia aterogena (AD) proprio per la forte associazione con l'aumento del rischio per le malattie cardiovascolari aterosclerotiche.

Il primo obiettivo di questo progetto di dottorato è stato l'individuazione e la caratterizzazione di lesioni molecolari nei geni candidati come causa di dislipidemia aterogena in età pediatrica.

Infatti, diversi studi associano la dislipidemia aterogena a una condizione che si verifica solo in età adulta come combinazione di fattori di predisposizione con invecchiamento e adiposità.

Ad oggi non è stato ben stabilito se questo tipo di fenotipo può essere rilevato anche nell'infanzia. Tuttavia le osservazioni epidemiologiche hanno documentato che alcune anomalie lipidiche che caratterizzano la dislipidemia aterogena, in particolare bassi livelli di HDL e alti livelli di trigliceridi, possono essere presenti sin dall'infanzia.

La precoce identificazione di dislipidemia aterogena può aiutare nella predizione di aterosclerosi in età adulta.

In una casistica pediatrica di 55 bambini con valori di colesterolo HDL < 40 mg/dl e trigliceridi >150 mg/dl, completamente caratterizzata dal punto di vista biochimico-clinico, abbiamo effettuato l'analisi mutazionale di 3 geni candidati APOA1, LPL e LCAT. L'analisi mutazionale è stata condotta per sequenziamento e ottimizzata utilizzando una piattaforma strumentale automatizzata in formato 96-well comprendente il sistema robotico Microlab Starlet (Hamilton), l'analizzatore genetico ABI PRISM 3130 xl (Applied Biosystems). Come popolazione di controllo è stata utilizzata una popolazione costituita da 174 bambini senza dislipidemia aterogena.

L'identificazione delle lesioni molecolari nei geni candidati, la loro caratterizzazione e lo studio della relazione con i livelli di colesterolo HDL, contribuiranno al chiarimento del rapporto tra genotipo e fenotipo nelle sindromi da basse HDL, nonché al miglioramento dell'abilità diagnostica, prognostica e terapeutica.

Il secondo obiettivo di questo progetto di dottorato è stata la caratterizzazione molecolare, sia a livello mutazionale che relativamente alla caratterizzazione funzionale, di un sospetto clinico di malattia di Tangier in un probando adulto. E' stato effettuato il sequenziamento del gene ABCA1 le cui mutazioni causano la malattia. È stata quindi effettuata un'analisi d'espressione per valutare gli effetti di tutte le varianti introniche e sinonime identificate. Ciò ha permesso l'individuazione e caratterizzazione funzionale delle 2 mutazioni introniche causative (una delle quali mai precedentemente descritta).

Successivamente le varianti identificate in questo gene, sono state ricercate nei familiari disponibili anch'essi caratterizzati da bassi livelli di HDL.

CAPITOLO I: Le lipoproteine e il metabolismo delle lipoproteine

1.1 Le lipoproteine

Nel plasma i lipidi sono trasportati all'interno di particelle denominate lipoproteine. Queste sono complessi multimolecolari che svolgono un ruolo importante nel trasporto dei lipidi tra gli organi di sintesi e di assorbimento (fegato e intestino) e i tessuti periferici.

Le lipoproteine sono particelle globulari di diversa massa costituite da specifiche proteine trasportatrici, chiamate apolipoproteine, e da combinazioni diverse di fosfolipidi, colesterolo, esteri del colesterolo e triacilgliceroli. In tutte le lipoproteine i lipidi più insolubili, trigliceridi ed esteri del colesterolo, sono componenti del "core", mentre i lipidi più polari, apoproteine, fosfolipidi e colesterolo non esterificato, sono localizzati sulla superficie (Figura1).

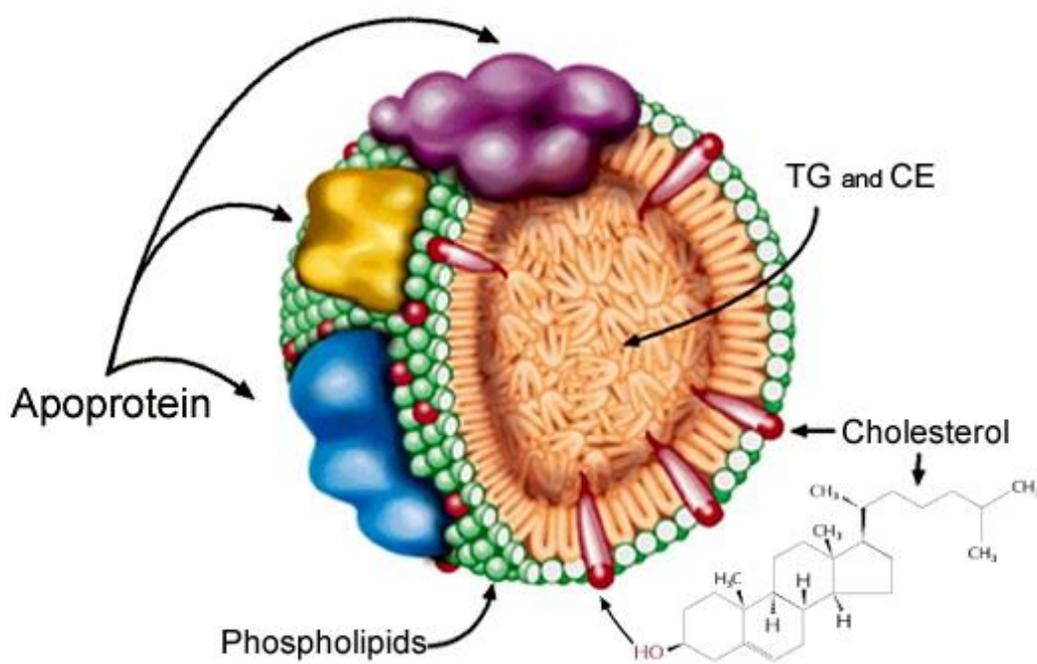


Figura 1: Struttura delle lipoproteine.

Le lipoproteine differiscono tra loro per densità, composizione lipidica e natura della porzione apolipoproteica: è importante notare che le apolipoproteine determinano il destino metabolico delle particelle lipoproteiche agendo non solo come elementi strutturali che stabilizzano le particelle (ApoB, ApoAI, ApoAII), ma anche come ligandi di recettori di membrana (ApoB, ApoE) e come attivatori o inibitori di enzimi (ApoAI, ApoC-II, C-III) o sistemi di trasporto (ApoA-IV, ApoF).

Le lipoproteine vengono classificate secondo alcune loro caratteristiche fisico-chimiche.

In rapporto alla loro densità, diametro, composizione e mobilità elettroforetica, le lipoproteine possono essere classificate in 4 classi principali.

- chilomicroni, cioè le lipoproteine di maggiore dimensione, che hanno una densità di circa 0,900 g/ml e si portano spontaneamente in superficie nel plasma lasciato per 24 ore a 4° C. Queste lipoproteine trasportano i trigliceridi di provenienza alimentare e pertanto sono presenti nel sangue nella fase dell' assorbimento intestinale.
- VLDL o "*very low density lipoproteins*" che hanno una densità fino a 1,006 g/ml. Queste ultime contengono a differenza dei chilomicroni, soprattutto i trigliceridi "endogeni" sintetizzati nel fegato.
- LDL o "*low density lipoproteins*", con densità compresa tra 1,019 e 1,063 g/ml. I componenti principali di questa classe sono il colesterolo e gli esteri del colesterolo, oltre che fosfolipidi e una piccola quantità di trigliceridi.
- HDL o "*high density lipoproteins*", che sono isolate tra le densità di 1,063 e 1,210 g/ml. Queste ultime contengono colesterolo e fosfolipidi in proporzioni praticamente uguali, con un contenuto di proteine di oltre il 50%. A loro volta le HDL possono essere suddivise in ulteriori sottofrazioni.

Infine tra le densità di 1,006 e 1,019 g/ml, può essere isolata una frazione lipoproteica con caratteristiche intermedie tra le VLDL e le LDL, ossia le IDL o *intermediate density lipoproteins* (Figura2).

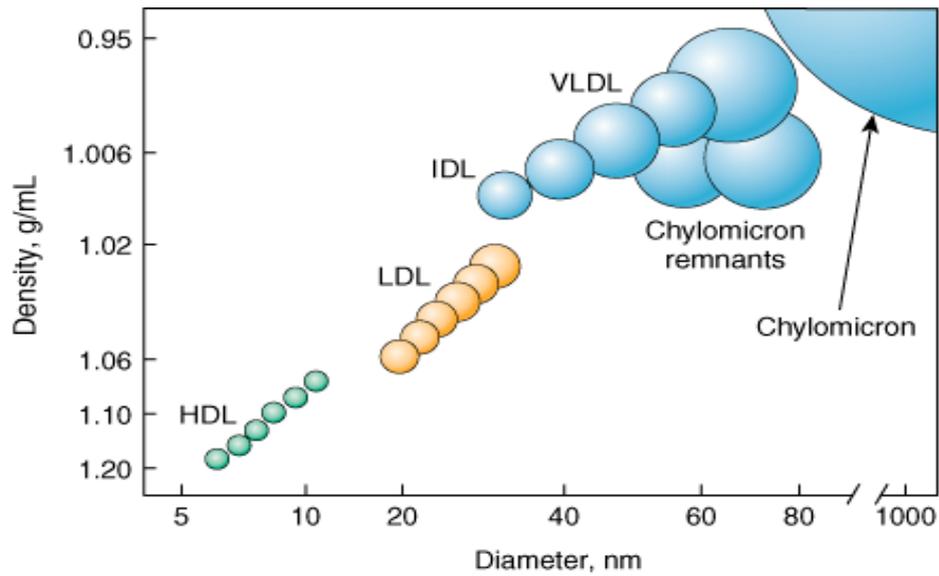


Figura 2: Classificazione delle diverse lipoproteine plasmatiche in base alla densità e alle dimensioni.

Queste molecole sono dotate di densità e carica specifiche, il che conferisce loro una caratteristica mobilità elettroforetica, se poste in un campo elettrico. ,

Sui supporti comunemente impiegati, come l' acetato di cellulosa o l'agarosio, le VLDL, le LDL e le HDL, migrano rispettivamente in posizione *pre-β*, *β* e *α*; le IDL migrano in una posizione intermedia tra le VLDL e le LDL. Infine i chilomicroni rimangono al punto di applicazione del campione a causa del loro basso contenuto proteico (Figura 3).

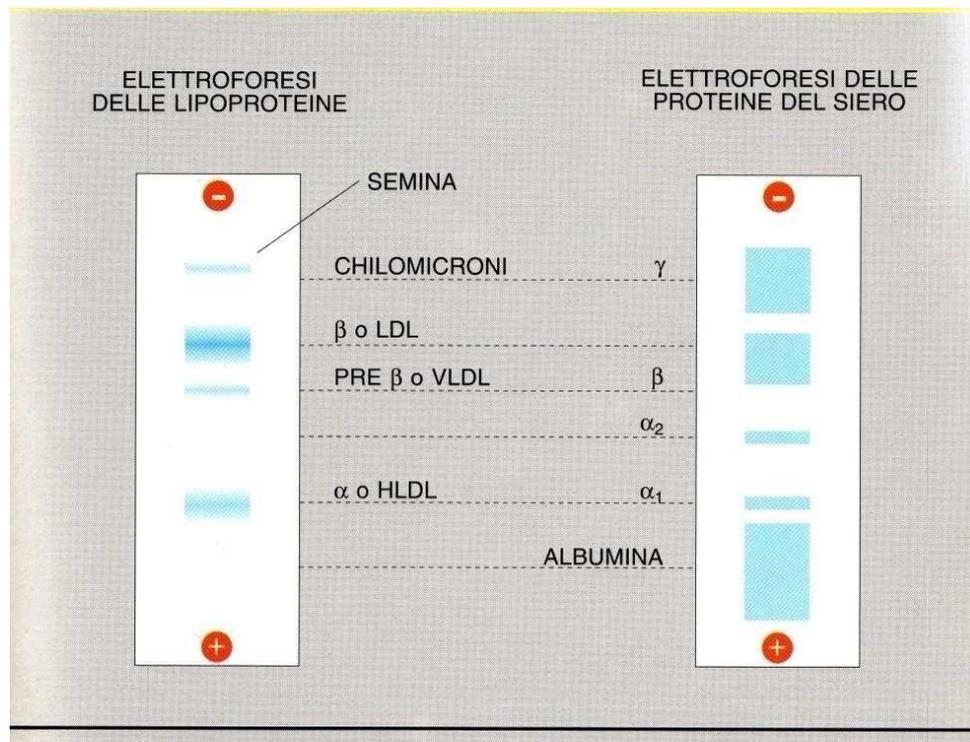


Figura 3: Elettroforesi delle lipoproteine.

Ogni classe lipoproteica è caratterizzata da specifiche apoproteine.

Nei chilomicroni le apoproteine presenti sono principalmente ApoB48 , ApoAI e ApoC oltre a piccole quantità di ApoAII, ApoAIV, ApoE.

Le VLDL sono lipoproteine ricche in trigliceridi e insieme alle IDL sono costituite principalmente da ApoB100, le varia ApoC e ApoE. Le LDL sono più piccole delle VLDL e possiedono un rapporto componente proteica componente lipidica più elevato. L' ApoB100 rappresenta il 95% circa delle apolipoproteine presenti, sono inoltre presenti ApoC e Ap E.

Le HDL sono le più piccole e pesanti tra le lipoproteine. Circa il 45% è costituito da apo nelle seguenti proporzioni: 65% ApoAI, 10-23% ApoAII, 5-15% ApoCI, 1-3% ApoE oltre a tracce di ApoAIV (Figura 4).

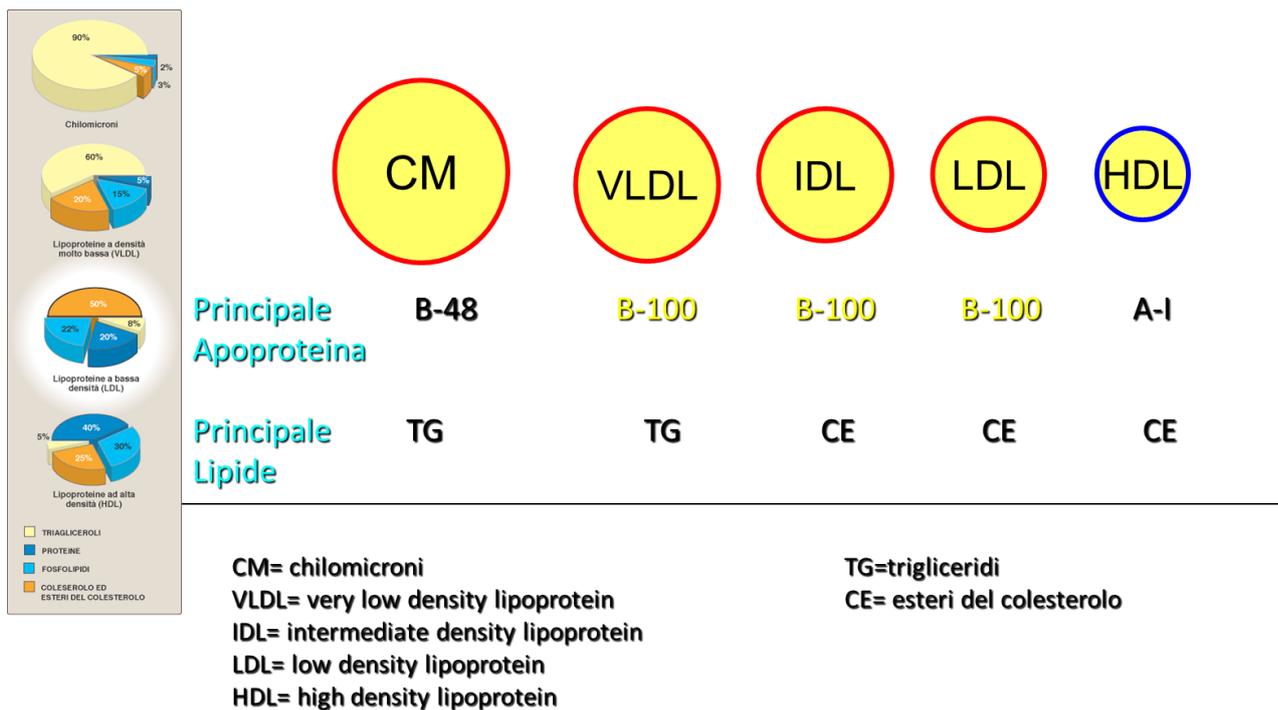


Figura 4: Composizione delle lipoproteine.

1.2 Metabolismo delle lipoproteine

Il destino dei lipidi nel plasma segue tre vie principali: la prima, la via esogena, rende conto del metabolismo dei lipidi introdotti con la dieta ed è legata principalmente ai chilomicroni; la seconda, la via endogena, ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato; la terza, il trasporto inverso del colesterolo, ha come protagonisti principali le HDL e catalizza il ritorno del colesterolo al fegato per le vie metaboliche finali. Sia la via esogena che quella endogena contribuiscono ai livelli di lipidi circolanti (Figura 5).

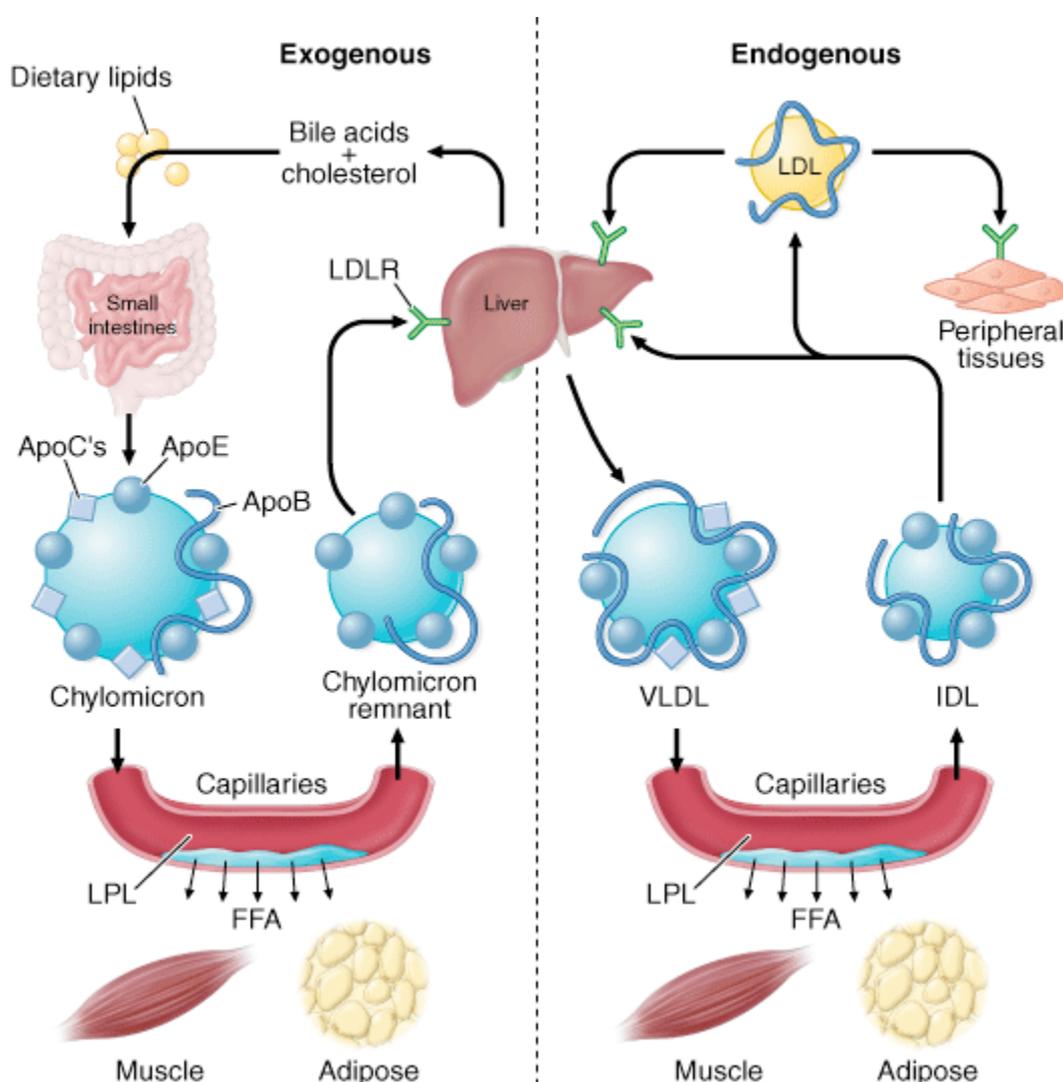


Figura 5: Metabolismo delle lipoproteine: la via esogena e la via endogena.

1.3 La via esogena del colesterolo

La via esogena inizia con l'assorbimento dei lipidi a livello intestinale. Dopo l'assorbimento dal tratto gastroenterico, il colesterolo ed i trigliceridi provenienti dalla dieta sono associati ad una serie di apoproteine a formare i chilomicroni. I chilomicroni sono sintetizzati nelle cellule epiteliali dell'intestino tenue e vengono rilasciati nella circolazione sanguigna attraverso le vie linfatiche. Appena i chilomicroni passano nei capillari entrano in contatto con la lipoprotein lipasi (LPL) associata alle cellule endoteliali. L'ApoC-II associata ai chilomicroni, attiva l'LPL che idrolizza i trigliceridi a glicerolo e acidi grassi liberi che vengono captati rapidamente dal muscolo e dal tessuto adiposo. L'ApoE presente sulla superficie dei chilomicroni favorisce l'ancoraggio agli eparansolfato-proteoglicani (HSPG) della membrana cellulare rendendo accessibili i chilomicroni all'azione della LPL. L'ApoCI e l'ApoCIII hanno un'azione inibitoria sui processi lipolitici in quanto facilitano la dissociazione dell'ApoE dalle lipoproteine, oltre ad essere in grado di mascherare i siti di legame per la LPL ed ad inibire l'azione dell'ApoCII. In seguito all'azione lipolitica mediata dalla LPL, il centro dei chilomicroni, ricco in trigliceridi, progressivamente condensa portando ad un eccesso di componenti dello scheletro esterno (FC, PL, ApoAI, e ApoAII) che vengono trasferiti alle HDL nascenti. Contemporaneamente i chilomicroni ricevono dalle HDL ApoE e le varie ApoC. In seguito a queste modificazioni e alla perdita di trigliceridi i chilomicroni si trasformano in particelle più piccole definite remnants dei chilomicroni.

I chilomicroni residui sono raccolti dal fegato in un processo di endocitosi mediata da recettori: il legame tra apoproteine E e recettori specifici sulla superficie degli epatociti promuove la captazione della particella che viene poi degradata nei lisosomi; più del 50% dei remnants dei chilomicroni vengono captati dal fegato attraverso l'interazione con il recettore delle LDL (LDLR). Esiste tuttavia un'altra via attraverso la quale i remnants dei chilomicroni vengono captati nel fegato, quella che coinvolge il passaggio di queste particelle attraverso le fenestrature tra le cellule endoteliali dei capillari epatici, dove i remnants si legano agli HSPG facilitandone l'interazione con un altro recettore della famiglia dei LDLR, l'LRP (proteina legata al recettore delle lipoproteine), un recettore di superficie in grado di legare diversi ligandi tra cui lipoproteine, proteasi e inibitori di proteasi responsabile dell'endocitosi.

Quindi la funzione dei chilomicroni è quella di trasferire i triacilgliceroli alimentari ai tessuti per il mantenimento dei depositi o per le loro necessità energetiche. Inoltre,

trasportano il colesterolo alimentare al fegato che lo immette nella bile in forma immodificata o dopo conversione ad acidi biliari e lo distribuisce ai tessuti extraepatici mediante altre lipoproteine.

1.4 La via endogena del colesterolo

La via endogena ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato ed è sempre attiva anche se la maggiore attività si ha nella fase post-prandiale. Lipidi di nuova sintesi sono aggiunti alle particelle residue andando a costituire le VLDL, ricche in trigliceridi, le quali verranno poi rilasciate nella circolazione sistemica.

L'assemblaggio delle VLDL ha inizio ad opera della proteina di trasferimento microsomiale (MTP) che trasporta i lipidi verso l'apolipoproteina B-100, in corso di sintesi. In funzione dell'ulteriore associazione con lipidi, che avviene in un secondo tempo, si generano VLDL di diverse dimensioni: dalle VLDL 1, ricche in trigliceridi, a quelle più piccole e dense, ricche in colesterolo esterificato chiamate VLDL 3. Una volta in circolo, le VLDL, così come i chilomicroni, sono soggette all'azione lipolitica della LPL, che idrolizza il core ricco in trigliceridi, aumentando la percentuale di colesterolo esterificato; le particelle a questo punto diventano più piccole e più dense e vengono chiamate IDL. Le componenti del guscio esterno in eccesso, in particolare FC, PL, le varie ApoC e l'ApoE sono trasferite alle HDL. La grande maggioranza dei remnants sono catturati nuovamente dal fegato con un meccanismo simile a quello dei remnants dei chilomicroni.

Le IDL vengono metabolizzate dalla LPL e dalle lipasi endoteliale (LIPG) che mostra una spiccata affinità per le IDL. Dalla lipolisi delle IDL si generano le LDL, ricche in colesterolo esterificato e con un minor contenuto di trigliceridi rispetto alle VLDL. La particella LPL è captata dall' LDLR espressa in tutte le cellule di mammifero, capace di riconoscere come ligandi sia l'ApoB100 che l'ApoE. Le particelle legate sono internalizzate per endocitosi e vanno nei lisosomi, dove una esterasi lisosomiale, la lipasi acida, idrolizza gli esteri del colesterolo rendendo tale lipide disponibile per una serie di reazioni, quali la formazione di membrane, la sintesi di ormoni steroidei, ecc. Prima di interagire con i recettori cellulari, le LDL possono subire modificazioni legate principalmente all'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP), che media il trasferimento di trigliceridi e

colesterolo esterificato tra lipoproteine. In particolare, i trigliceridi delle VLDL sono trasferiti alle LDL e alle HDL in cambio di esteri del colesterolo. Questi interscambi diminuiscono il contenuto di colesterolo estere delle LDL e aumentano il contenuto di trigliceridi, rendendo queste particelle più suscettibili all'azione lipolitica dalla parte della HL. Il risultato finale è la formazione di LDL più piccole e dense ritenute più aterogene delle LDL normali.

1.5 HLD e il trasporto inverso del colesterolo

Le HDL, le lipoproteine plasmatiche più piccole e dense, sono molto eterogenee e consistono di un numero di discrete sottopopolazioni che variano per dimensioni, densità, carica superficiale e composizione. Molte di queste particelle HDL contengono un core idrofobico di colesterolo esterificato ed una piccola quantità di trigliceridi circondato da uno monostrato di fosfolipidi, colesterolo libero e apolipoproteine. Le principali apolipoproteine che troviamo nelle HDL sono ApoAI e ApoAII, in minima parte anche ApoAIV, ApoCI/CII/CIII, ApoD, ApoE, ApoJ, ApoL e ApoM. La fisiologia delle HDL è complessa e coinvolge numerosi pathway.

Nel loro percorso all'interno dell'organismo le HDL subiscono un continuo rimodellamento da parte di fattori plasmatici e cellulari, e questo giustifica la loro eterogeneità nel plasma umano (Rye et al.,1999). Infatti, a seconda del criterio di separazione e di identificazione usato, si possono distinguere:

- particelle discoidali o sferiche, utilizzando il microscopio elettronico;
- due principali frazioni, HDL2 ($1,063 < \text{densità} < 1,125$ g/ml) e HDL3 ($1,125 < \text{densità} < 1,21$ g/ml) quando separate, in base alla densità, tramite ultracentrifugazione;
- cinque sottopopolazioni differenti di HDL (in ordine di dimensioni decrescenti HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b e HDL3c), tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti;
- A-I HDL e A-I/A-II HDL, sulla base della composizione apolipoproteica;

- popolazioni di HDL a diverso grado di migrazione, utilizzando l'elettroforesi su gel di agarosio (Figura 6).

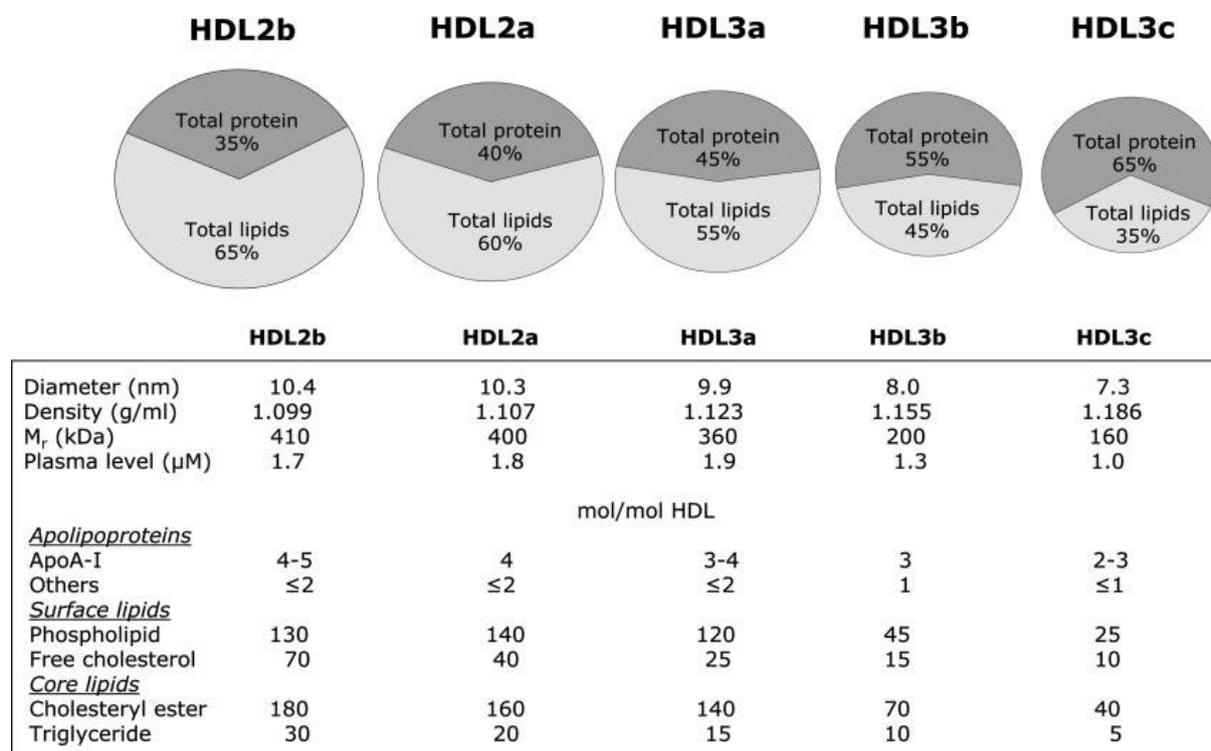


Figura 6: Classificazione delle HDL.

Le HDL sono lipoproteine “protettive” che diminuiscono, in generale, il rischio di patologie indotte dall’aterosclerosi; quindi, elevati livelli di HDL sono desiderabili e rappresentano un obiettivo da perseguire in tutti i soggetti e, in particolare, in alcuni sottogruppi di soggetti.

L’effetto protettivo delle HDL è dovuto a numerosi meccanismi, come:

- trasporto inverso di colesterolo; questo è un processo attraverso cui il colesterolo in eccesso, acquisito dalle cellule, viene trasferito al fegato e secreto
- prevenzione dell’ossidazione delle lipoproteine, inibizione dell’ossidazione del LDL-C, (“effetto antiossidativo”),
- azione antinfiammatoria, inibizione dell’espressione di molecole di adesione e del reclutamento di monociti, (“effetto antinfiammatorio”) (Diamond et al., 2008; Shah et al., 2001),
- attività antiattivazione e antiaggregante delle piastrine, (“effetto antitrombotico”) (Diamond et al., 2008; Shah et al., 2001),
- attività anticoagulante, (“effetto anticoagulante”) (Diamond et al., 2008),
- attività profibrinolitica (“effetto profibrinolitico”) (Shah et al., 2001).

Il metabolismo delle HDL è complesso a causa dei molteplici meccanismi con cui le particelle HDL sono sintetizzate e, poi, sono modificate, nel plasma.

L'ApoAI rappresenta la principale apoproteina delle HDL e risulta indispensabile per la loro produzione.

Tutte le cellule nucleate sintetizzano colesterolo, ma solo gli epatociti e gli enterociti possono espellere efficacemente il colesterolo dal corpo, nella bile o nel lume intestinale. Nel fegato, il colesterolo è espulso nella bile, direttamente o dopo conversione ad acidi biliari. Il colesterolo delle cellule periferiche è trasportato al fegato e all'intestino, per mezzo di un processo centripeto che riporta il colesterolo al fegato per le vie metaboliche finali. Le HDL giocano un ruolo fondamentale in questo meccanismo denominato trasporto inverso del colesterolo (Figura 7). Le HDL potrebbero attenuare o rallentare la formazione di lesioni aterosclerotiche mediante l'efflusso di colesterolo e fosfolipidi dalle cellule dei tessuti periferici favorendo il trasporto di tali composti al fegato.

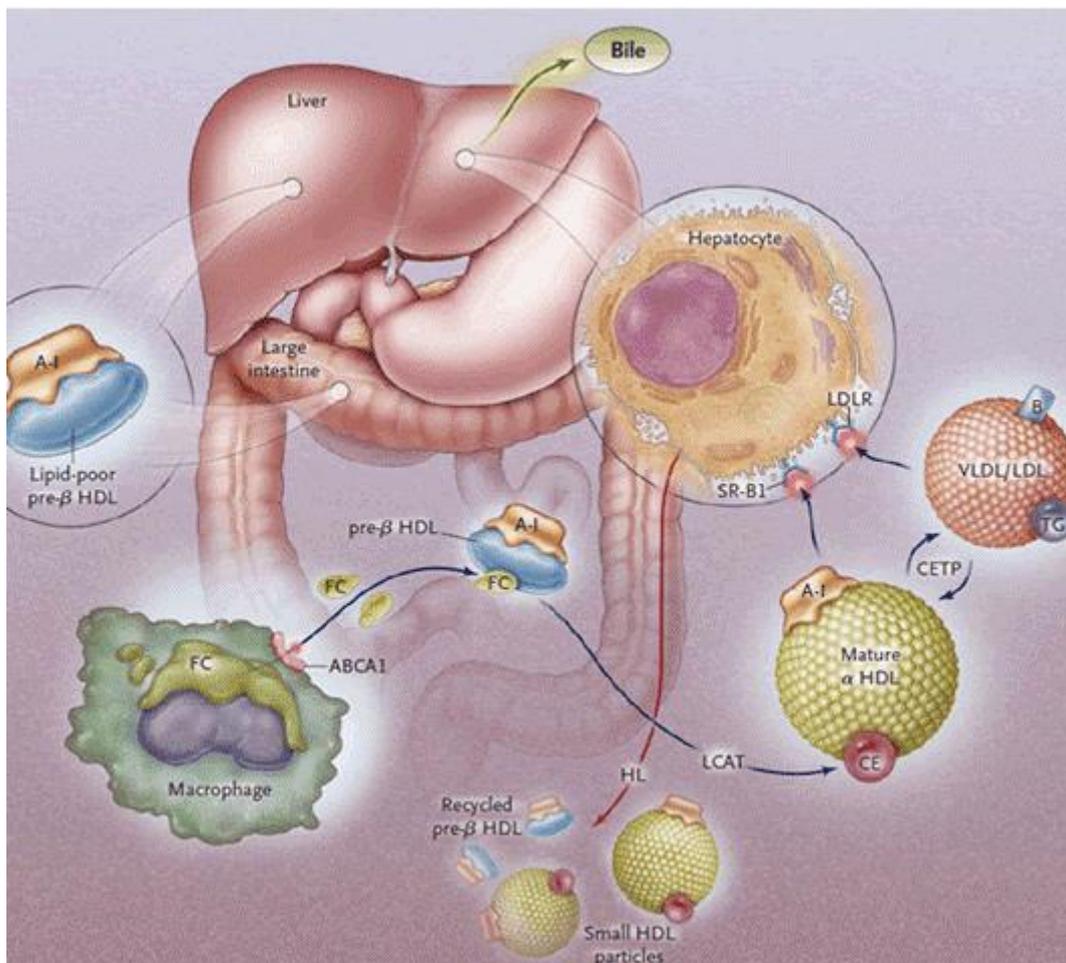


Figura 7: Il trasporto inverso del colesterolo.

Le HDL nascenti (sferoidali) vengono secrete dal fegato e dall'intestino come apoAI povere in lipidi o piccole particelle contenenti ApoAI e fosfolipidi. Queste particelle raccolgono colesterolo rilasciato nel plasma da cellule in disfacimento e dal turnover delle membrane diventando pre-beta HDL. L'efflusso di colesterolo dalle cellule alle pre-beta HDL avviene mediante una serie di meccanismi che prevedono sia l'utilizzo di trasportatori sia la diffusione passiva. ABCA1 è una proteina cellulare che facilita il passaggio del colesterolo cellulare alle ApoAI povere di lipidi. Le cellule periferiche ed in particolare i macrofagi sono dotati di altre vie di efflusso di colesterolo in eccesso verso le HDL, quali le proteine ABCG1 e ABCG4.

Una volta incorporato nelle pre-beta HDL il colesterolo è esterificato dall'enzima LCAT che utilizza apoAI come cofattore trasformando le pre-beta HDL in alfa HDL mature, pronte ad essere trasportate al fegato attraverso due vie distinte:

- In un primo caso, le HDL ricche in colesterolo esterificato cedono questo lipide alle lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL, IDL) attraverso la proteina CETP che poi vengono intercettate dal fegato mediante specifici recettori e rimosse dalla circolazione.
- Una seconda via prevede che il colesterolo esterificato può essere rimosso dalle HDL proprio a livello epatico, grazie a specifici recettori (SR-BI) che consentono di svuotare le HDL dal loro contenuto e rigenerare nuove pre-beta HDL, senza internalizzare la particella lipoproteica.

Il ciclo si conclude poi con il rimodellamento delle alfa-HDL mature e la rigenerazione delle molecole di ApoAI iniziali (Barter et al 2002).

CAPITOLO II: Le dislipidemie

Le dislipidemie costituiscono un gruppo di alterazioni del metabolismo lipidico che si manifestano con un aumento (iperlipoproteinemia) o una riduzione (ipolipoproteinemia) della concentrazione delle lipoproteine plasmatiche e/o una loro alterazione qualitativa.

Le dislipidemie possono essere classificate in primitive e secondarie.

Le forme primitive sono causate da alterazioni metaboliche ereditarie di tipo monogenico o poligenico, coinvolgenti uno o più geni attivi nel metabolismo lipoproteico; sono però anche sensibili a influenze ambientali di tipo alimentare.

Le forme secondarie sono dipendenti dalla presenza di un'altra malattia primitiva, che ha come conseguenza un'alterazione del metabolismo lipidico, o dall'utilizzo di farmaci o altre sostanze esogene che possono interferire sulle medesime vie metaboliche.

Da un punto di vista nosografico esistono e sono state adottate nel tempo diverse classificazioni delle dislipidemie, a seconda che si voglia considerare:

- l'alterazione lipidica fondamentale (ipercolesterolemie, ipertrigliceridemie, forme miste;)
- l'aspetto fenotipico (classificazione di Fredrickson);
- deficit genetico (forme mono-geniche e poligeniche);
- oppure in base alla causa patogenetica (dislipidemie primitive e secondarie)

A queste va aggiunta la classificazione proposta dal NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III) nell'ultima revisione del 2004: questa è la più recente e rappresenta le linee guida sulla prevenzione cardiovascolare a livello mondiale.

La stima del rischio coronarico globale si basa sull'algoritmo sviluppato dalla coorte di Framingham e utilizza i risultati di tale stima per graduare gli interventi sui livelli di colesterolo LDL. L'approccio dell'ATP-III considera i livelli di colesterolo LDL in relazione al rischio assoluto di eventi coronarici del paziente in esame, fissando per ogni livello di rischio un valore obiettivo da raggiungere mediante la correzione dello stile di vita o l'impiego di farmaci antidislipidemici

2.1 Classificazione di Friedrickson

La prima classificazione delle dislipidemie fu proposta da Friedrickson nel 1967 e successivamente fatta propria dall'Organizzazione mondiale della Sanità. Essa distingue sei profili lipoproteici plasmatici (fenotipi) caratterizzati in base all'aumento selettivo di alcune classi lipoproteiche.

L'iperlipoproteinemia di tipo I è caratterizzata da un aumento di chilomicroni e viene pertanto definita iperchilomicronemia o anche ipertrigliceridemia esogena, in quanto sono aumentati i trigliceridi di provenienza alimentare. I pazienti affetti caratteristicamente mostrano un aumento del chilomicroni plasmatici dopo un pasto contenente grassi, che non transitorio ma prolungato, e tale che il siero appare ancora lattescente oltre 12 ore dopo l'assunzione di cibo.

L'iperlipoproteinemia di tipo IIa è caratterizzata da un aumento delle LDL e, quindi, del colesterolo esterificato, che viene trasportato da tali lipoproteine.

L'iperlipoproteinemia di tipo IIb rappresenta una variante della forma IIa, in cui, oltre all'aumento di LDL si ha un incremento anche delle VLDL contenenti trigliceridi.

Nell'iperlipoproteinemia di tipo III si osserva un aumento tanto del colesterolo quanto dei trigliceridi, in assenza di incremento di alcuna lipoproteina normale; di fatto in questa forma di ipelipoproteinemia sono aumentati i remnant VLDL.

L'iperlipoproteinemia di tipo IV è caratterizzata da un aumento delle VLDL e quindi dei trigliceridi. E' importante notare come, sia nell'iperlipoproteinemia di tipo I sia in quest'ultima di tipo IV, i livelli di trigliceridi sono elevati. Nel primo caso, tuttavia, si tratta di un aumento dei trigliceridi di origine esogena presenti nei chilomicroni, mentre nel secondo di quelli endogeni, sintetizzati dal fegato e veicolati dalle VLDL.

L'iperlipoproteinemia di tipo V è caratterizzata da un aumento di trigliceridi sia endogeni che esogeni e può essere quindi considerata come una combinazione della forma I e della forma IV.

Questa classificazione in uso per molti anni, costituisce tutt'ora un sistema di riferimento per indicare determinati pattern di alterazioni lipoproteiche. Il suo limite consiste nel fatto che nell'ambito dello stesso pattern si incontrano alterazioni metaboliche eterogenee,

inoltre essa considera le dislipidemie come quadri sindromici e non come malattie, prescinde dalle acquisizioni fisiopatologiche e non differenzia le forme familiari dalle acquisite.

Attualmente si propende per la classificazione delle iperlipoproteine su base genotipica, con cui si definisce l'alterazione in base al difetto molecolare identificato.

Stessi fenotipi possono essere il risultato di cause diverse, così come lo stesso difetto molecolare può produrre fenotipi diversi.

E' quindi utile ricorrere ad una classificazione che tenga conto dell'aspetto patogenetico e genotipico.

Possiamo distinguere così dislipidemie primitive da quelle secondarie: le prime si basano su alterazioni biochimico-genetiche che determinano difetti molecolari nella sintesi e/o nella funzionalità o nella degradazione delle lipoproteine(turn-over); in base al tipo di alterazione lipidica, queste si suddividono in:

- ipercolesterolemie
- ipertrigliceridemie
- forme miste
- forme con bassi livelli di HDL

2.2 ApoA1

Il gene che codifica per l'apolipoproteina A1 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11 (11q23). E' costituito da 4 esoni, con una sequenza codificante interrotta da due introni da 185 e 588 bp (Figura 8).

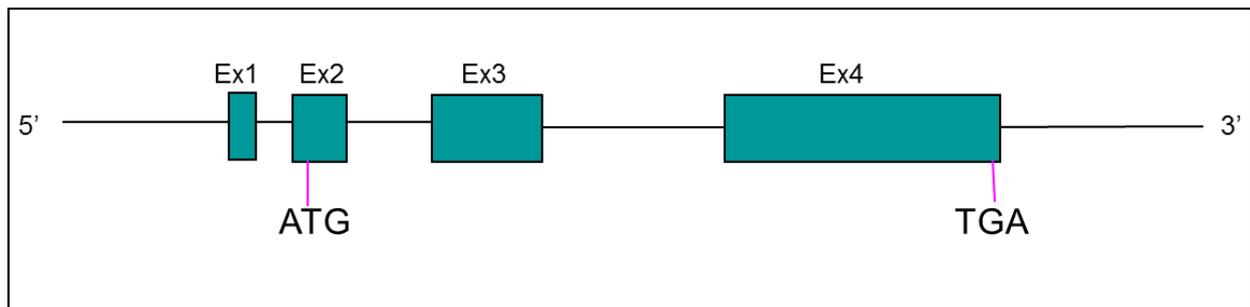


Figura 8: Il gene ApoA.1.

ApoA1 si trova in un cluster di circa 17 Kb insieme ai geni che codificano per ApoC-III e ApoA-IV che derivano molto probabilmente dallo stesso gene ancestrale.

(Karathanasis SK; 1985).

Il gene ApoA1 è principalmente espresso a livello epatico e intestinale e l' mRNA dà origine ad una proteina immatura di 267 aminoacidi che comprende un peptide segnale e un pro peptide; in seguito a successivi tagli proteolitici ha origine la proteina matura costituita da 243 aminoacidi. ApoA1 rappresenta il principale componente delle HDL e la sua concentrazione nel plasma è di 1.0-1.5 mg/ml.

Essa gioca diversi ruoli importanti sia come proteina strutturale, con funzione di stabilizzare la struttura delle HDL, sia nell'origine e nella maturazione delle HDL, sia come cofattore per l'enzima LCAT (Mahley W. et al, 1984). Inoltre essa rappresenta il principale substrato di ABCA1 proteina che media l'efflusso di colesterolo al di fuori delle cellule.

La proteina ApoA1, contiene otto domini da 22 aminoacidi e due domini da 11 aminoacidi, tutti costituiti di eliche antipatiche disposte in tandem che costituiscono circa l'80% della proteina. (Tanaka M. et al.,2013).

In particolare la struttura cristallografica ha mostrato come l' N-terminale sia formato da un fascio di 4 alfa eliche con un nucleo idrofobico mentre il C-terminale sia formato da due alfa eliche (Ajees et al.,2006).

Attraverso studi con peptidi sintetici corrispondenti a ciascuna α -elica, è stato dimostrato che l'elica 1 e l'elica 10 hanno una grande affinità di legame per i fosfolipidi (Gillotte KL, et al., 1999; Vedhachalam C, et al., 2004); tuttavia, esse possono mediare l'efflusso da ABCA1 solo se legate covalentemente all'elica 9, e non singolarmente. Tale legame produce una linea di residui amminoacidici acidi lungo la faccia polare delle eliche, suggerendo che questo, per l'ApoAI, possa essere un determinante strutturale significativo per la promozione dell'efflusso ABCA1-mediato (Natarajan P, et al., 2004).

A sostegno di ciò, alcuni studi, hanno mostrato che mutanti tronchi di ApoA1 nella porzione carbossi-terminale, privi dell'elica 10, non erano in grado di rimuovere colesterolo cellulare attraverso ABCA1 (Panagotopoulos et al., 2002).

Il legame di ApoA-1 ha un effetto anche sulla stabilità della proteina ABCA1. In seguito al legame, il rapido turn over ($t_{1/2}$ - 1-2 ore) di questo trasportatore trans-membrana viene drasticamente rallentato (Arakawa et al., 2002).

Sono stati proposti due meccanismi per spiegare tale azione: il primo prevede che ApoAI interferisca con la fosforilazione del motivo PEST, un tetrapeptide che avvia le proteine alla degradazione, riducendo così la proteolisi mediata dalla calpaina (Martinez et al., 2003); il secondo, suggerisce che la rimozione della sfingomieline dalla membrana da parte delle apolipoproteine attiva la fosfatidilcolina-fosfolipasi C, la quale dà l'avvio alla fosforilazione di un sito capace di stabilizzare la proteina ABCA1 (Yamauchi Y, et al., 2003).

Resta da chiarire, tuttavia, quale dei due meccanismi sia prevalente o se entrambi agiscano di concerto nel processo di stabilizzazione.

Possiamo classificare le mutazioni in questo gene in 3 categorie:

-Mutazioni sul dominio N-terminale, sono associate a amiloidosi. Questa malattia è un disordine del metabolismo proteico caratterizzata dalla progressiva deposizione di fibrille di amiloide prevalentemente costituite da frammenti N-terminali di ApoAI. I depositi di amiloide interessano prevalentemente i reni, il cuore e il fegato.

-Mutazioni sul dominio centrale, di cui solo alcune sono associate a difetti nel legame con i lipidi.

-Mutazioni sul dominio C-terminale, associate a mancata formazione di particelle HDL mature in quanto questo dominio è importante per l'associazione con i lipidi nel processo di formazione delle lipoproteine.

Il deficit totale o parziale, dovuto a mutazioni di questa proteina, causano ridotti o assenti livelli di HDL.

Il risultato è una profonda riduzione di HDL-C (< 5 mg/dl) e un'assenza di ApoAI plasmatiche. I livelli dei trigliceridi e delle LDL-C risultano nella norma. Questi livelli negli eterozigoti risultano la metà dei controlli sani (Santos et al., 2008).

L'importanza clinica di questo gene è stata scoperta per la manifestazione precoce di CAD che caratterizzava le famiglie di soggetti con ipoalfalipoproteinemia (Miller et al., 2004).

Nei soggetti colpiti da mutazioni in questo gene si assiste ad un aumento dei depositi di colesterolo a livello delle cellule periferiche per assenza della ApoAI, con formazione di xantomi e opacità corneali, oltre che la manifestazione di malattia coronarica dopo i 40 anni.

A differenza dei soggetti affetti da malattia di Tangier, dovuta a mutazioni del gene ABCA1, le tonsille sono di morfologia e dimensioni nella norma. A livello oculare possono essere presenti depositi corneali.

2.3 LPL

Il gene LPL è localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 8 (8p22) con una lunghezza di 35 kb. Esso è caratterizzato da 10 esoni e 9 introni e codifica per una proteina di 475 aminoacidi compreso il peptide segnale. La proteina matura di 448 aminoacidi si ritrova nel plasma e sulla superficie cellulare (Figura 9).

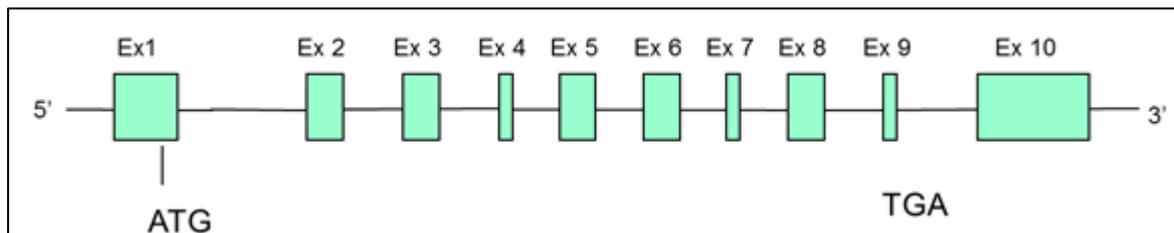


Figura 9: Il gene LPL.

LPL è un enzima chiave nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi quali chilomicroni e VLDL.

Essa è espressa in diversi tessuti, quali adiposo, muscolare, cardiaco e ghiandola mammaria, con una regolazione specifica per ognuno di essi. Viene prodotta, in minor misura, anche nelle ghiandole surrenali, in alcune cellule neuronali, nell'aorta toracica, nella milza, nel polmone e nel rene (Camps et al, 1990).

LPL insieme con la lipasi pancreatica e la lipasi epatica, appartiene alla superfamiglia delle lipasi (Winston et al;1992), tutti e tre questi enzimi sono codificati da geni che probabilmente derivano da un comune gene ancestrale.

LPL è una glicoproteina composta da due subunità identiche. Ogni subunità ha un grande dominio N-terminale (1-312) e uno più piccolo C-terminale (312-348), connesse da una regione peptidica flessibile. La porzione C-terminale è necessaria per il legame al substrato lipoproteico, mentre nella regione N-terminale, in cui sono localizzati 3 siti di glicosilazione, risiede l'attività catalitica (Mead et al., 2002).

Il dominio C-terminale include un ulteriore sito di legame per l'eparina e per l'eparan-solfato dei proteoglicani, e un sito di legame per i substrati lipidici, il quale conferisce specificità alla lipasi. L'enzima presenta un'altra regione funzionalmente molto importante,

che include 10 residui di cisteina, implicati nella formazione di 5 ponti disolfuro e aminoacidi che sono essenziali per la dimerizzazione e per la sua stabilità (Hata et al, 1992; Keiper et al, 2001).

La forma attiva della proteina è un omodimero non covalente la cui dissociazione porta ad un'inattivazione irreversibile dell'enzima (Osborne et al, 1985) (Figura 10).

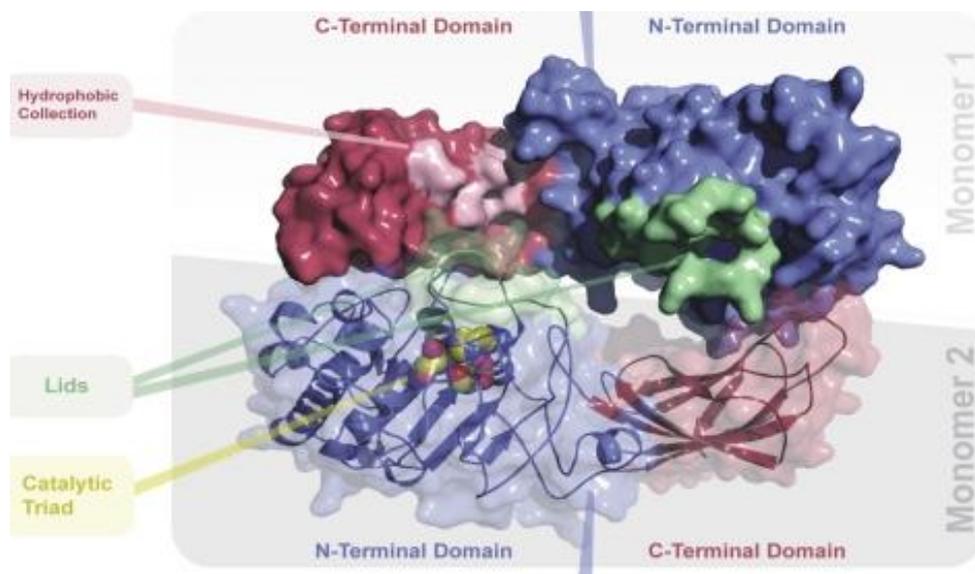


Figura 10: La proteina LPL.

Sebbene il sito fisiologico di azione per la LPL sia la superficie luminale dei vasi sanguigni, dove l'enzima può interagire con le lipoproteine circolanti, le cellule dell'endotelio vascolare non sintetizzano LPL. Essa infatti viene sintetizzata come precursore inattivo nel reticolo endoplasmatico ruvido delle cellule parenchimali. Dopo una serie di trasformazioni post-traduzionali, è attivata, mediante progressive N-glicosilazioni, nell'apparato del Golgi, da dove è secreta in vescicole secernenti e diretta o ai lisosomi o alla superficie delle cellule parenchimali, dove va a legarsi all'eparan-solfato dei proteoglicani. Infine, in presenza di fattori stimolanti, come l'eparina, la LPL viene trasportata sulla superficie dell'endotelio vasale, dove si lega alla parte terminale dei proteoglicani, grazie a interazioni di natura elettrostatica (Goldberg 1996).

LPL gioca un ruolo chiave nel metabolismo lipidico, catalizzando la reazione di idrolisi dei trigliceridi contenuti nelle VLDL e nei chilomicroni; durante questa reazione di lipolisi, fosfolipidi e altre apolipoproteine sono trasferite da queste lipoproteine alle HDL.

La LPL richiede, per la sua ottimale attività, la presenza dell'apolipoproteina C-II, parte integrante delle lipoproteine ricche in trigliceridi quali chilomicroni e VLDL.

Molti studi hanno suggerito un'associazione tra i polimorfismi di questo gene e un aumentato rischio di CAD, correlato ad elevati livelli di trigliceridi e bassi livelli di HDL.

La riduzione o la perdita parziale o totale dell'attività catalitica è influenzata dal tipo di mutazione e dallo stato della stessa: la conseguenza sono elevati livelli di trigliceridi, aumento dei chilomicroni e VLDL, bassi livelli di HDL.

Infatti questo enzima influenza indirettamente i livelli delle HDL mediante l'idrolisi dei trigliceridi contenuti nelle beta lipoproteine (chilomicroni e VLDL): questi ultimi in seguito all'idrolisi si riducono di dimensioni e liberano apolipoproteine e fosfolipidi che vengono captati dalle alfa lipoproteine.

Mutazioni che interessano il gene che codifica per la LPL, possono condurre a un deficit totale dell'attività dell'enzima come avviene nella sindrome chilomicronemica, una rara patologia a trasmissione autosomica recessiva. La malattia si caratterizza per una massiva ipertrigliceridemia con presenza di chilomicroni a digiuno, il colesterolo totale è spesso aumentato in quanto aumenta la quota trasportata dalle lipoproteine ricche in trigliceridi, mentre il colesterolo HDL e LDL è basso.

La diagnosi viene in genere posta in età pediatrica per la comparsa di dolore addominale ricorrente: si tratta di episodi di pancreatite acuta, dal momento che nei capillari pancreatici i chilomicroni sono esposti all'azione della lipasi pancreatica che idrolizza in parte i trigliceridi e i fosfolipidi, con formazione di acidi grassi e liso lecitina che sono tossici per il parenchima epatico. I trigliceridi sono inoltre captati dagli istiociti cutanei e dalle cellule del sistema reticolo-endoteliale dando luogo a xantomi eruttivi (localizzati alle natiche e alla superficie estensoria degli arti) e a splenomegalia.

2.4 LCAT

Il gene umano dell'LCAT comprende 4.2 kilobasi, è localizzato sul cromosoma 16q22 ed è costituito da 6 esoni (Figura 11).

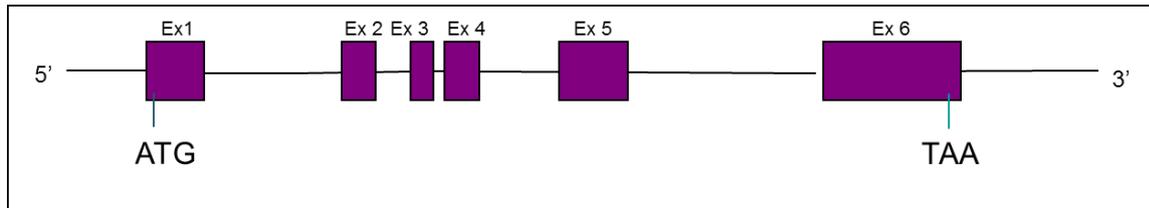


Figura 11: Il gene LCAT.

È principalmente espresso nel fegato, anche se una piccola quantità si trova anche nel cervello e nei testicoli.

La proteina matura è secreta nel plasma. Essa è una glicoproteina di 416 aminoacidi con una massa molecolare di 63 KD, più grande della massa calcolata sulla base della sequenza aminoacidica. Tale differenza del 20% è dovuta principalmente alla presenza di catene glucidiche legate a quattro siti di glicosilazione amino-terminali funzionalmente importanti.

La concentrazione plasmatica di LCAT, circa 6 mg/l, varia poco negli adulti con l'età, il genere, gli ormoni, il consumo di alcol e il fumo di sigaretta (Albers et al., 1982).

Nel sangue LCAT lega preferenzialmente le HDL, solo una piccola quantità di LCAT circolante lega lipoproteine contenenti ApoB (Chen et al., 1982).

LCAT è attivato da APOAI e la reazione catalizzata consiste nel trasferimento dell'acido grasso in sn-2 della lecitina all'ossidrile in 3 del colesterolo, con formazione di colesterolo esterificato e lisolecitina tramite una reazione di esterificazione che coinvolge la triade catalitica Asp-His-Ser (Jonas 2000).

La formazione e l'accumulo di esteri del colesterolo nel core delle HDL non solo rimuove il colesterolo dalla superficie delle HDL promuovendo il flusso di colesterolo dalle membrane cellulari dentro le HDL, ma cambia anche la morfologia delle particelle HDL. Le particelle discoidali HDL si costruiscono un core di colesterolo esterificato e diventano sferiche crescendo in dimensioni. Trasferimenti successivi catalizzati dall'enzima CETP, permetteranno il trasferimento degli esteri del colesterolo dall' HDL alle LDL e VLDL.

Infatti la maggior parte del colesterolo nelle lipoproteine circola come colesterolo esterificato prodotta dall'azione enzimatica dell'LCAT.

L'enzima LCAT è dotato di due attività catalitiche: un'attività fosfolipasica che stacca l'acido grasso dalla fosfatidilcolina e un'attività transacetilasica che esterifica il colesterolo con l'acido grasso. Queste due attività rappresentano la causa principale della formazione di colesterolo esterificato nel plasma umano.

L'enzima LCAT gioca un ruolo centrale nella formazione e nella maturazione delle HDL, e nello stadio intravascolare del trasporto inverso del colesterolo, principale meccanismo attraverso cui le HDL modulano lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi. Un difetto nella funzionalità di LCAT aumenta il processo aterosclerotico, interferendo nello step del trasporto inverso del colesterolo.

Mutazioni nel gene LCAT causano due rare sindromi caratterizzate da ipoalfalipoproteinemia:

-deficienza familiare di LCAT (FLD), caratterizzata dalla completa assenza dell'enzima;

-“fish eye disease” (FED), caratterizzata da una parziale deficienza dell'enzima.

È stato suggerito che LCAT esibisca due differenti attività nel plasma normale: un'attività alfa-LCAT specifica per le lipoproteine che presentano nella corsa elettroforetica una mobilità alfa; e un'attività beta-LCAT specifica per le particelle pre-beta e beta migranti (VLDL e LDL).

La FED è classificata come una deficienza di attività alfa-LCAT, mentre la FLD dovrebbe essere il risultato della mancanza di entrambe le attività enzimatiche.

Nei soggetti con FLD, l'LCAT non viene sintetizzato o è completamente inattivo, e la quasi totalità del colesterolo plasmatico è in forma non esterificata. L'accumulo di lipidi in vari tessuti è responsabile delle manifestazioni cliniche, che includono opacità corneale progressiva, anemia e glomerulosclerosi focale, che progredisce rapidamente a insufficienza renale (dalla terza-quarta decade d'età), con necessità di terapia emodialitica ed eventualmente trapianto renale. Il primo caso di FED fu descritto da Carlson e Philipson nel 1979 (Carlson et al., 1979). Nei soggetti con FED, l'LCAT perde la capacità di esterificare il colesterolo delle HDL, ma esterifica il colesterolo delle altre lipoproteine; la concentrazione di colesterolo esterificato nel plasma è solo lievemente ridotta rispetto alla norma. Il fenotipo clinico è generalmente meno grave che nei casi di FLD (Santamarina-Fojo et al., 2001.).

2.5 ABCA1 e la malattia di Tangier

Il gene che codifica per ABCA1 mappa sul cromosoma 9 (9q31) ed è costituito da 149 kb, che comprendono 50 esoni e 49 introni, con una regione promoter di 1453 bp (Figura 12).

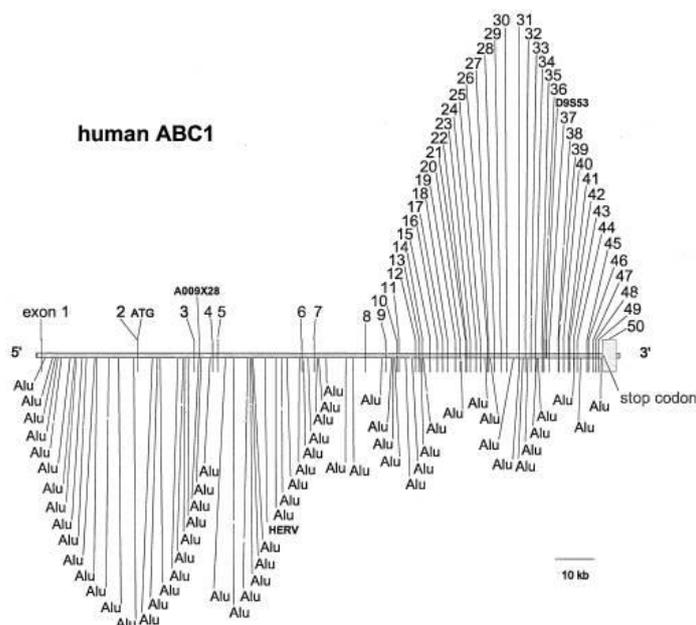


Figura 12: Struttura del gene ABCA1.

La proteina ABCA1 è formata di 2261 aminoacidi con un peso molecolare di 220 kDa ed è espressa nella placenta, fegato, polmone e ghiandole surrenali, oltre che nei tessuti embrionali.

ABCA1 è una proteina integrale di membrana che media il trasporto dall'interno all'esterno della membrana cellulare di colesterolo, fosfolipidi ed altre molecole lipofile, come alfa-tocoferolo (Oram et al., 2001), la ApoE (Von Eckardstein et al., 2001) e interleuchina-1 (Hamon et al., 1997; Zhou et al., 2002).

I trasportatori della classe ABC, presenti in ogni derivazione filogenetica, sono la più vasta famiglia di trasportatori di membrana. Essi sono raggruppati in sette sottoclassi nominate in ordine crescente da ABC-A fino ad ABC-G. Dei 49 ABC-trasportatori individuati nell'uomo, 13 fanno parte della sottoclasse A (Dean et al., 2001).

Mutazioni nei geni che codificano per queste proteine sono causa di diverse malattie, tra cui la fibrosi cistica, la degenerazione maculare di Startgardt e disturbi del metabolismo lipidico e lipoproteico (tra cui la malattia di Tangier e l'ipoalfalipoproteinemia).

Tutti i membri della famiglia ABC sono proteine integrali di membrana e utilizzano ATP come fonte di energia per trasportare metaboliti attraverso le membrane.

Strutturalmente, essi possono essere suddivisi in due gruppi:

1) i trasportatori "interi", come ABCA1 e/o ABCA7, che hanno due unità strutturali simili legate covalentemente e mediano il trasporto di fosfolipidi e colesterolo a particelle prive o povere di lipidi;

2) gli "emi"-trasportatori, caratterizzati da una singola unità strutturale formante sia omodimeri, come ABCG1 e ABCG4, che mediano il trasporto di colesterolo cellulare verso particelle lipidate, sia eterodimeri, come ABCG5/G8, che limita l'assorbimento intestinale e promuove l'escrezione biliare degli steroli (Dean et al., 2001; Oram et al., 2006).

ABCA1 è stato caratterizzato in modo più esteso rispetto agli altri trasportatori

ABCA1 è formata da due unità funzionali simili, unite in successione, ciascuna composta da un dominio trans membrana (TMD) ed un dominio legante nucleotidi (NBD). Il dominio trans membrana è a sua volta costituito da sei alfa-eliche e contiene il sito di legame per il substrato. L'NBD contiene due motivi peptidici altamente conservati, detti Walker A e Walker B, presenti in molte proteine che utilizzano ATP, ed un dominio specifico per gli ABC-trasportatori, detto Walker C. La proteina inoltre, presenta un terminale amminico orientato verso il citosol e due grandi loops extracellulari glicosilati e uniti tra loro dal legame disolfuro di due o più cisteine (Dean et al., 2001) (Figura 13).

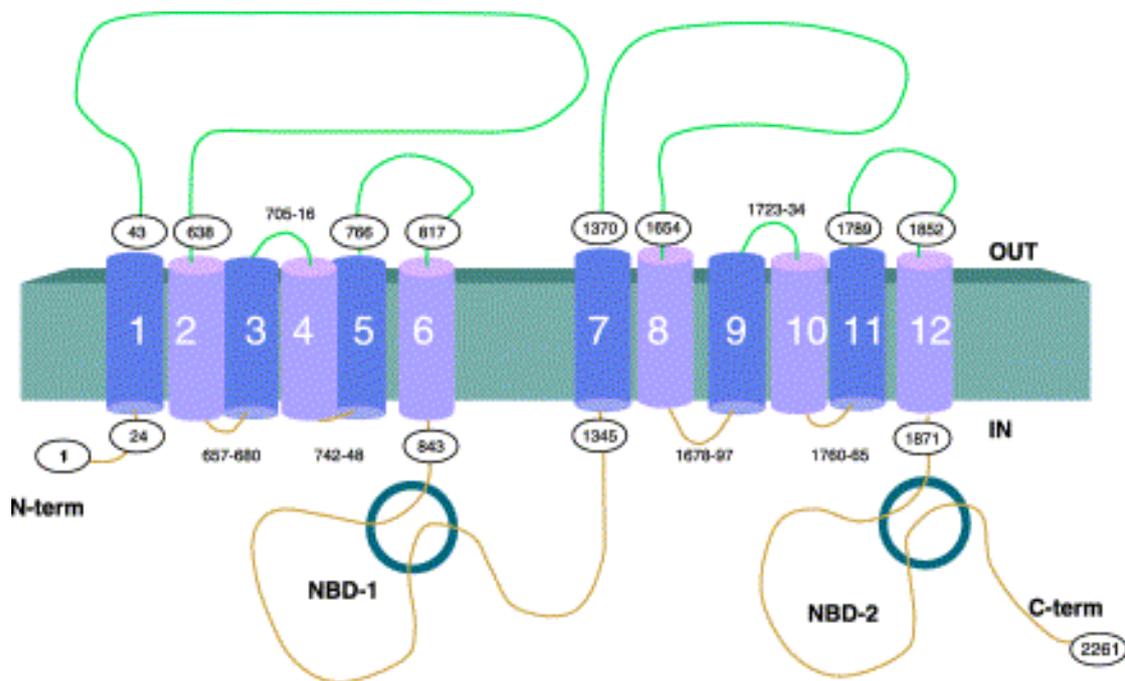


Figura 13: Struttura della proteina ABCA1.

Evidenze sperimentali indicano che, sia nelle membrane intracellulari che nella membrana plasmatica, le molecole di ABCA1 si associano per formare oligomeri, in particolare, unità tetrameriche (Denis et al., 2004).

Mutazioni sul gene ABCA1 causano la malattia di Tangier.

La malattia di Tangier è una delle forme più gravi di deficit di HDL. Il nome della malattia deriva dall'isola di Chesapeake Bay (Virginia, USA), dove vivevano i primi due probandi, come riportato da DS Fredrickosn nel 1961 (Fredrickson et al .,1961).

Dalla sua scoperta, la malattia di Tangier è stata diagnosticata in circa 100 pazienti in molti Paesi.

La malattia di Tangier è un raro disordine autosomico recessivo del metabolismo del colesterolo, caratterizzato da livelli ematici estremamente bassi di lipoproteine ad alta densità o colesterolo HDL, riduzione del colesterolo totale e da un aumento dei trigliceridi nel siero.

La concentrazione di apolipoproteina AI è estremamente bassa a causa della mancanza di HDL mature e ricche di lipidi, cioè di alfa-HDL che rappresentano la maggior parte delle HDL nel plasma normolipidemico (Fitzky et al., 1998).

Gli individui con malattia di Tangier presentano ridotta capacità di trasportare il colesterolo all'esterno delle cellule, portando ad una assenza virtuale di HDL nel sangue e

dall'accumulo di esteri del colesterolo in molti tessuti del corpo: tonsille, fegato, milza, linfonodi, timo, mucosa intestinale, nervi periferici e cornea, causando epatomegalia, splenomegalia, tonsille iperplastiche di colore arancio, retinite pigmentosa, polineuropatia senso-motoria o sensoria distale recidivante (Probst et al., 2004).

Tutti questi segni clinici si combinano in maniera diversa in ogni paziente.

Le mutazioni possono essere classificate in tre gruppi:

1. “mutazioni di difetto di maturazione”, che comprende il numero maggiore di mutazioni. Rientrano in questa categoria le mutazioni che non permettono la giusta maturazione e la successiva localizzazione plasmatica della proteina. Siccome ApoAI interagisce con ABCA1 sulla superficie cellulare, queste mutazioni impediscono tale legame e quindi impediscono l'efflusso di colesterolo.
2. “mutazioni sul sito di legame per ApoAI”. Questo gruppo di mutazioni è rappresentato dalla mutazione C1477R sul secondo dominio extracellulare. Nonostante questa mutazione porti ad una proteina espressa sulla superficie cellulare, viene abolito il sito di legame per ApoAI.
3. “mutazioni di difetto di traslocazione”. Questa classe è rappresentata dalla mutazione W590S sul primo dominio extracellulare. Sebbene questa mutazione non interessi il sito di legame per ApoAI, comunque questa mutazione riduce l'attività del canale.

Fino ad oggi sono state caratterizzate circa 70 mutazioni che causano la malattia. La maggior parte di queste si trova nei domini extracellulari, attraverso i quali avviene molto probabilmente l'interazione con ApoAI.

Perché la malattia si manifesti, è necessaria che vi sia una mutazione a carico di entrambi gli alleli di ABCA1. Però, spesso non è possibile individuare fenotipicamente individui portatori sani di malattia.

CAPITOLO III: Materiali e metodi

3.1 Reclutamento dei pazienti

Attraverso un programma di screening di dislipidemia in età infantile, tra novembre del 2000 e gennaio del 2013 sono stati reclutati tutti i bambini con un'età compresa tra 2 e 18 anni afferenti presso la Clinica Pediatrica del Policlinico Umberto I di Roma che mostravano un profilo lipidico anormale. Alla prima visita, i lipidi e le lipoproteine sono stati misurati sia nei bambini selezionati che nei genitori e nei fratelli disponibili. Inoltre sono state raccolte le informazioni demografiche e cliniche, tra cui la storia familiare di ipertensione, diabete mellito, malattie cardiovascolari e terapie ipolipemizzanti in corso.

L'esame fisico è stato effettuato nei bambini e tutti i membri della famiglia, con particolare riferimento alla presenza di xantomi tendinei. Nei bambini, il peso è stato misurato utilizzando una bilancia elettronica (Soehnle, Murrhardt, Germania), e l'altezza interna è stata misurata con la Harpenden Stadiometro (Holtain, Crymych, Gran Bretagna). Pressione sanguigna sistolica e diastolica sono stati misurati utilizzando un casuale sfigmomanometro zero (Hawksley & Sons Ltd, Lancing, UK), è stata utilizzata la media di tre misurazioni per l'analisi. Tutti i soggetti dello studio sono stati sottoposti a misure di vita, fianchi e braccia circonferenze. È stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI) come peso/altezza² (kg/m²).

La presenza di AD è stata definita come livelli plasmatici di TG $\geq 90^{\circ}$ e HDL-C $\leq 10^{\circ}$ percentile età e sesso-specifici. Come valori di riferimento di TG e HDL-C per i bambini sono stati utilizzati quelli riportati da "Lipid Research Clinics", (Lipid Research Clinics Population Studies Data Book; 1980).

Sono stati esclusi i bambini con diagnosi clinica di ipercolesterolemia familiare dominante (ADH). Ulteriori criteri di esclusione erano disfunzione tiroidea, diabete mellito, sindrome nefrosica e malattie del fegato, come rilevato dal test di laboratorio standard. Infine sono stati esclusi anche i soggetti che assumevano statine o di altri farmaci per il disturbo delle lipoproteine.

Parallelamente è stata reclutata una popolazione generale costituita da 174 soggetti pediatrici normolipidemic.

Lo studio di questa casistica pediatrica ha costituito il primo obiettivo del dottorato.

Come secondo obiettivo, è stata condotta un'analisi mutazione e d'espressione del gene ABCA1 in un probando adulto caratterizzato da livelli molto bassi di colesterolo HDL (HDL-C:

1mg/dl). Il probando è stato sottoposto all'analisi del profilo lipidico, esame neurologico, del fondo oculare e elettroencefalografia. Anche in questo caso sono state raccolte le informazioni demografiche e cliniche del paziente. Successivamente sono stati reclutati i parenti del probando sui quali sono stati misurati i livelli lipidici e raccolte informazioni sulla storia clinica.

3.2 Misure biochimiche

I soggetti hanno fornito campioni di sangue venoso periferico utilizzati per estrarre il DNA genomico e misurare le concentrazioni di lipidi plasmatici. Il prelievo è stato effettuato la mattina dopo un digiuno notturno di almeno 8 ore, secondo un protocollo standard.

I campioni di sangue sono stati raccolti in tubi contenenti EDTA e il plasma è stato ottenuto immediatamente tramite centrifugazione a 3000 rpm a 4°C per 10 minuti. Sono state fatte delle aliquote a cui sono stati aggiunti EDTA (0.04%), NaN₃ (0.05%), e PMFS (0.015%), al fine di prevenire cambiamenti nelle lipoproteine e nei lipidi. Un'aliquota è stata utilizzata per la determinazione di lipidi e di glucosio nel sangue, il resto è stato conservato a -80°C per misurazioni aggiuntive. L'assetto lipidico, colesterolo totale (CT), trigliceridi (TG), colesterolo HDL (HDL-C), transaminasi glutamato-ossalacetica (AST), transaminasi glutamato piruvica (ALT), Apolipoproteina B (ApoB), ApoAI e i livelli di glicemia e creatinina sono stati misurati enzimaticamente, tramite un analizzatore automatico ILab 300 plus (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA), da siero fresco. Il colesterolo LDL è stato calcolato tramite la formula di Friedwald: $LDL-C = CT - [HDL-C + (TG/5)]$

3.3 Estrazione del DNA genomico da buffy coat

Il buffy coat è stato isolato da sangue venoso periferico tramite centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Un'aliquota di 300 µl è stata utilizzata per l'estrazione del DNA genomico mediante il kit commerciale Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, USA). Il protocollo prevede 4 fasi: lisi delle cellule, lisi dei nuclei, precipitazione delle proteine,

concentrazione e precipitazione del DNA genomico. Alla fine il DNA viene reidratato con 200 µl di Buffer di eluizione e incubato a 4°C per tutta la notte.

Una volta misurata la concentrazione finale mediante lettura al nanotrop, il DNA viene conservato a -20°C.

Per l'estrazione del DNA genomico della popolazione di controllo è stato invece utilizzato il Kit QIAamp 96 Blood DNA (Qiagen, Usa), che prevede l'estrazione contemporanea di 96 campioni mediante un sistema cromatografico su colonnine monouso.

3.4 Sequenziamento dei geni ApoA1, LPL, LCAT e ABCA1

La scansione completa dei geni presi in esame è stata effettuata con una metodica di sequenziamento di tipo Sanger (cycle sequencing, Applied Biosystems) di almeno tutte le regioni esoniche e di giunzione introne/esone nonchè, nei casi in cui le dimensioni dei geni lo consentano, anche di tutte le zone introniche e delle regioni 5' fiancheggiante.

L'analisi estesa (amplificazione, purificazione e sequenziamento del DNA) è stata effettuata in formato 96-well utilizzando il sistema robotico Microlab Starlet (Hamilton) e l'analizzatore genetico a 16 capillari ABI PRISM 3100 xl (Applied Biosystems) (Figura 14).

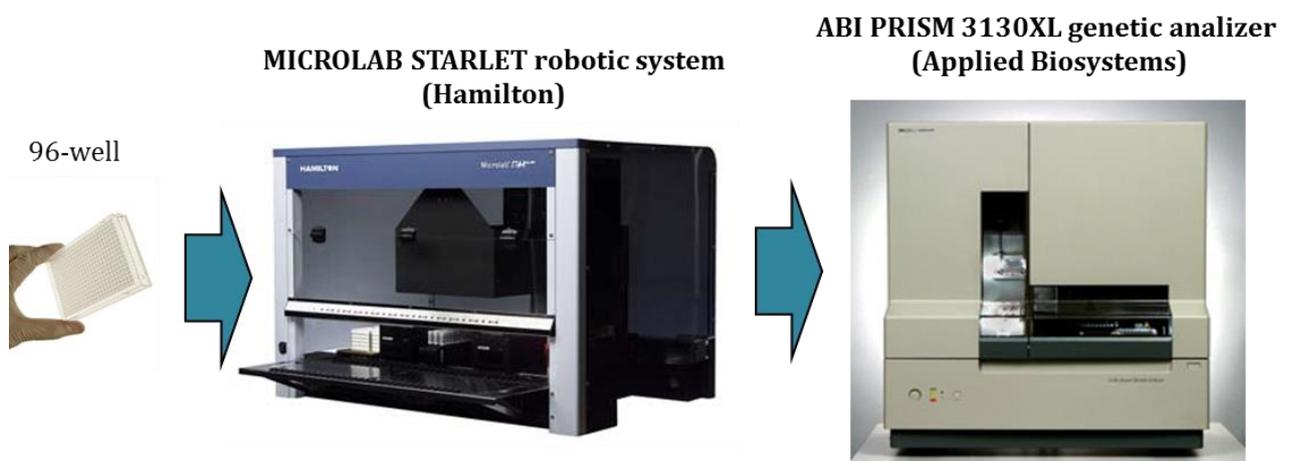


Figura14: Piattaforma automatizzata.

Il liquid handler Microlab Starlet 4 (Hamilton) è una stazione robotizzata per la preparazione automatica di tutte le reazioni a partire da DNA genomico fino all'elettroforesi capillare con notevole risparmio di tempo e riduzione degli errori analitici. Possiede 4 canali analitici che permettono di caricare fino a 4 puntali

contemporaneamente, anche di diversa capacità (si usano puntali di 50 µl, 300 µl e 1000 µl). Il livello del liquido nelle provette è riconosciuto mediante un sistema capacitivo che permette di rilevare una differenza di potenziale al momento del contatto del puntale in carbonio con il liquido. Fattore cruciale nel setting up dello strumento è la calibrazione delle plastiche usate e soprattutto del setting dei liquidi da dispensare, in quanto la velocità di caricamento di un liquido ad alta viscosità sarà diversa da quella dell'acqua. L'apparecchio è stato programmato per l'allestimento delle piastre di PCR, per preparare i campioni per l'elettroforesi, per il trattamento di purificazione e per il cycle sequencing. Per la purificazione in particolare è stato ottimizzato il Kit Montage (Millipore) che sfrutta una pompa da vuoto digitale comandata dal robot e delle piastre con membrana che permettono di catturare le sequenze di DNA.

E' necessario caricare nel robot i DNA dei soggetti da analizzare e i reagenti in apposite postazioni refrigerate, una piastra vuota "service" utilizzata per la preparazione della miscela di reazione unica e una piastra vuota "hard-shell" in cui vengono successivamente assemblate le reazioni. Il dispensatore prepara la miscela unica di reazione per il numero di campioni richiesto più una piccola quota eccedente; in seguito tale miscela è divisa in 8 aliquote nella piastra di servizio cui vengono aggiunte le coppie di primers per ogni zona da amplificare. Le 8 miscele così preparate vengono dispensate in una piastra 96 well insieme con il relativo DNA, pronte per il ciclo di amplificazione.

L'analizzatore genetico ABI PRISM 3100 xl (Applied Biosystems) è un apparecchio volto all'analisi di frammenti di DNA marcati con fluorofori, per l'automazione di tecniche di approcci di genetica molecolare. E' basato su un sistema di separazione dei frammenti mediante elettroforesi capillare a 16 capillari con caricamento automatico del polimero e dei campioni ad ogni corsa. Il sistema di rivelazione è in fluorescenza laser con rivelatore simultaneo a CCD in grado di identificare 5 diverse lunghezze d'onda contemporaneamente nel range 500 - 700 nm. Il campionamento automatico è possibile per 96 campioni x 2 alloggiamenti (totale 192 campioni). L'apparecchio è controllato da un PC tramite vari software di analisi programmabili, che consentono l'analisi delle sequenze e la caratterizzazione dei frammenti.

3.4.1 Amplificazione del DNA

L'amplificazione dei campioni è stata effettuata mediante PCR del segmento di DNA che si intende successivamente sequenziare; è stata utilizzata la GoTaq® Hot Start Polymerase (PROMEGA). Il mix di reazione (per un singolo campione) viene preparato come segue:

MM x1

1. H2O	2.75 µl
2. Buffer 5x	3 µl
3. MgCl ₂	0,9 µl
4. dNTPs	2,1 µl
5. GO Taq	0,05 µl
6. Primer forward	0,6 µl
7. Primer reverse	0,6 µl
Totale	10 µl

A questo mix si aggiungono 5 µl di DNA genomico.

Per l'amplificazione del gene ApoA1 sono stati disegnati dei primers per amplificare sia le regioni esoniche che quelle introniche (Tabella1), suddividendo l'intera regione in esame in 4 zone (Figura15). Successivamente è stato creato un apposito programma di PCR che ha permesso l'amplificazione delle suddette zone in 22 pazienti contemporaneamente (Figura 16).

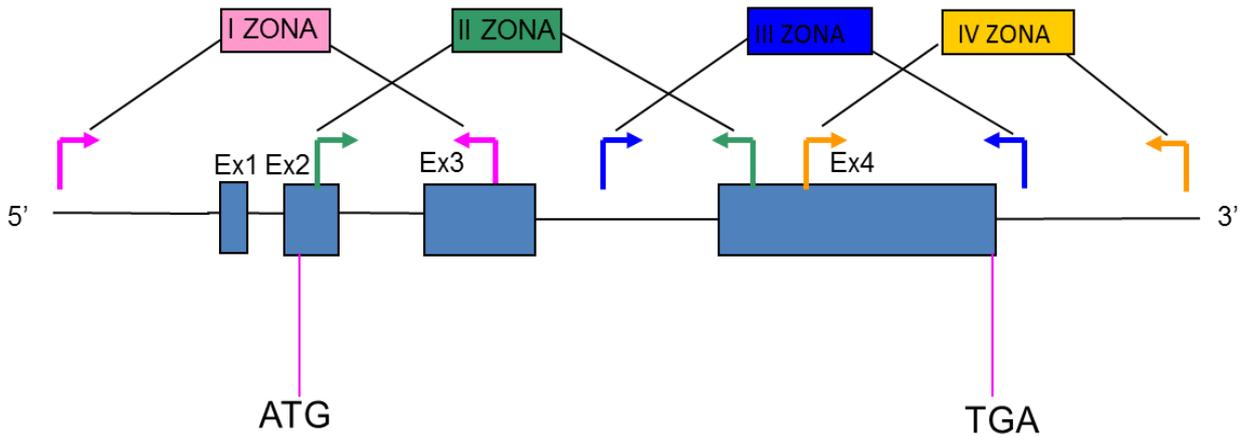


Figura 15: Coppie di primers (freccie) per l'amplificazione delle regioni esoniche ed introniche del gene ApoA1.

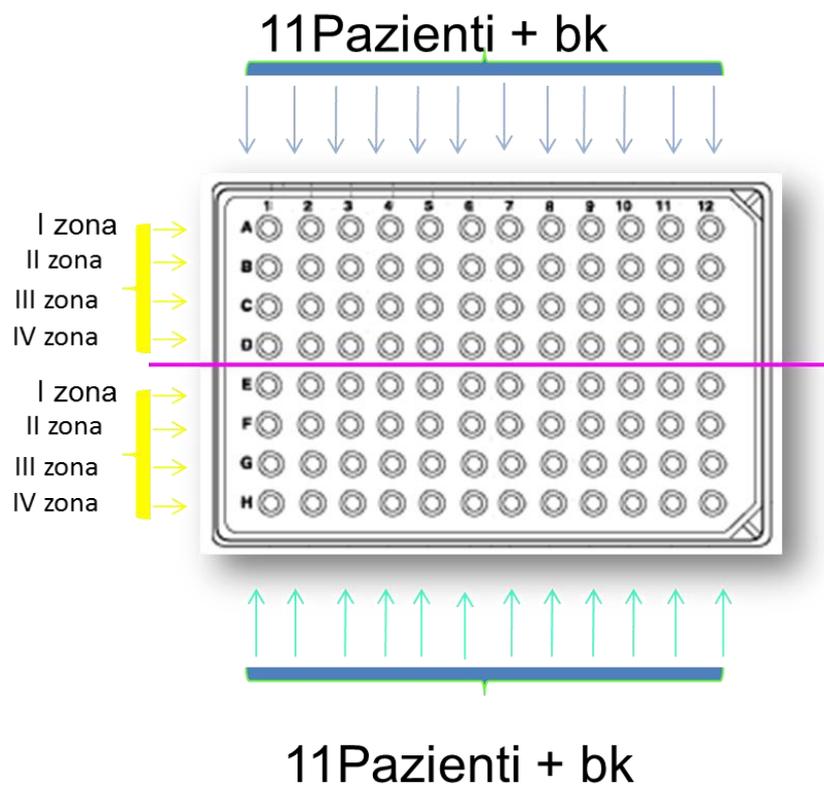


Figura16: Amplificazione del gene ApoA1 in formato 96well su 22 pazienti.

Nel gene LPL sono state analizzate solo le regioni esoniche ed introniche fiancheggianti (Figura 17). Quindi per l'amplificazione del gene sono state disegnate coppie di primers per ogni esone eccetto che per l'esone uno che è stato diviso in due parti (Tabella 2).

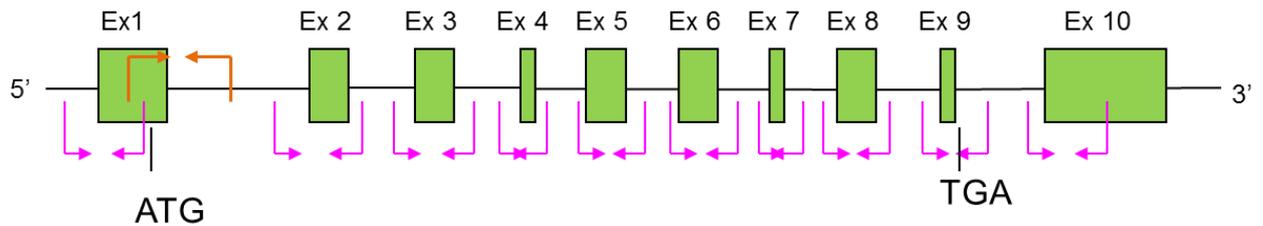


Figura 17: Coppie di primers (frecce) per l'amplificazione delle regioni esoniche del gene LPL.

Anche in questo caso si è utilizzato il programma creato per l'amplificazione del gene ApoA1 che ha permesso di amplificare e successivamente sequenziare 4 esoni alla volta in 22 pazienti contemporaneamente (Figura 16).

Per il gene LCAT sono state studiate sia le regioni esoniche che introniche ad eccezione dell'introne 5 che è stato escluso dall'analisi a causa delle notevoli dimensioni (Figura 18). Anche in questo caso sono state disegnate coppie di primers per ogni regione analizzata (Tabella 3).

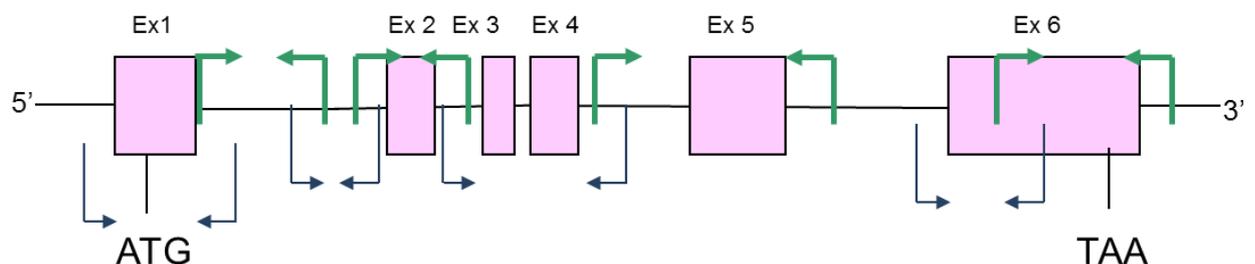


Figura 18: Coppie di primers (frecce) per l'amplificazione delle regioni esoniche ed introniche del gene LCAT.

In questo caso per l'amplificazione delle regioni in esame è stato creato un programma che ha permesso di analizzare le 8 zone in esame contemporaneamente in 11 pazienti più un controllo negativo (Figura 19).

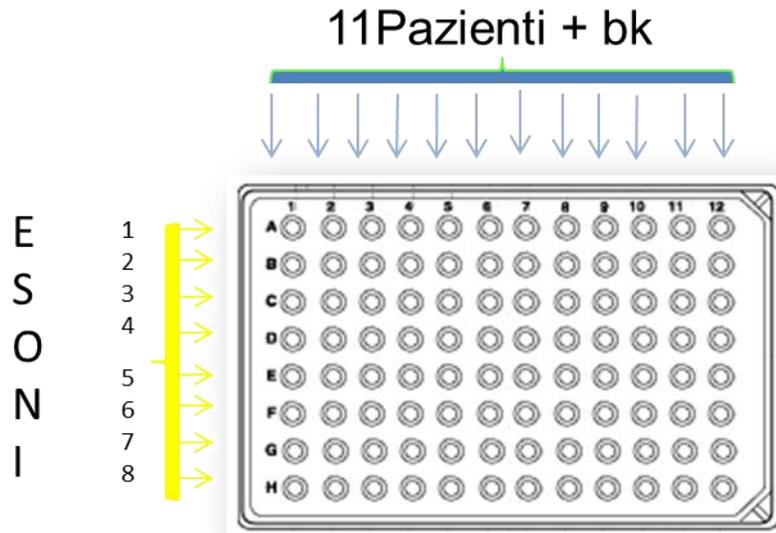


Figura 19: Amplificazione del gene *LCAT* in formato 96 well.

L'amplificazione del DNA è stata effettuata utilizzando il termociclatore PTC 100™ (MJ Reasearch) e il programma impiegato per tutti i geni finora descritti è il seguente:

2 minuti	--> 95 °C (attivazione della Taq Polimerasi)	
45 secondi	--> 94 °C (denaturazione del DNA)	} 35 cicli
1.30 minuti	--> 58°C (appaiamento primers)	
2.30 minuti	--> 72 °C (estensione)	
7 minuti	--> 72°C (estensione finale)	
∞	--> 4°C	

Nel gene *ABCA1* sono state studiate solo le regioni esoniche ed introniche fiancheggianti essendo un gene molto grande costituito da 50 esoni (Tabella 4). Avendo analizzato solo pochi soggetti, l'amplificazione così come il sequenziamento, sono stati effettuati senza l'ausilio della stazione robotica. Questa è stata utilizzata solo in secondo momento quando le due varianti introniche trovate nel gene *ABCA1*, sono state ricercate su tutta la popolazione pediatrica di 84 soggetti.

In questo caso l'amplificazione della regione considerata è stata effettuata sugli 84 controlli contemporaneamente (Figura20).

Il programma impiegato per l'amplificazione è il seguente:

2 minuti	--> 95 °C (attivazione della Taq Polimerasi)		
45 secondi	--> 95 °C (denaturazione del DNA)	}	35 cicli
30 secondi	--> 59°C (appaiamento primers)		
1 minuto	--> 72 °C (estensione)		
10 minuti	--> 72°C (estensione finale)		
∞	--> 4°C		

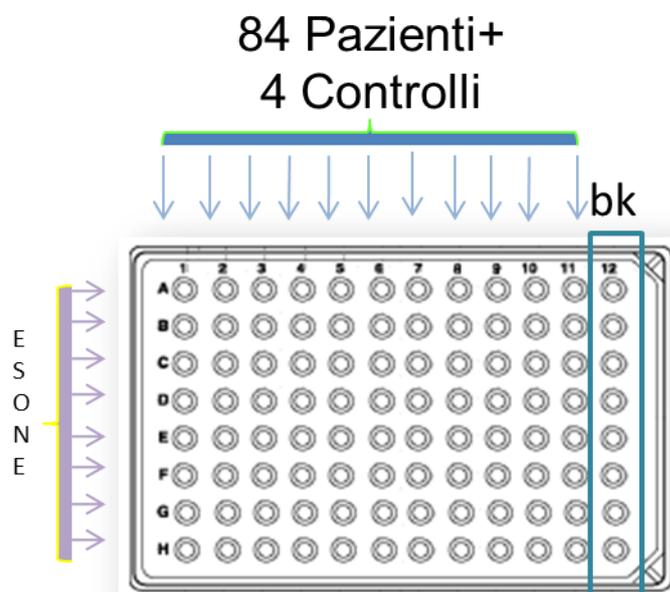


Figura 20: Amplificazione di un singolo esone sulla popolazione in formato 96 well.

Tabella 1: Primers APOA1 PCR

ApoA1	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta °C
5'- ex3	5'-TCCTCTGCCAACACAATGG-3'	5'GCCAGGTCCTTCACTCG-3'	878 bp	58
Ex2 - ex4	5'-TCCTGACGGGTAGGTGTCC-3'	5'-GCTGTCCCAGTTGTCAAGG-3'	970 bp	58
Intr3 - 3'	5'-CCAGCTCTGTCTCCTTTTTAGC-3'	5'-GCACGGAGTTGTTGAGATCC-3'	981bp	58
Ex4 - 3'	5'-GAGCTTCAAGGTCAGCTTCC-3'	5'-TCCTGGCCTGAAGTGATACG-3'	1151 bp	58

Tabella 2: Primers LPL PCR

LPL	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta °C
1UF-1UB	5'-CGTGAATCGATGTAAACCTGTG-3'	5'-GTTTGGCGCTGAGCAAGT-3'	377 bp	58
1F-1B	5'-CAGTCACATAAGCAGCCTT-3'	5'-TTCCAACCTCCTTCTCTC-3'	401 bp	58
2F-2B	5'-CGTTGGAGCATCTGTTGTTCT-3'	5'-ATGTGGGGTGGGACCCATC-3'	427 bp	58
3F-3B	5'-TTGGGCTGATGTATCTATGAC-3'	5'-GGCAGGACTATTTATTGGC-3'	451 bp	58
4F-4B	5'-ATTTTTGGCAGAAGTGAAGCAC-3'	5'-AAATCTGCAGGCATTGTGTG-3'	408 bp	58
5F-5B	5'-TCATTTTAGAAGGAGCCAAG-3'	5'-GTGGTCATGCTGAACATTG-3'	569 bp	58
6F-6B	5'-ACTCTTTGAAGGTGGGTGG-3'	5'-ATGGAATTAGAAGCCTCAGAC-3'	624 bp	58
7F-7B	5'-TTCCATGTGTGTGCACTTCC-3'	5'-CTTGTTTTCTAGGCATCGCTCT-3'	350 bp	58
8F-8B	5'-GCAGGGAGAGCTGATCTCTATAA-3'	5'-TGTGAAGGCCCTGAAATAC-3'	318 bp	58
9F-9B	5'-CCCTCTGATTCTGATGTGGC-3'	5'-CTGGTGATGGGGTGAAGAG-3'	363 bp	58
10F-10B	5'-GTCTTCCATTCTACAAACCTG-3'	5'-TTTTACTCTGCGCTCAAACAAT-3'	497 bp	58

Tabella 3: Primers LCAT PCR

LCAT	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta °C
ESONE 1	5'-CTGAACCCAGGCCAGAG-3'	5'-CCACACCAGGGCAGGTACT-3'	460 bp	60
INTRONE1-1	5'-CGTCATCCTCGGTAAGCC-3'	5'-CCAAGGTGGGAACAGATAGG-3'	455 bp	60
INTRONE1-2	5'-AAGCCCCACCACTCCTTC-3'	5'-CCCTCACTCTGGACTCTGGA-3'	421 bp	60
ESONE2	5'-TTGTACCTGGGGTTGAGG-3'	5'-ACAGAGTAGGTCTTGCCAAAGC-3'	446 bp	60
Ex3-Int3-Ex4	5'-ACACCAGGTACAGCCATGTG-3'	5'-GCGGTAGTACTCCTCCTGCT-3'	498 bp	60
ESONE5	5'-GGTGAGTGTCTCTGCGGATG-3'	5'-CCTAGAGGCCACTGTGAGCA-3'	406 bp	60
ESONE6-1	5'-GCCTGTGGCTTAGAGTCTGTG-3'	5'-GAAGCCGTGGTTCGTAGATGT-3'	450 bp	60
ESONE6-2	5'-CAGCACCTGGTGTGGAAGTA-3'	5'-GCTGGTGAGGAGTGAACC-3'	430 bp	60

Tabella 4: Primers ABCA1 PCR

ABCA1	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta °C
PROM 1	5'-GGAGGTCTGGAGTGGCTACATA-3'	5'-CCAGTGGAAATTTGCTTCCTCTA-3'	554 bp	59
PROM 2	5'-AGCCATTACCCAGAGGACTGT-3'	5'-TTCAGTCACTCAGCAGAAAGCA-3'	466 bp	59
ESONE 0	5'-AGCACAGGCTTTGACCGATAGT-3'	5'-GGATCAAAGTCCCCGAAACC-3'	395 bp	59
ESONE 1	5'-TCCTCATTGGTGTATGGCTTTG-3'	5'-AAGAGCCAGATTCCTCAATCC-3'	357 bp	59
ESONE 2	5'-CCACGATGAATCCTGAAGAATG-3'	5'-CTCCTGAGTTTCATGCCTTATCA-3'	540 bp	59
ESONE 3	5'-ATCACTTCTCCAACGCTGGTAT-3'	5'-TGCAGACTCTATCACACAAGCA-3'	518 bp	59
ESONE 4	5'-AGGCAGTTGGCCTAGCTAAAAG-3'	5'-CTACTCTCTTTCCCTGGTGCAG-3'	236 bp	59
ESONE 5	5'-GAGTTGAGGAGCACATGCTGA-3'	5'-TCTTTCCAGTAGCTGCACAACG-3'	297 bp	59
ESONE 6	5'-AAAGACTTCAAGGACCCAGCTT-3'	5'-CCTCACATTCGGAAAGCATT-3'	309 bp	59
ESONE 7	5'-TTTGGTTAGGAGTCGGTTTCTTG-3'	5'-GGACCTCTTGCCAGACTCAG-3'	456 bp	59
ESONE 8	5'-TCTTTCTCTTCTCATCCCAAC-3'	5'-GCTGCTACAGAGGGAGGAGAT-3'	417 bp	59
ESONE 9	5'-TCCAAAGCCCTTGTAAGTTTCT-3'	5'-TACTTAGCGCACACCTCTGAAG-3'	305 bp	59
ESONE 10	5'-CTCATTGTCTGTGCTTCTCCTC-3'	5'-GTGACCAGAAACTCACCTCTCC-3'	240 bp	59
ESONE 11	5'-TGCTCCTCAAGATTTAGTTGGTG-3'	5'-TCAGAGAAAGAAGCCGTTAAGTC-3'	307 bp	59
ESONE 12	5'-GATGAGCAATCGTGTAGTCAGC-3'	5'-ACCTTCCAGCAAGTCATGTACC-3'	488 bp	59
ESONE 13	5'-GGGCAATAAGAGTGAAACTCCA-3'	5'-TTTCCAGATCATTACACATGC-3'	438 bp	59
ESONE 14	5'-AGAGTCTAGAGGGCCTGTCCTT-3'	5'-GAACCTGCACTCTCATCCTAC-3'	593 bp	59
ESONE 15	5'-TACAAGTGAGTGCTTGGGATTG-3'	5'-CCCATTGGAAAAGACAATCATC-3'	391 bp	59
ESONE 16	5'-TTCTGCACCTTATGATTGATCC-3'	5'-AGCACAAAGAAAGGACATCAGC-3'	392 bp	59
ESONE 17	5'-CAGAATACTGGGATGATGCTGA-3'	5'-AACAGTTAGCAGAGGCAGCAG-3'	227 bp	59
ESONE 18	5'-TGTTCCTTACACTCCACTCCTCA-3'	5'-CTCTACTGCAGAACCCTCCTGT-3'	292 bp	59
ESONE 19	5'-GTGGGTCTGGTAGGGTTCATT-3'	5'-TAAGTCCCCTCCTCCATGAT-3'	351 bp	59
ESONE 20	5'-CGATCTGTCACCTTCACTTTG-3'	5'-GCCAGGGACAAGTTTCTGTTAC-3'	490 bp	59
ESONE 21	5'-CTCTGCCTTCACTCACTGTCTG-3'	5'-TAGCCATGAGATACAGCCACAC-3'	283 bp	59
ESONE 22	5'-TGTGACAAATCAGAACTGAGAGG-3'	5'-GGTGGAGATGGAGAAATCATT-3'	366 bp	59
ESONE 23	5'-CACACAACAGAGCTTCTTGAA-3'	5'-TCTGCACCTCTCCTCCTCTG-3'	257 bp	59
ESONE 24	5'-GGAATGACCTAAACACCTGGAA-3'	5'-AGGCTACTGGTCTGGCCTTAG-3'	405 bp	59
ESONE 25	5'-GGCTTCTCTCCAGGTAACCTCT-3'	5'-GCACAAGGAAAGAATCCCATAC-3'	404 bp	59
ESONE 26	5'-TCAGTGCAGGATATTGTTCT-3'	5'-TGGCTTTTACCATTTCCTCACT-3'	400 bp	59
ESONE 27	5'-TTCAGACACATGCCTTCAAGAT-3'	5'-GCAAGGAATAGAAGTGGGATTG-3'	403 bp	59
ESONE 28	5'-CTCAGTCTTCAGGAGGAGGAAG-3'	5'-CATCTTTGGTCTGCTCGAATC-3'	517 bp	59
ESONE 29	5'-TTGGAGTGCTCTACGTCACC-3'	5'-GTCACAAATGTGGCATGCAGTT-3'	402 bp	59
ESONE 30	5'-GTTTGTGGTTGTTACGGAATGA-3'	5'-AACAGACCTCCCAACATGATA-3'	390 bp	59
ESONE 31	5'-TCTGGGACCTGTAGTCAGGTTT-3'	5'-CCTTGAAGCTGACAACTGAATG-3'	413 bp	59
ESONE 32	5'-TGCATCATTAGGAATAGGCTCA-3'	5'-CCTGCAGGAGATTTCTGATTCT-3'	401 bp	59
ESONE 33	5'-GCAGAAACCATGGGAGTTAAGA-3'	5'-TCCGTTTAACTGCCAACTACT-3'	382 bp	59
ESONE 34	5'-GTCCACAGGTTCCAGATTGACT-3'	5'-ACTACACCGTACTGCCTCACTG-3'	304 bp	59
ESONE 35	5'-GTTGGTGGGTATGCACCTG-3'	5'-TCTCCATAACCCTCTCCCTTG-3'	300 bp	59
ESONE 36	5'-ACTGATTGAGCCCTAACTGCAT-3'	5'-TGTGTTTGGTGTGCATGAAAGTG-3'	408 bp	59
ESONE 37	5'-GCTTGACTGTTGGAAAGACAGA-3'	5'-CACCAAATGCCTTATCCACTG-3'	402 bp	59
ESONE 38	5'-ACAGTGGATAAGGCATTTGGTG-3'	5'-AGCAAGAAAGAAAGGTGCTTTG-3'	400 bp	59
ESONE 39	5'-ACCATGAATGACACCCGTTT-3'	5'-ATCCTGTGCTTAGTCACCTGCT-3'	299 bp	59
ESONE 40	5'-CGAATACACATTGGCTCTGAAA-3'	5'-TTGAGTTCAGTTCAATGCAACC-3'	464 bp	59
ESONE 41	5'-GGAGACTGTGGCAAGTAGGTTT-3'	5'-TGTATTCGAGAATGGGAATTCAT-3'	442 bp	59
ESONE 42	5'-GCCTGTGTTCAAGAGGGTCTAT-3'	5'-CGTTGCTTGATTGGGTAGAGA-3'	565 bp	59
ESONE 43	5'-GTTTGAGGTAGTTACGTGTTAGGG-3'	5'-AACTGGATTGTGGTGATGGTTG-3'	516 bp	59
ESONE 44	5'-GCATGTGAATGGTGCATATGAG-3'	5'-GTCAGGATGCCAAAGGAGACAG-3'	567 bp	59
ESONE 45	5'-CCTCACAGTTGTCAGGTTATG-3'	5'-AGCCTCAATCACGCTAAGAAAC-3'	512 bp	59
ESONE 46	5'-GCTGTTTCAAAGATGCTTCTGC-3'	5'-AAACATCCACAGTGAGGAAC-3'	236 bp	59
ESONE 47	5'-AGTCATGGTGATGTTCTCATGG-3'	5'-GGACTTCAAAGCCCTATTCTT-3'	309 bp	59
ESONE 48	5'-ACTTCATGGGTCCAGGTGAG-3'	5'-GGAATCCACACCCTGAGAAGTA-3'	527 bp	59
ESONE 49	5'-CTTCCCTCCTTCACACACAGTT-3'	5'-GACATAGGCTACAAAGGCACTG-3'	500 bp	59

3.4.2 Elettroforesi su gel d'agarosio

L'amplificato è stato controllato elettroforeticamente per valutarne le dimensioni in numero di basi (bp); 3.3 µl di amplificato uniti a 3.3 µl di DNA Loading Dye (Fermentas) sono stati fatti migrare e confrontati con uno standard di peso molecolare (Gene Ruler 50 bp DNA Ladder, Fermentas). La verifica tramite elettroforesi è necessaria non solo per controllare l'avvenuta amplificazione ma anche per escludere un eventuale inquinamento del bianco di reazione

3.4.3 Cycle sequencing

L'amplificato è stato purificato aggiungendo a 15 µl di prodotto di amplificazione 2U di FASTAP™ (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas) e 20U di Exo I (Exonuclease 1-USB Corporation) per eliminare i primers residui e i dNTPs non incorporati. Anche questo step è stato effettuato mediante il sistema robotico in formato 96 well.

Il programma di purificazione prevede:

1. 45 minuti 37°C (per eliminare i primers e i dNTPs LIBERI)
2. 15 minuti 80°C (per disattivare i due enzimi)

Il mix di reazione di sequenziamento è preparato utilizzando un kit fornito dall'Applied Biosystems (ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit), costituito dal TRRM (Terminator Ready Reaction Mix) contenente, fra l'altro, una miscela di dNTPS e ddNTPS marcati con quattro diverse molecole fluorescenti; a tale mix va aggiunto unicamente il primer corrispondente al filamento di DNA che si vuole sequenziare (Figura 21)

Per i geni ApoA1 e LCAT sono stati disegnati dei primers interni rispetto a quelli di PCR per sequenziare le zone analizzate (Tabelle 5 e 6); mentre per i geni LPL e ABCA1 sono stati utilizzati gli stessi primer della PCR (Tabelle 2 e 4).

Tutte le coppie dei primers sono state purificate mediante HPLC, in modo da ridurre il fondo n-1 quasi fino a scomparire del tutto.

La soluzione così formata è stata posta nel termociclatore con il seguente programma:

1 minuto	--> 96 °C	} 30 cicli
10 secondi	--> 96 °C	
5 secondi	--> 50°C	
4 minuti	--> 60 °C	
∞	--> 4°C	

Al termine dei cicli di sequenziamento, i campioni subiscono un ulteriore processo di purificazione mediante il Kit Montage (Millipore) basato su un sistema cromatografico che cattura le sequenze di DNA ed elimina, con dei lavaggi successivi, tutti i dideossinucleotidi non incorporati dal campione. In tal modo si impedisce ai ddNTPS di comigrare con i frammenti di interesse creando interferenze nella rivelazione.

Tabella 5: Primers ApoA1 cycle sequencing

ApoA1	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta (°C)
5' UTR (up) - intron 1	5'-CTCCCATGGAGGGAAGG-3'	5'-CACAGAGCGGAGAAGACC-3'	421	58
5' UTR (down) - intron 2 (down)	5'-TGGCTGCAGACATAAATAGGC-3'	5'-CTGAGATCTGAGCCGAAAGG-3'	465	58
Intron 2 (up) - intron 3 (up 1)	5'-CCTAACCTAGGGAGCCAACC-3'	5'-GCCCAGCTCATCAGATATTAGG-3'	441	58
Exon 3 - intron 3 (down)	5'-GCGGCAGAGACTATGTGTCC-3'	5'-GCAGTGGCCTAGCATTTC-3'	554	58
Intron 3 (up 2) - exon 4 (down)	5'-CCTTTTGTAGCTCCTCTGTGC-3'	5'-AGCTCGTGCAGCTTCTGG-3'	476	58
Exon 4 (up) - 3' UTR (up)	5'-AGCTTACC GCCAGAAGG-3'	5'-AAGCTGCTTCCACTTTGG-3'	459	58
Exon 4 (down) - 3' UTR (down)	5'-AAGCTCAACACCCAGTGAGG-3'	5'-TAGTGGGAGGGGATACTGG-3'	657	58
3' UTR (distale)	5'-GAAGCGCTTGAGTTTGC-3'	5'-TGATACGCCACCTCAGC-3'	537	58

Tabella 6: Primers LCAT cycle sequencing

LCAT	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta (°C)
ESONE 1	5'-CTTTCCGGCAATCTCTGG-3'	5'-TTATGTCGGGGCTTATGCAG-3'	402 bp	58
INTRONE1-1	5'-AGCTGACCTGGCCAAAGC-3'	5'-GATGGGCTCTCCTGCTC-3'	316 bp	58
INTRONE1-2	5'-CCCACCAAGGACAAGATGC-3'	5'-AGATGCTGCAGTGACCAGAC-3'	341 bp	58
ESONE2	5'-TTGAGGGTATGGGAGGTGG-3'	5'-CCAGAGCTCCGGTTGTAGAC-3'	299 bp	58
ESONE3-INTRONE3-ESONE4	5'-GCTACTGGCTGCTGAGTGG-3'	5'-GCGGTAGTACTCCTCTGCT-3'	447 bp	58
ESONE5	5'-AGTGCCCTGACCCCTTC-3'	5'-AGGATCAGCTTGGTCTCACC-3'	309 bp	58
ESONE6-1	5'-TGAGCCTACACTCAGCAGGT-3'	5'-TAGATGTAGGTGCGGGGC-3'	381 bp	58
ESONE6-2	5'-ATACTGTCTTTACGGCGTGG-3'	5'-TAGTGCTCCCTTCAACCTG-3'	379 bp	58

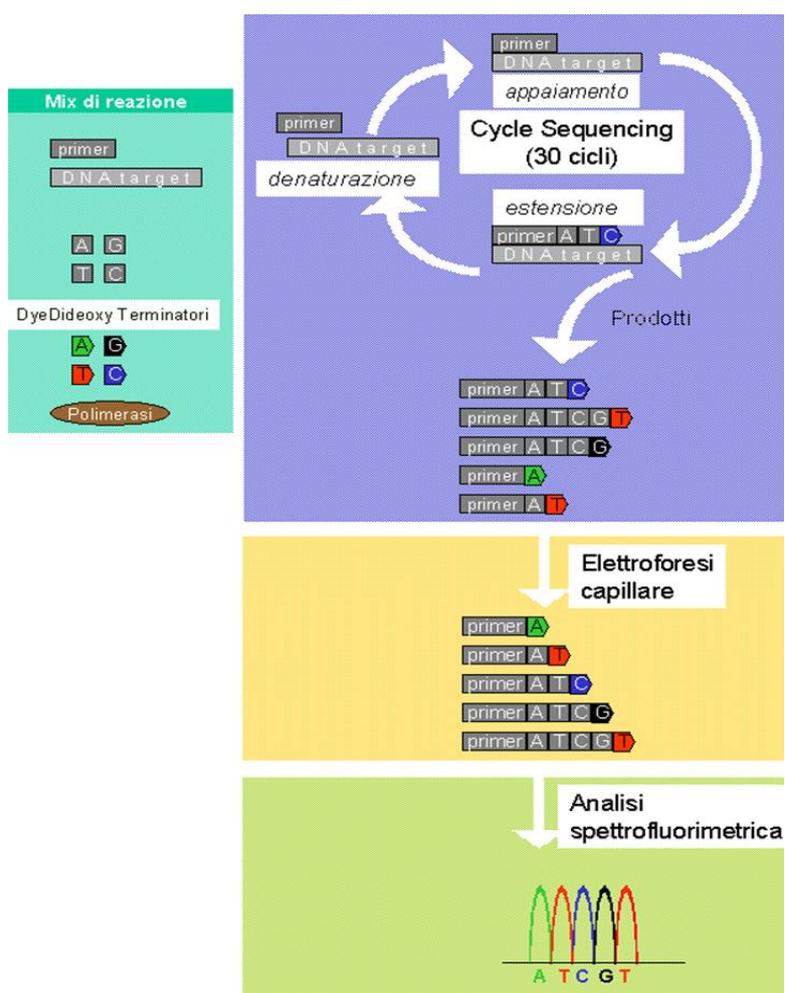


Figura21: Cycle sequencing.

3.4.4 Elettroforesi capillare

L'elettroforesi capillare viene effettuata sull'analizzatore genetico ABI PRISM 3130 *XL* a 16 capillari, utilizzando la matrice POP6. Le condizioni di corsa sono le seguenti:

Tempo di iniezione	8 secondi
Voltaggio di elettroforesi	15 KV
Durata della corsa	40 minuti
Temperatura di corsa	50°C

Il segnale di fluorescenza viene tramutato in una serie di picchi di diverso colore (elettroferogramma).

3.4.5 Analisi degli elettroferogrammi

L'elettroferogramma ottenuto è stato analizzato con l'ausilio dei programmi ABI PRISM Sequencing Analysis e Seq Scape (Applied Biosystems). Ogni singolo picco è stato controllato ed è stata valutata la giusta chiamata del nucleotide, correggendo laddove necessario. In tal modo sono state individuate eventuali anomalie nel tracciato, come la presenza di picchi sovrapposti (possibile mutazione in eterozigosi), irregolari (eventualmente dovuti a variazioni di corrente), disturbi di fondo (imputabili a cattiva purificazione dell'amplificato) o una insufficiente risoluzione dei picchi (attribuibili a difettoso funzionamento del polimero utilizzato dal capillare). La sequenza ottenuta dal tracciato è stata confrontata con la sequenza wild type così da evidenziare eventuali zone di non omologia della nostra sequenza con il genotipo normale. Tale confronto viene molto agevolato

dall'utilizzo del programma Seqscape (Applied Biosystems) che è stato opportunamente programmato per l'individuazione semiautomatica delle varianti eventualmente presenti.

3.5 Saggio SNaP

Le mutazioni identificate nel gene LPL sono state ricercate nella popolazione generale tramite saggio di primer extension. Un tipico protocollo prevede la progettazione di primers specifici e l'utilizzo di un kit fornito dall'Applied Biosystems (ABI PRISM SNaP shot Multiplex Kit) per l'analisi di polimorfismi a singolo nucleotide ed è così suddiviso:

- amplificazione del DNA
- rimozione dNTPS e primers non incorporati
- reazione di minisequencing
- elettroforesi capillare
- analisi dei dati con Genotyper Software

3.5.1 Amplificazione del DNA mediante PCR multiplex

L'amplificazione dei campioni è stata eseguita mediante PCR multiplex in cui, cioè, si ha l'amplificazione contemporanea di più regioni per uno stesso campione (Tabella 7).

3.5.2 Purificazione dell'amplificato

Dopo aver controllato elettroforeticamente l'amplificato per valutarne l'integrità e dimensioni, il prodotto di PCR è stato sottoposto a purificazione enzimatica per eliminare i primers e i dNTPS non incorporati ed evitare una loro partecipazione alla successiva reazione di minisequencing in accordo con il protocollo di purificazione di amplificati di PCR già descritto.

3.5.3 Minisequencing

La reazione di minisequencing è una reazione di primer-extension in cui ogni primer si lega in modo complementare allo stampo, in presenza di una DNA polimerasi e ddNTPS marcati con fluorescenza: la polimerasi estende il primer di un solo nucleotide, aggiungendo un singolo ddNTPS alla sua estremità 3'.

Fondamentale risulta in questo saggio il disegno di primers che devono avere determinate caratteristiche:

-si tratta di primers disegnati a ridosso del sito che varia, che devono variare in lunghezza per evitare qualsiasi sovrapposizione fra i prodotti finali (è necessaria una differenza in lunghezza di almeno 4-6 nucleotidi fra primers successivi)

-i primers devono avere la stessa temperatura di melting (58°C)

-in alcuni casi la lunghezza del primer è stata modificata mediante l'aggiunta alla sua estremità 5' di una coda polinucleotidica (coda di poli A) non omologa alla sequenza stampo

-la mobilità di un oligonucleotide in elettroforesi capillare è determinata dalla sua lunghezza, e dal tipo di fluorocromo

-infine i primers di minisequencing sono purificati mediante HPLC per evitare la comparsa di prodotti indesiderati che potrebbero confondere l'analisi finale.

Nella tabella 7 sono elencati i primers utilizzati per il saggio SNaP sul gene LPL.

Tabella 7: Primers saggio SNaP LPL (in grassetto coda di poliA)

VARIAZIONE	PRIMER
-281 T>G	5'- AGAAAAAAAAAAAA ACGTTTAGAAGTGAATTTAGG-3'
D9N	5'- GGAAAAGAGAAAGGAAAAAAAAA TTCCAGAAAGAAGAGATTTTATC-3'
S45N	5'- AAAAAA CTACCTGTCATTTCAATCACA-3'
N291S	5'-AATCTGGGCTATGAGATCA-3'
L365V	5'- AAAGGAAA ACACAAATAAGACCTACTCCTTC-3'
S447X	5'- AGAAAAAAGGGAAAAA ATGACAAGTCTCTGAATAAGAAGT-3'

Questi primers sono stati miscelati insieme per dare un mix di primers SNaP.

Il mix di reazione per un singolo campione è preparato aggiungendo a 2.5µl di MMRM 0.5 µl di mix primer SNaP; infine sono stati aggiunti 2 µl di prodotto di PCR purificato. La soluzione così ottenuta è stata posta nel termociclatore con il seguente programma:

10 secondi	--> 96 °C	} 25 cicli
5 secondi	--> 50°C	
30 secondi	--> 60 °C	
∞	--> 4°C	

Al termine della reazione di minisequencing ogni campione subisce un ulteriore trattamento di purificazione per rimuovere i ddNTPS non incorporati che potrebbero interferire con la migrazione dei frammenti di interesse: ogni campione subisce un trattamento FASTAP al fine di rimuovere i gruppi fosfato all'estremità 5' di ogni ddNTPS a 37°C per 60 secondi e a 80°C per 15 minuti.

3.5.4 Elettroforesi capillare

Prima di effettuare l'elettroforesi dei campioni, è necessario aggiungere uno standard di peso molecolare marcato con un quinto fluorocromo, diverso da quelli con cui sono marcati i ddNTPS (GeneScan-120 LIZ size standard) necessario per l'analisi finale dei prodotti, specifico per piccoli frammenti. L'elettroforesi capillare risolve i differenti frammenti in una serie di picchi di colore diverso (Figura 22).

I risultati ottenuti mediante il saggio SNaP sono stati analizzati mediante il software il Genotyper fornito dall'Applied Biosystem che permette di visualizzare i risultati in maniera semiautomatica.

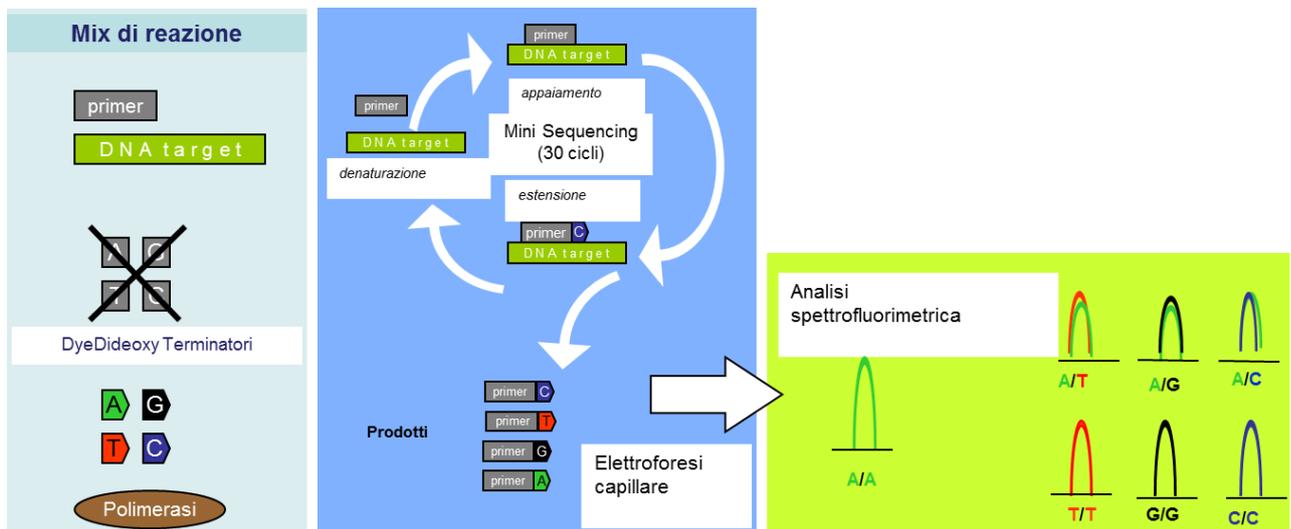


Figura 22: Saggio SNaP.

3.6 Analisi d'espressione del gene ABCA1

3.6.1 Anello di linfociti-monociti da sangue venoso periferico

Le cellule mononucleate del sangue periferico (linfociti e monociti) sono state isolate attraverso stratificazione su LINFOPREP (Axis-Shield). Tale metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate rispetto agli elementi del sangue. Infatti linfociti, monociti e piastrine, avendo una densità minore, si concentrano sopra lo strato di LINFOPREP; al contrario i globuli rossi e i granulociti, caratterizzati da una densità maggiore, si raccolgono sul fondo della provetta. Il sangue periferico è stato prima diluito 1:3 con DPBS (Cambrex), in seguito sono stati aggiunti 15 ml di LINFOPREP sul fondo della provetta molto lentamente e si è centrifugato per 30 minuti a 1680 rpm (508 g) a 18 °C; la centrifuga è stata fatta fermare senza freno. Successivamente è stato prelevato l'anello di cellule mononucleate formatesi all'interfaccia del LINFOPREP. Queste sono state sottoposte a due lavaggi successivi con DPBS per eliminare gli elementi contaminanti (piastrine), centrifugate a 2600 rpm (1200 g) per 20 minuti a T = 15 °C e infine risospese in 500 µl di Buffer di lisi e sono state conservate a -80 °C.

3.6.2 Estrazione RNA

L'RNA dai pellet linfo-mono è stato estratto mediante *RNeasy mini kit* (Qiagen), che permette di estrarre l'RNA totale da pellet cellulare. La tecnologia RNeasy semplifica l'isolamento dell'RNA totale combinando l'uso di guanidina tiocianato per la lisi cellulare, con la purificazione attraverso l'utilizzo di colonnine monouso con membrana di silice, ideali per ottenere un elevato grado di purezza dell'RNA. Il sistema utilizzato è dunque un sistema cromatografico. La quantificazione e la purezza dell'estratto è stata valutata mediante spettrofotometria, analizzando l'assorbanza a 260/280 nm; la qualità dell'RNA estratto è valutata mediante elettroforesi in gel denaturante di agarosio, che permette di distinguere le bande relative alla porzione 28S, 18S e 5S.

L'RNA estratto è stato quindi conservato a -80 °C.

5. Go Taq	0,0.5 μ l
6. Primer forward	0,6 μ l
7. Primer reverse	0,6 μ l
Totale	12,5 μl

A questo mix vengono successivamente aggiunti 2,5 μ l di campione.

L'amplificazione del DNA viene effettuata utilizzando il termociclatore PTC 100™(MJ Reasearch) e il programma impiegato è il seguente:

2 minuti	--> 95 °C (attivazione della Taq Polimerasi)	
45 secondi	--> 94 °C (denaturazione del DNA)	
1.30 minuti	--> T _a °C (T primer-specifica di appaiamento)	da 30 a 40 cicli
2.30 minuti	--> 72 °C (estensione)	
7 minuti	--> 72 °C (estensione finale)	
∞	--> 4°C	

Il prodotto di PCR è stato caricato su gel d'agarosio al 4% sia per controllare l'avvenuta reazione di amplificazione sia per individuare bande di splicing o ritenzione anche molto vicine alla banda wild type. Quindi si procede all'eluizione dei prodotti di PCR. L'intero campione è stato caricato in un gel d'agarosio al 4% e dopo una migrazione elettroforetica di circa 6-8 ore, le bande di interesse sono state eluite utilizzando il QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Dopo l'aggiunta di un buffer che scioglie l'agarosio (buffer QG), la soluzione viene caricata in colonnine cromatografiche a scambio ionico che trattengono l'amplificato ed eluiscono l'agarosio. Le colonnine sono state sottoposte a lavaggio con uno specifico buffer (PE), quindi è stata fatta l'eluizione dell'amplificato purificato. Questo è stato sequenziato tramite la metodologia precedentemente descritta.

Tabella 8: Primers d'espressione ABCA1

ABCA1	FORWARD	BACKWARD	DIMENSIONE AMPLIFICATO	Ta (°C)
esone1-esone4	5'-TTTTTCCCCTGTTCTGTTT-3'	5'-ATAATCCCCTGAACCCAAGG-3'	400 bp	58
esone6-esone8	5'-ACAAGATGCTGAGGGCTGAT-3'	5'-CCAAGACTATGCAGCAATG-3'	290 bp	58
esone8-esone10	5'-CCACAAAACATTGCTGCAT-3'	5'-GTGGCTGGAGTGCAGGTGT-3'	406 bp	58
esone34-esone36	5'-AAGCACTTCTCCGAGTCAA-3'	5'-AGCTGCTGCTTGGTGAGATT-3'	301 bp	58
esone30-esone34	5'-ATGATGCTCCTGAGGACACG-3'	5'-TCTGCAGAACTGTCCTTGGC-3'	535 bp	58
esone40-esone44	5'-CCGTGTTCTTGATCTTCCAC-3'	5'-TTCCAGCCCATTAACTCCC-3'	441 bp	58
esone43-esone47	5'-CGGAAGCCTGCTGTTGAC-3'	5'-ACTGATCTCCCCTCCTTGAC-3'	518 bp	58
esone46-esone50	5'-CATGGCTTTGATCGGCGG-3'	5'-ATGTGAGAACTGCAACGTCC-3'	578 bp	58
esone12-esone13	5'-CCAGTCCAGTAATGGTTCTGTGT-3'	5'-CAGCTCCATGGACTTGTGA-3'	157 bp	58
esone10-esone11	5'-TGAAGCCGCTGCTCGTTGGG-3'	5'-TGGGGCTGAGTTCTCCACA-3'	140 bp	58

CAPITOLO IV: Risultati

Nel nostro studio abbiamo esaminato una coorte di 55 bambini che si caratterizzavano per avere bassi valori di HDL e alti valori di trigliceridi. Come si può osservare nella Tabella 9, che descrive le caratteristiche biochimico-cliniche della popolazione, i valori di HDL colesterolo sono inferiori a 40 mg/dl mentre quelli di trigliceridi sono maggiori di 150 mg/dl. Anche i valori di ApoAI e di colesterolo totale sono bassi (ApoAI < 155 mg/dl, CT < 200 mg/dl).

Tabella 9: Caratteristiche biochimiche cliniche popolazione AD. I valori sono calcolati come media \pm ds.

Età	8.3 \pm 3.9
Maschi (n)	35
Femmine (n)	20
Colesterolo Totale (mg/dl)	189.5 \pm 38.3
Colesterolo HDL (mg/dl)	32.9 \pm 4.9
Trigliceridi (mg/dl)	158.3 \pm 85.5
ApoAI (mg/dl)	126.3 \pm 25.8

4.1 Analisi del gene ApoA1

Il primo gene che abbiamo analizzato è stato il gene ApoA1, considerata la sua importanza nel metabolismo delle HDL.

La Figura 23 riassume le varianti identificate in questo gene nella coorte di bambini.

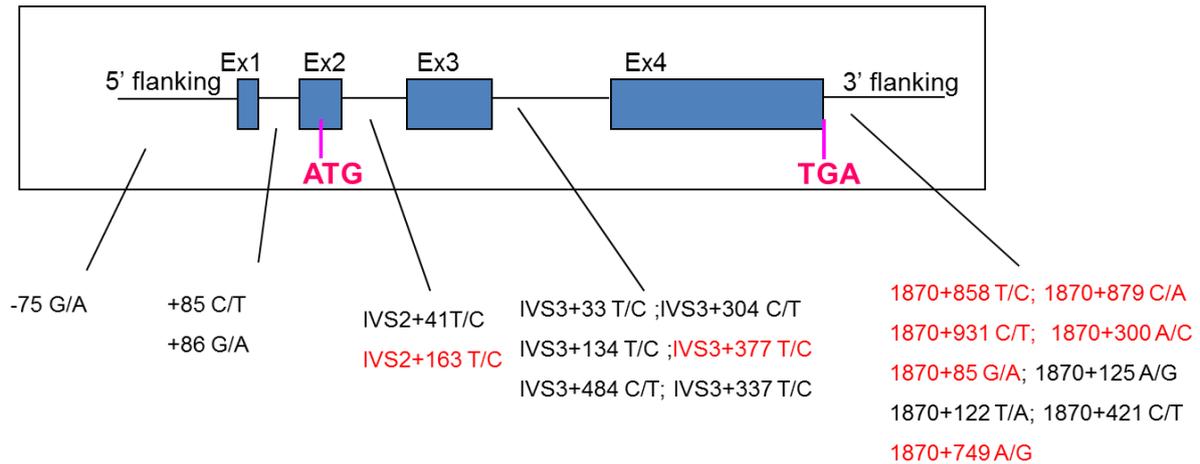


Figura 23: Variazioni identificate nel gene ApoA1. In rosso le varianti non presenti nei database (nuove), in nero le varianti note.

Nel gene ApoA1 sono state identificate in totale 19 variazioni di sequenze introniche e 1 variazione al promotore. Delle 19 variazioni introniche 11 sono presenti nei database EU SNPs e 1000 Genomi, mentre 8 sono nuove (in figura in rosso).

In tutti i bambini, eccetto che in uno, è stata identificata almeno una variazione.

Per ogni variazione è stata calcolata la frequenza allelica nella popolazione AD e confrontata mediante il test esatto di Fisher o il test del χ^2 con quella dei database EUSNPs e 1000 Genomi (Tabella 10).

Il test statistico non è stato condotto sulle 8 varianti nuove in quanto non descritte nei due database.

Tabella 10: Variazioni ApoA1. n: numero alleli popolazione AD. È riportato il valore del P value (Test esatto di Fisher o χ^2)calcolato tra la frequenza allelica popolazione AD e frequenza allelica EUSNPs.

Esone/ Introne	Variazione nucleotidica	Frequenza allelica EUSNPs	Frequenza allelica EU1000 Genomes	Numero ID	Probabile effetto	Frequenza allelica popolazione AD	P value
promotore	-75 G>A	A: 0.312	A: 0.152	rs670	-	A: 0.182 (20; n: 110)	p=0.122
Introne 1	+86 G>A	-	A: 0.007	rs1799837	-	A:0.027 (3; n:110)	p= 0.068
Introne 1	+85 C>T	T: 0.021	T: 0.018	rs5069	-	T:0.027 (3 n:110)	p= 1.00
Introne 2	IVS2+41 T>C	C: 0.646	C: 0.668	rs5070	-	C:0.627 (69,n:110)	p= 0.823
Introne 2	IVS2+163 T>C	-	-	-	-	C:0.009 (1,n:110)	-
Introne 3	IVS3+33 T>C	C: 0.916	C: 0.889	rs2070665	-	C:0.864 (95,n:110)	p= 0.135
Introne 3	IVS3+134 T>C	C:0.912	C: 0.888	rs5072	-	C: 0.864 (95,n:110)	p= 0.177
Introne 3	IVS3+337 T>C	C: 0.917	C: 0.868	rs7116797	-	C:0.855 (94,n:110)	p= 0.345
Introne 3	IVS3+304 C>T	T: 0.058	T: 0.062	rs12718464	-	T: 0.027 (3; n: 110)	p=0.282
Introne 3	IVS3+484 C>T	T: 0.021	T: 0.021	rs5076	-	T: 0.027 (3; n:110)	p= 1.00
Introne 3	IVS3+377 T>C	-	-	-	-	T:0.009 (1,n:110)	-

Tabella 10 (segue)

Esone/ Introne	Variazione nucleotidica	Frequenza allelica EUSNPs	Frequenza allelica EU1000 Genomes	Numero ID	Probabile effetto	Frequenza allelica popolazione AD	P value
3' UTR	1870+879 C>A	-	-	-	-	A:0.91 (100;n:110)	-
3' UTR	1870+931 C>T	-	-	-	-	T: 0.572 (63;n:110)	-
3' UTR	1870+858 T>C	-	-	-	-	C:0.191 (21;n:110)	-
3' UTR	1870+85 G>A	-	-	-	-	A: 0.009 (1;n:110)	-
3' UTR	1870+125 A>G	G:0.021	G: 0.021	rs12718463	-	G: 0.018 (2;n:110)	p= 1.00
3' UTR	1870+122 T>A	A: 0.021	A: 0.017	rs5081	-	A:0.009 (1;n:110)	p= 0.516
3' UTR	1870+300 A>C	-	-	-	-	C: 0.027 (3; n: 110)	-
3' UTR	1870+421 C>T	T: 0.021	T: 0.041	rs12721025	-	T: 0.027 (3; n:110)	p= 1.00
3' UTR	1870+749 A>G	-	-	-	-	G:0.036 (4; n:110)	-

Nessuna delle varianti identificate risulta associata in maniera significativa al fenotipo AD.

4.2 Analisi del gene LPL

Il secondo gene analizzato è stato il gene LPL. Questo grazie alla sua attività lipolitica influenza indirettamente i livelli di HDL.

La Figura 24 riassume le varianti identificate in questo gene.

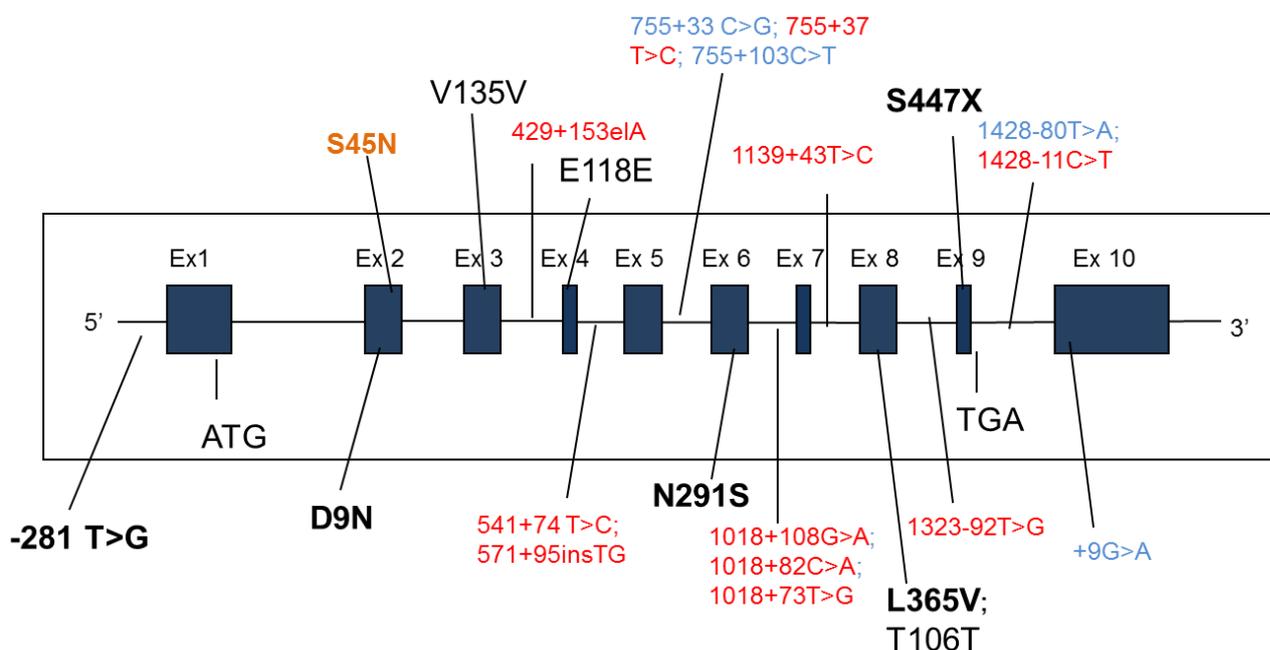


Figura 24: Variazioni identificate nel gene ApoA1. In arancione la variazione esonica nuova, in azzurro le variazioni introniche note; in rosso le varianti introniche nuove; in nero le variazioni esoniche.

Nel gene LPL sono state identificate 8 variazioni esoniche di cui 4 missenso, 3 sinonime e 1 nonsense; 1 variazione al 5'UTR e 14 variazioni introniche di cui 10 non descritte in letteratura (in figura in rosso).

Così come per le variazioni identificate nel gene ApoA1, anche in questo caso sono state calcolate le frequenze alleliche nella popolazione AD e confrontate con quelle dei database EUSNPS e 1000 Genomi (Tabelle 11) solo per le varianti già descritte.

Delle 4 variazioni missenso identificate, 3 risultano già descritte in letteratura (D9N; N291S; L365V) associate a iperlipidemia, deficit di LPL e bassi livelli di HDL. Nella nostra popolazione le varianti L365V ($p=0.001$) e N291S ($p=0.015$) risultano associate al fenotipo caratterizzato da bassi valori di HDL e alti valori di trigliceridi.

Per quanto riguarda la mutazione nonsense S447X, dagli studi presenti in letteratura sembra che tale variazione possa originare un aumento di funzione della proteina e risultare quindi associata a bassi valori di trigliceridi e ad un minore rischio di sviluppare malattie coronariche. Infatti questa variazione risulta a bassa frequenza nella popolazione analizzata (0.064) rispetto alle popolazioni di controllo (0.125 e 0.123), sebbene questa differenza non risulti statisticamente significativa ($p= 0.114$). Un'altra variazione funzionalmente già caratterizzata è quella rinvenuta al 5' (-281T>G) che risulta diminuire del 40-50% l'attività del promotore del gene ed è quindi considerata associata ad un fenotipo iperlipidemico. Tuttavia, la frequenza riscontrata nella nostra popolazione non risulta significativamente diversa da quella dei controlli.

Una variazione viene, invece, descritta per la prima volta: la S45N nell'esone 2 (in figura in rosso). Essa si trova nel dominio amino-terminale della proteina che rappresenta il sito con l'attività catalitica. La S45N si trova anche vicino a un sito di glicosilazione fondamentale per la corretta maturazione della proteina.

Tra le varianti introniche solo la 755+33 C>G nell'introne 5 risulta, in base alla sua frequenza, associata in maniera statisticamente significativa ($p=0.001$) con il fenotipo AD.

Tabella 11: Variazioni LPL. n: numero alleli popolazione AD. È riportato il valore del P value (Test esatto di Fisher o χ^2)calcolato tra la frequenza allelica popolazione AD e frequenza allelica EUSNPs .

Esone/ Introne	Variazione nucleotidica	Frequenza allelica EUSNPs	Frequenza allelica EU1000 Genomes	Residuo aa	numero ID	Probabile effetto	Frequenza allelica popolazione AD	P value
Esone 1 (5'UTR)	- 281 T>G	G: 0.017	G: 0.013	-	rs1800590	↓attività del promotore	G:0.009 (1,n:110)	p= 1.00
Esone 2	106 G>A	A: 0.006	A : 0.01	D9N	rs1801177	↓HDL ↑TG,CAD	A:0.009 (1;n:110)	p= 1.00
Esone 2	215 G>A	-	-	S45N	NEW	-	A:0.009 (1,n:110)	-
Esone 3	405 G>A	A: 0.040	A: 0.041	V108V	rs1121923	-	A:0.053 (9,n:110)	p= 0.108
Esone 4	435 G>A	A: 0.058	A: 0.063	E118E	rs248	-	A:0.045 (5,n:110)	p= 0.771
Esone 6	953 A>G	G: 0.004	G: 0.016	N291S	rs268	↓HDL ↑TG	G: 0.045 (5n:110)	p=0.015
Esone 8	1164 C>A	A: 0.124	A: 0.120	T361T	rs316	-	A: 0.073 (8,n:110)	p= 0.154
Esone 8	1174 C>G	G:0	G: 0	L365V	rs118204078	LPL Deficienza	G: 0.009 (1,n:110)	P= 0.001
Esone 9	1421 C>G	G: 0.125	G: 0.123	S447X	rs328	↑HDL ↓TG, CAD	G: 0.064 (7,n:110)	p= 0.114

Tabella 11 (segue)

Esone/ Introne	Variazione nucleotidica	Frequenza allelica EUSNPs	Frequenza allelica EU1000 Genomes	numero ID	Probabile effetto	Frequenza allelica popolazione AD	P value
Introne 3	429+153 delA	-	-	-	-	delA:0.009 (1, n:110)	-
Introne 4	541+74 T>C	-	-	-	-	C:0.082 (9, n:110)	-
Introne 4	571+95insTG	-	-	-	-	insTG:0.091 (10, n:110)	-
Introne 5	755+33 C>G	G: 0	G: 0.136	rs254	-	G:0.090 (10,n:110)	p= 0.001
Introne 5	755+37 T>C	-	-	-	-	C:0.091 (10,n:110)	-
Introne 5	755+103 C>T	T: 0.138	T: 0.133	rs256	Associato a HDL e TG	T: 0.091 (10,n:110)	p= 0.268
Introne 6	1018+73 T>G	-	-	-	-	G: 0.164 (18,n:110)	-
Introne 6	1018+108 G>A	-	-	-	-	A: 0.091 (10,n:110)	-
Introne 6	1018+82 C>A	-	-	-	-	A:0.073 (8, n:110)	-
Introne 7	1139+43 T>C	-	-	-	-	C:0.145 (16; n:110)	-
Introne 8	1323-92 T>G	-	-	-	-	G:0.173 (19, n:110)	-
Introne 9	1428-80 T>A	A: 0.058	A: 0.037	rs117910839	-	A:0.027 (3,n:110)	p= 0.248
Introne 9	1428-11 C>T	-	-	-	-	C:0.064 (7n:110)	-
Esone 10 (3'UTR)	*9 G>A	A: 0.147	A: 0.142	rs4922115	Associato a HDL e TG	A: 0.1 (11,n:110)	p= 0.337

Successivamente le variazioni -281 T>G; D9N; S45N; N291S; L365V; S447X, al 5'-UTR oppure esoniche missenso e già descritte precedentemente funzionalmente associate ad anomale concentrazioni di colesterolo HDL, sono state ricercate nella nostra popolazione generale, costituita da 174 bambini sani tramite saggio SNaP.

Come prima cosa è stata messa a punto la PCR multiplex che ci ha consentito di amplificare contemporaneamente il 5' UTR e gli esoni 2, 6, 8 e 9 in cui si trovano le variazioni selezionate

La Figura 25 mostra il pannello elettroforetico della PCR multiplex (lane 1,2,3) con le 5 bande nella stessa lane elettroforetica e le bande (lane 4, 5, 6, 7, 8) dei singoli esoni in cui si trovano le variazioni da ricercare nella popolazione generale.

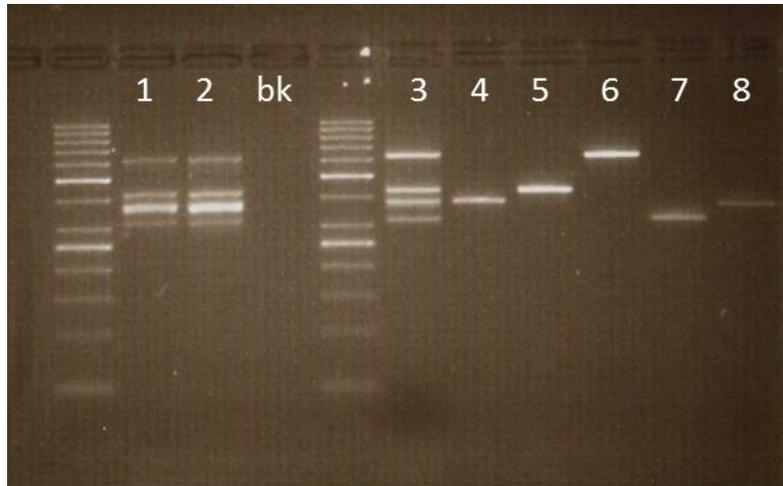


Figura 25: PCR multiplex delle regioni selezionate del gene LPL. Lane 1,2, 3: PCR MULTIPLEX 5'UTR, esone 2, esone 6, Esone 8, esone 9. Lane 4: 5' UTR; lane 5: esone 2 ; lane 6:esone 6; lane 7: esone 8: ; lane 8: esone 9.

La Figura 26 mostra i pannelli relativi all'analisi di primers extension mediante la quale le variazioni selezionate nella popolazione AD sono state ricercate nella popolazione generale. In particolare la figura mostra il risultato su soggetti eterozigoti (doppio picco).

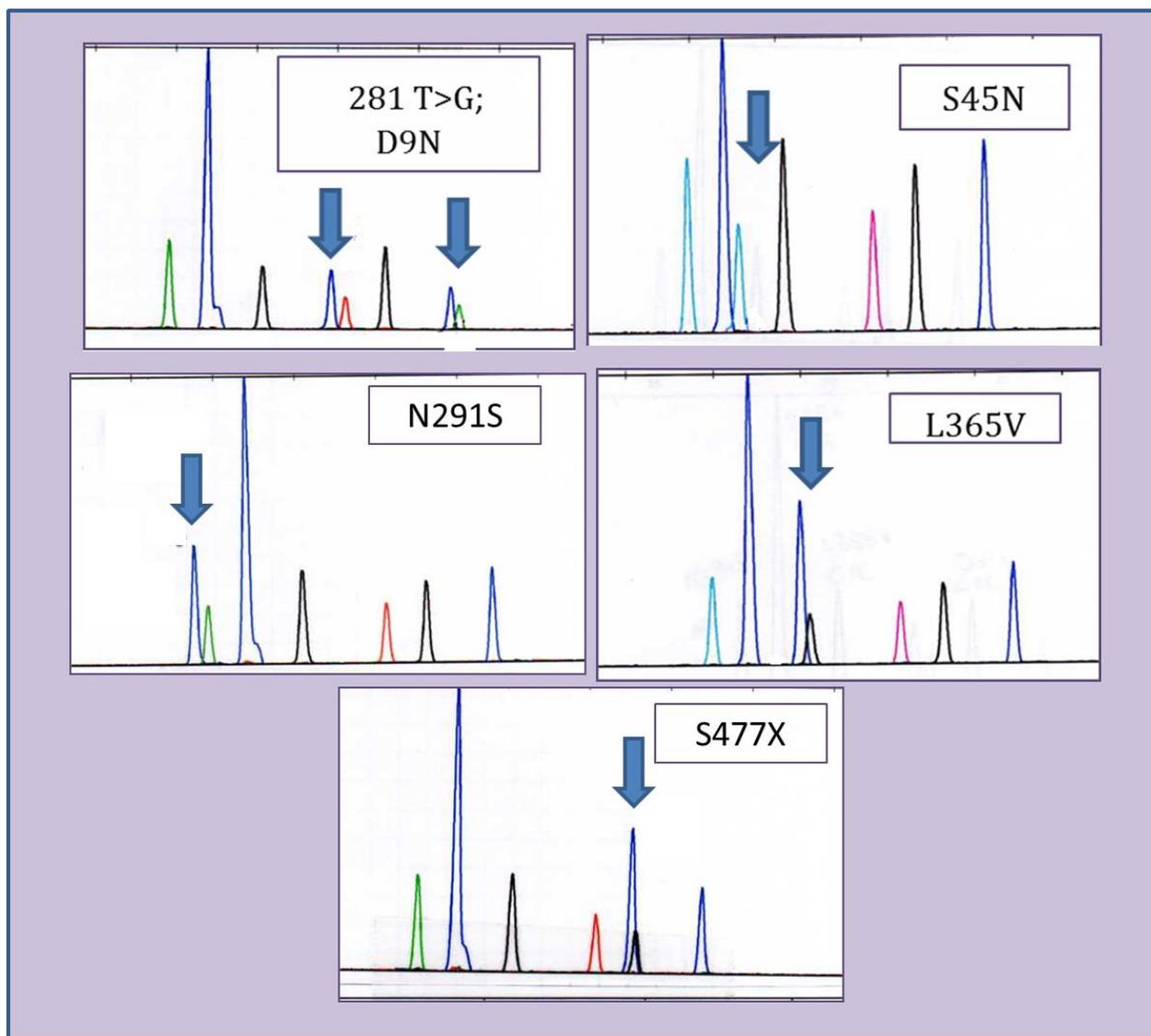


Figura 26: Pannelli dell'analisi SNaP. Le frecce indicano il doppio picco corrispondente alla variazione.

Le frequenze alleliche delle variazioni sulla popolazione generale sono state quindi confrontate con quelle calcolate precedentemente sulla popolazione AD (Tabella 12).

Solo la variazione L365V è risultata associata al fenotipo di dislipidemia aterogena in maniera statisticamente significativa ($p=0.010$).

Tabella 12: confronto delle frequenze alleliche nella popolazione AD e nella popolazione generale. n: numero alleli popolazione AD. n: numero alleli popolazione AD. È riportato il valore del P value (Test esatto di Fisher o χ^2)calcolato tra la frequenza allelica popolazione AD e frequenza allelica nella popolazione generale.

Esone/ Introne	Variazione nucleotidica	Residuo aa	numero ID	Frequenza allelica probandi AD	Frequenza allelica popolazione generale	P VALUE
Esone 1 (5'UTR)	- 281 T>G	-	rs1800590	G:0.009 (1, n:110)	G:0.023 (8, n:348)	p= 0.693
Esone 2	106 G>A	D9N (acido aspartico- asparagina)	rs1801177	A:0.009 (1; n:110)	A:0.020 (7; n:348)	p= 0.686
Esone 2	215 G>A	S45N (serina- asparagina)	NEW	A:0.009 (1,n:110)	A:0	p= 0.240
Esone 6	953 A>G	N291S (aparagina- serina)	rs268	G: 0.045 (5n:110)	G: 0.006 (2; n:348)	*p=0.010
Esone 8	1174 C>G	L365V (leucina-valina)	rs118204078	G: 0.009 (1,n:110)	G: 0	p=0.240
Esone 9	1421 C>G	S447X (serina-stop)	rs328	G: 0.064 (7,n:110)	G: 0.126 (44,n:348)	p= 0.068

4.3 Analisi del gene LCAT

Infine l'ultimo gene preso in considerazione è stato il gene che codifica per la lecitina:colesterolo aciltransferasi fondamentale nel metabolismo delle HDL.

Nel gene LCAT sono state identificate 3 variazioni esoniche, di cui 2 missenso, una sinonima e 7 variazioni introniche di cui due non descritte in letteratura (in figura in rosso) (Figura 27). Tra le varianti esoniche la L393L, che si trova vicino al sito catalitico dell'enzima, è il polimorfismo più descritto in questo gene e in alcune etnie è più frequente nei soggetti con bassi livelli di HDL. Anche nella nostra popolazione la sua frequenza (0.073), sebbene non in maniera significativa, è maggiore rispetto a quella riportata nei database EUSNPs e 1000 Genomi (0.040).

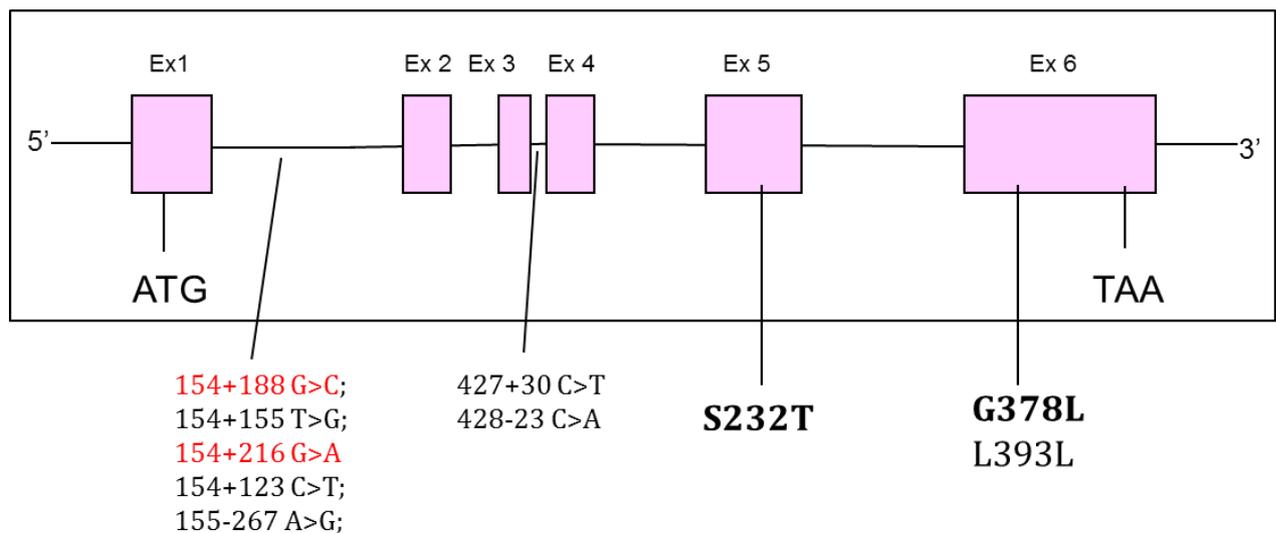


Figura 27: Variazioni identificate nel gene LCAT. In rosso le variazioni nuove.

La Tabella 13 illustra le frequenze delle variazioni nella nostra popolazione e nei database EUSNP e 1000 Genomi. Nessuna delle varianti esoniche identificate è risultata avere una frequenza nella popolazione AD diversa dalle popolazioni di controllo in maniera statisticamente significativa. Invece, dal confronto delle frequenze, la variante intronica 428-23 C>A risulta associata al fenotipo AD.

Dalla letteratura recente la variante intronica 155-267 A>G è uno polimorfismo associato alle HDL ma in questo studio non abbiamo trovato nessuna associazione statisticamente significativa.

Tabella 13: Variazioni LCAT. n: numero alleli popolazione AD. È riportato il valore del P value (Test esatto di Fisher o χ^2)calcolato tra la frequenza allelica popolazione AD e frequenza allelica EUSNPs

Esone/ Introne	Variazione nucleotidica	Frequenz a allelica EUSNPs	Frequenz a allelica EU1000 Genomes	Residuo aa	numero ID	Probabile effetto	Frequenza allelica Popolazione AD	P VALUE
Introne 1	154+188 G>C	-	-	-	NEW	-	C: 0.009 (1;n:110)	-
Introne 1	154+155 T>G	G: 0	G: 0	-	rs11860115	-	G:0.009 (1; n:110)	p= 0.482
Introne 1	154+123 C>T	T: 0.008	T:0.006	-	rs117817502	-	T: 0.009 (1, n:110)	p= 1.00
Introne 1	155-267 A>G	G: 0.140	G: 0.180	-	rs1109166	Associata alle HDL	G: 0.190 (21,n:110)	p= 0.486
Introne 1	154+216 G>A	-	-	-	NEW	-	A:0.009 (1;n:110)	-
Introne 3	427+30 C>T	T: 0.004	T: 0,001		rs201117928	-	A:0.009 (1;n:110)	p= 0.289
Introne 3	428-23 C>A	A: 0.136	A: 0.003		rs13306496	-	A: 0.027 (3; n:110)	p= 0.003
Esone 5	694 T>A	A: 0.050	A: 0.060	S232T	rs4986970	-	A: 0.018 (2;n:110)	p= 0.284
Esone 6	1177 C>T	T: 0.040	T: 0.040	L393L	rs5923	-	T: 0.073 (8;n: 110)	p= 0.131
Esone 6	1132 G>A	A: 0.001	A:0	G378L	rs145126045	-	A: 0.009 (1;n: 110)	p= 0.200

Nell'ultimo periodo del dottorato abbiamo allargato l'analisi mutazionale sui tre geni ad altri 29 pazienti che si caratterizzavano per avere bassi livelli di HDL.

Ampliando la popolazione d'analisi, nel gene ApoA1 abbiamo identificato un'altra variazione intronica e una variazione nell'esone 4 che porta a un cambiamento aminoacidico non conservato arginina-serina (A188S). Tale variazioni si trova all'inizio del dominio C-terminale che insieme all'N-terminale è coinvolto nel legame con i lipidi. Inoltre,

poiché questo aminoacido è il primo del dominio C-terminale potrebbe influenzare anche il dominio immediatamente precedente che lega LCAT, compromettendo quindi l'interazione di ApoAI con LCAT.

Nel gene LPL sono state identificate una variazione intronica e una variazione missenso nuova nell'esone 3 (R89Q) nel dominio catalitico dell'enzima. Infine nel gene LCAT l'analisi sui 29 pazienti ha portato all'identificazione di un'altra variazione intronica e una nuova variazione sinonima nell'esone 3 (Y135Y).

4.4 Caso Tangier

Il probando, un maschio caucasico di 38 anni, è arrivato al centro del Policlinico Umberto I per ipocolesterolemia. I suoi esami del sangue hanno mostrato un colesterolo totale di 53 mg/dl, HDL-C di 1mg/dl e trigliceridi di 202 mg/dl. Inoltre è stata riportata anche una lieve trombocitopenia (piastrine conteggio 72000/ μ l). Ha subito tonsillectomia nell'infanzia e splenectomia a causa di rottura spontanea all'età di 30 anni. Gli esami clinico e neurologico erano normali. L'esame del fondo oculare e l'elettroencefalogramma erano negativi.

Le caratteristiche di tutta la famiglia sono riassunte in Figura 28.

Livelli moderatamente bassi di HDL sono stati trovati anche nei parenti di primo grado del probando.

La concentrazione di ApoAI era molto bassa nel probando (100 mg/dl) così come era ridotta in tutti i membri della famiglia. La madre è morta all'età di 42 per aneurisma cerebrale; mentre il padre ha presentato una lieve trombocitopenia ed ha riferito ipertensione arteriosa. La sorella ha subito tonsillectomia come uno dei figli del probando. In entrambi i figli del probando, gemelli, è stata riscontrata una lieve splenomegalia in relazione alla loro età.

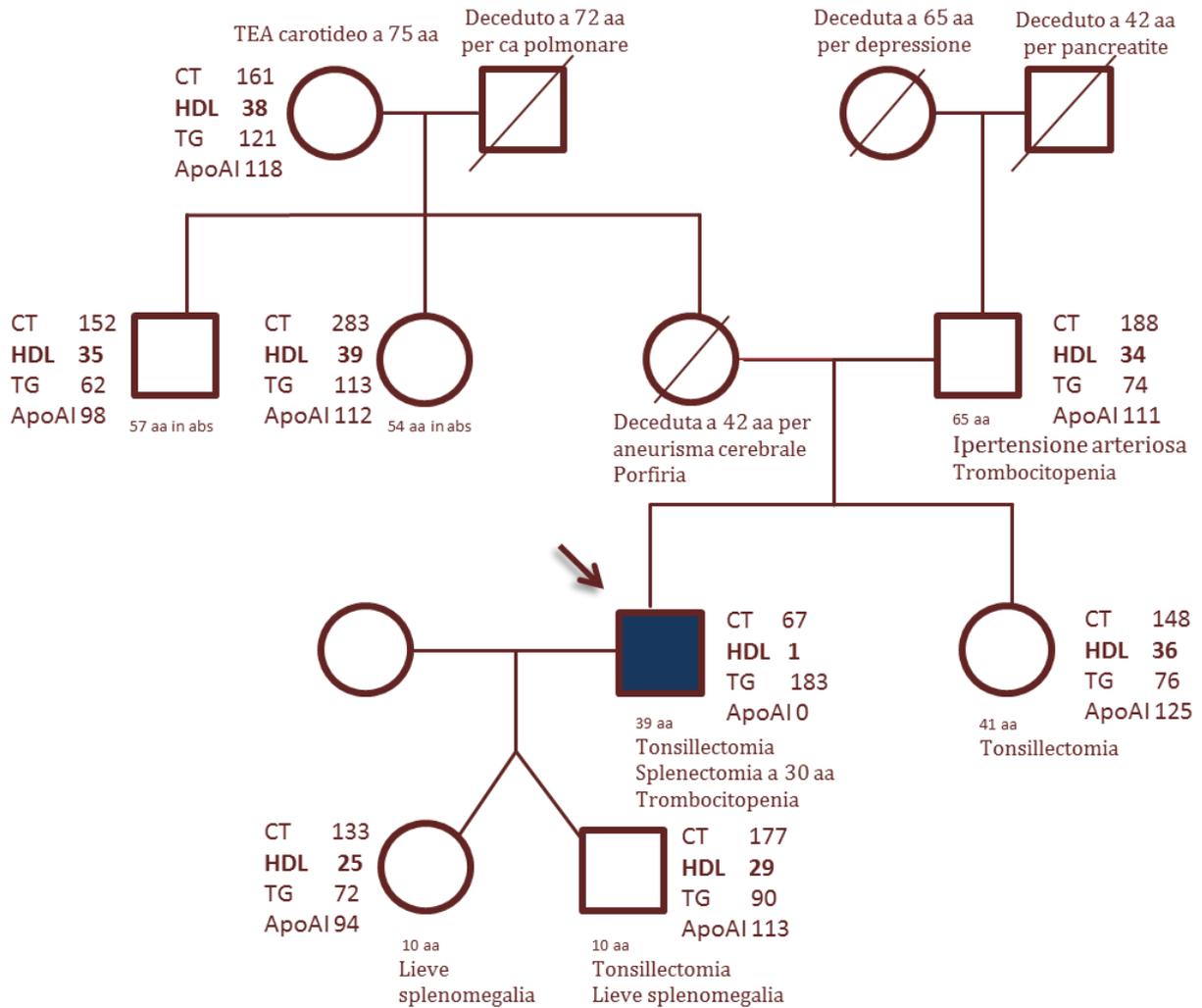


Figura 28: Pedigree della famiglia in studio. In blu probando. CT: colesterolo totale; TG: trigliceridi.

Al fine di identificare le mutazioni che confermassero il sospetto clinico di malattia di Tangier, è stata effettuato il sequenziamento del gene ABCA1.

L'analisi di tale gene ha individuato 4 variazioni esoniche, di cui 2 missenso (R219K, R1587K) e due sinonime (P312P,T1512T,); due variazioni al 5'UTR (-78insG, -18G>C) e 6 variazioni introniche di cui una mai descritta in letteratura (1510-1 G>A).

Per ogni variazione identificata, nella Tabella 14 sono indicate: la nomenclatura a livello di DNA, a livello di proteina, il numero ID e la frequenza allelica nei database EUSNPs e 1000 Genomi.

Tabella14 : Variazioni ABCA1. In azzurro le variazioni esoniche, in giallo le variazioni introniche

Esone/ introne	Variazione nucleotidica	Frequenza allelica EU SNPs	Frequenza allelica EU 1000 Genomi	Residuo aa	Numero ID	Probabile effetto
esone 2	-74_-75ins G	-	insG: 0.881	-	rs1799777	-
esone 2	-18 G>C	C: 0.093	C: 0.129	-	rs1800978	Associato a HDL e CT
esone 7	656 G>A	A: 0.208	A: 0.200	R219K	rs2230806	Protettivo per CAD
esone 9	936 C>T	T: 0.093	T: 0.100	P312P	rs2274873	-
esone 32	4931 G>T	-	T: 0.018	T1512T	rs41277763	-
esone 35	4760 A>G	G: 0.839	G: 0.800	R1587K	rs2230808	-
introne 10	1195-27 G>A	-	A: 0	-	rs200563809	Malattia di Tangier
introne 12	1510-1 G>A	-	-	-	new	-
introne 32	4559+30 G>T	T: 0.921	T: 0.900	-	rs2777801	-
introne 42	5758-255 A>G	G: 0.817	G: 0.800	-	rs2150867	-
introne 44	5928-332 G>A	A: 0.323	A: 0.329	-	rs2740484	-
introne 48	6401+86 C>A	A: 0.929	A: 0.912	-	rs2740485	-

Il probando è risultato eterozigote per tutte le variazioni esoniche a eccezione della R1587K in omozigosi; nessuna di queste variazioni è risultata precedentemente descritta come associata a malattia.

Per le variazioni introniche il probando è risultato eterozigote per la 1195-27 G>A e 1510-1 G>A e omozigote per le altre.

Al fine di stabilire la distribuzione di tali variazioni sui due alleli, le variazioni identificate nel probando sono state ricercate anche nel padre, la sorella, figli, zia e zio materni, nonna materna.

Al fine di stabilire la distribuzione di tali variazioni sui due alleli, le variazioni identificate nel probando sono state ricercate anche nel padre, la sorella, figli, zia e zio materni, nonna materna.

I risultati sono riassunti in Figura 29

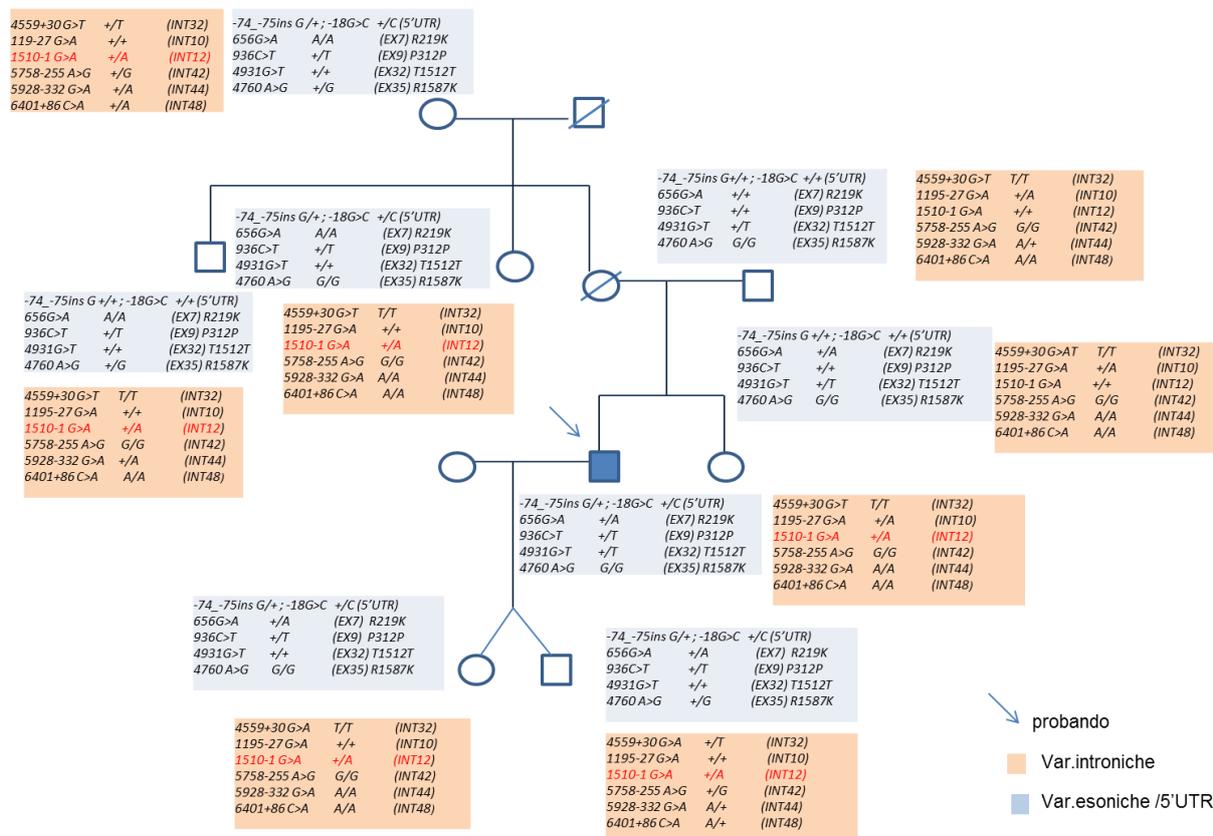


Figura 29: Variazione del gene ABCA1 identificate nella famiglia in studio. In azzurro variazioni esoniche; in rosa variazioni introniche, in rosso variazione nuova.

Successivamente sono stati sequenziati nel probando anche i geni ApoA1, LPL e LCAT ma non è stata identificata nessuna variazione.

Sorprendentemente per un gene grande come ABCA1 sono state descritte solo poche mutazioni che coinvolgono lo splicing dell'RNA.

Di queste ultime la 1195-27 G>A è stata descritta recentemente come mutazione associata alla malattia che provoca la formazione di una proteina tronca. La variazione, che si trova nell'introne 10, porta ad una ritenzione di 25 bp dell'introne 10 e poi prosegue con l'esone 11. La predizione del prodotto tradotto è una proteina di 418 aa che contiene una sequenza di 20 aa nuovi al C-terminale seguiti da un codone di stop. La variazione attiva un sito accettore di splicing che causa la parziale ritenzione dell'introne (Fasano et al., 2012).

Per capire se le varianti identificate avessero un effetto sull'espressione si è studiato l'mRNA del gene sul probando e su tutta la famiglia attraverso l'estrazione dell'RNA da anello di linfociti-monociti da sangue venoso periferico.

Per ogni variante identificata sono stati disegnati dei primers che permisero di valutare eventuali errori di splicing.

La Figura 30 mostra l'espressione del gene ABCA1 analizzata mediante RT-PCR. Per ogni zona analizzata possiamo vedere nella parte sinistra il pannello elettroforetico della reazione condotta in presenza di trascrittasi inversa (RT+) e nel pannello di destra la corrispondente reazione condotta senza trascrittasi inversa (RT-) nella quale l'assenza di prodotti di amplificazione rappresenta il controllo negativo dell'esperimento.

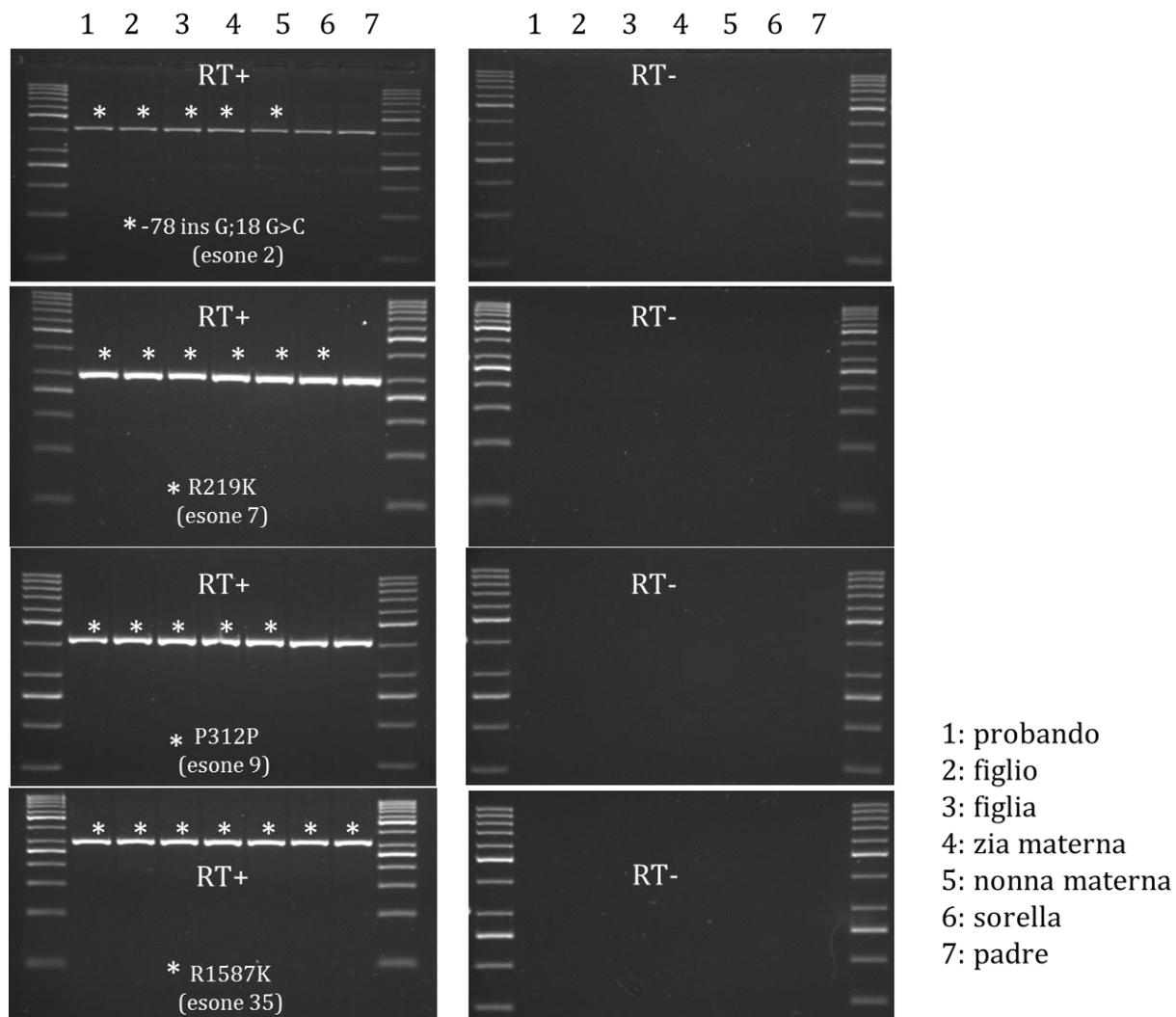


Figura 30: Analisi d'espressione del gene ABCA1. L'asterico indica la presenza della variazione nel soggetto.

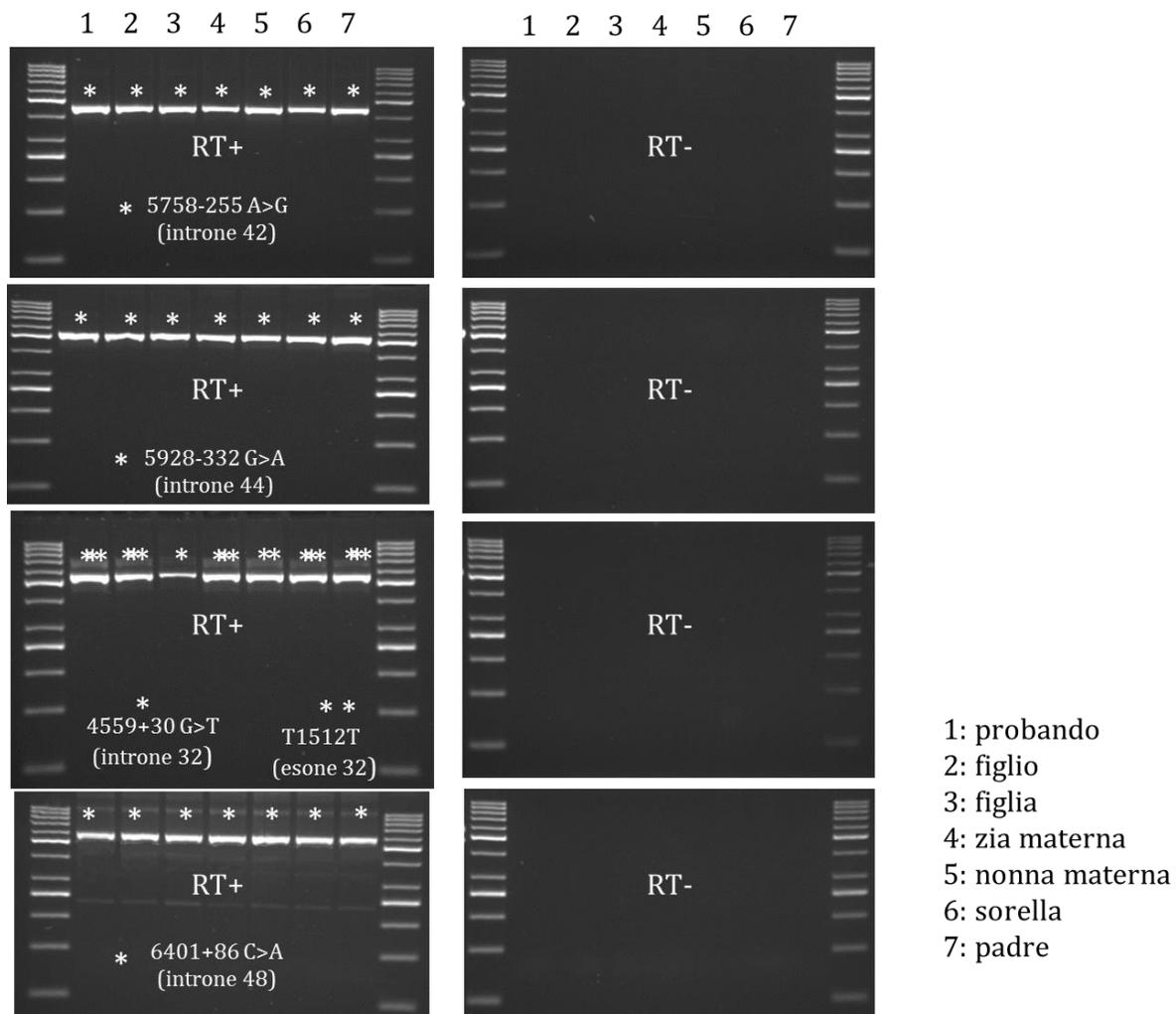


Figura 30 (segue)

Abbiamo ottenuto una positività per le due varianti introniche 11925-27 G>A e 1510-1 G>A.

Come ci si aspettava l'analisi della variante intronica 1195-27 G>A attraverso PCR con primer specifici ha dato in elettroforesi due bande corrispondenti rispettivamente all'allele wild type e all'allele con la ritenzione di una parte dell'introne (25bp) (Figura 31) e successivamente l'inserimento di un codone di stop.

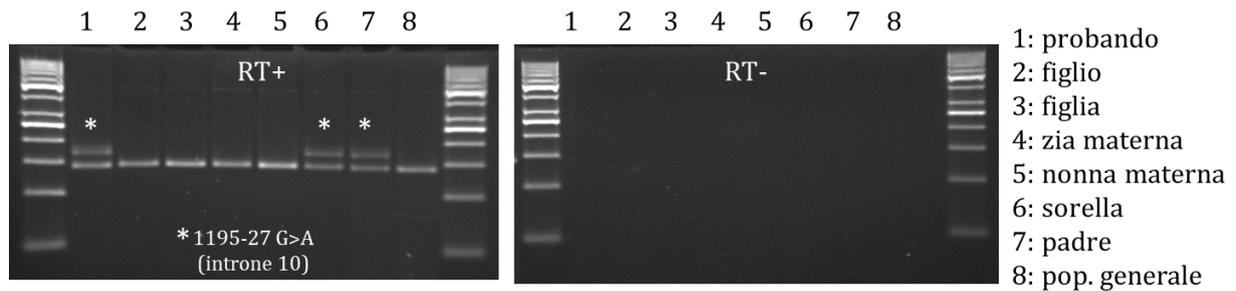


Figura 31: Analisi d'espressione della variante intronica 1195-27 G>A. L'asterico indica la presenza della variazione nel soggetto.

Anche l'analisi della variante nuova 1510-1 G>A ha dato in elettroforesi due bande ma in questo caso non si tratta di ritenzione di parte dell'introne ma dell'esclusione di parte dell'esone 13 (Figura 31 segue). Le due varianti introniche provocano dunque difetti nello splicing che è un processo fondamentale attraverso il quale dal messaggero vengono tagliati via gli introni fino ad ottenere il messaggero finale costituito esclusivamente da sequenza codificante.

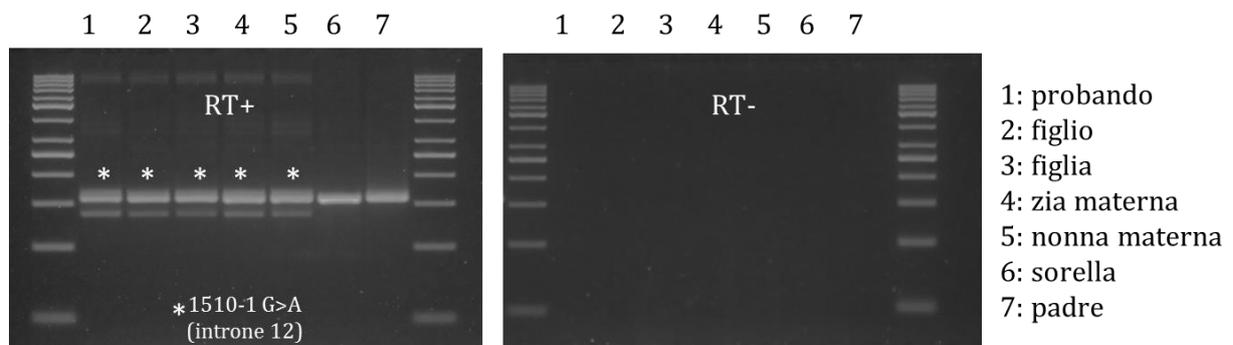


Figura 31 (segue) Analisi d'espressione della variante intronica 1510-1 G>A. L'asterico indica la presenza della variazione nel soggetto.

La figura mostra come il probando, i figli, la zia e la nonna materne, che portano la variante 1510-1 G>A, sono caratterizzati dalla presenza di una seconda banda, di dimensioni minori, rispetto alla banda wild type. Abbiamo quindi estratto le due bande da gel e sequenziato gli ampliconi per capire di che difetto si trattasse.

La Figura 32 mostra le sequenze wild type e mutata.

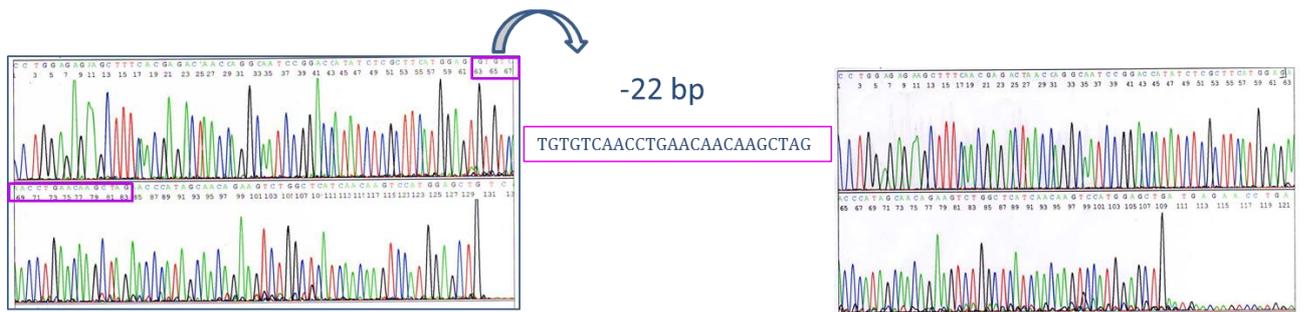
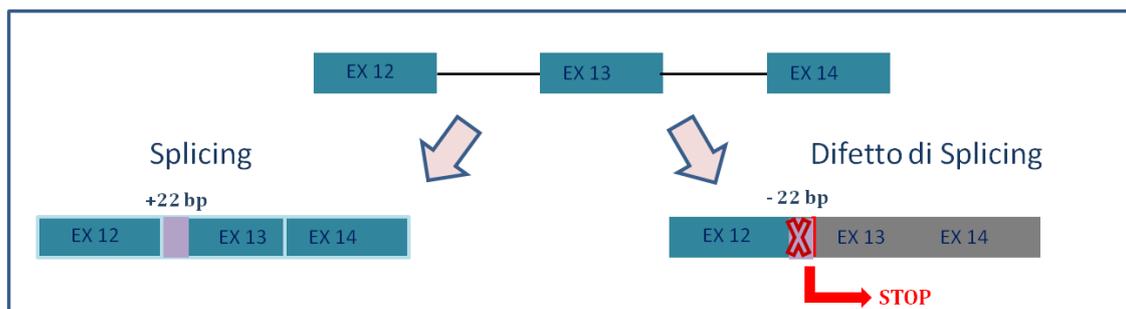


Figura 32: A sinistra sequenza wild type, a destra sequenza mancante di 22 basi dell'esone 13.

La variante provoca il taglio di 22 basi dell'esone 13. L'analisi in silico effettuata con il software ExPASy Translate tool ha predetto la formazione di una proteina tronca con l'introduzione di un codone di stop all'esone 13 e quindi, molto probabilmente, non funzionale (Figura 33).



MetACWPQLRLLLWKNLTFRRRQTCQLLLEVAWPLFIFLILISVRLSYPPYEQHECHFPNKA**Met**PSAGTLPWVQ
 GIICNANNPCFRYPPTGPEAPGVVGNFNKSIVARLFS DARRLLYSQKDT**Met**KD**Met**RKVLRTLQKIKSSNL
 KLQDFLVDNETFSGFLYHNLSLPKSTVDK**Met**LRADVILHKVFLQGYQLHLTSLCNGSKSEE**Met**IQLGDQEVSEL
 CGLPREKLAAAERVLR**Met**DILKPILRTLNSTSPFPSKELAEATKLLHSLGTLAQELFS**Met**RSWSD**Met**RQEV
MetFLTNVNSSSSTQIYQAVSRIVCGHPEGGGLKIKSLNWEEDNNYKALFGGNGTEEDAETFYDNSTTPYCND
LMetKNLESSPLSRIIWKALKPLLVGKILYTPDTPATRQV**Met**AEVNKTFQELAVFHDLEG**Met**WEELSPKIWTF
MetENSQE**Met**DLVR**Met**LLDSRDNDHFWEQQLDGLDWTAAQDIVAFLAKHPEDVQSSNGSVYTWREAFNETN
 QAIRTISR**Met**ENP**Stop**

ExPASy Translate tool

Figura 33: Difetto di splicing provocato dalla variante intronica 1510-1 G>A.

Infine abbiamo ricercato le due varianti introniche identificate nel gene ABCA1 (1195-27 G>A; 1510-1 G>A) nella popolazione pediatrica completa ma tutti i soggetti sono wild type.

CAPITOLO V: Discussione

Le dislipidemie possono essere causate sia da fattori congeniti che acquisiti e sono caratterizzate da alterazioni quali-quantitative di lipidi e proteine plasmatiche. Numerosi studi epidemiologici e studi condotti in modelli animali hanno contribuito ad accrescere la consapevolezza di un'associazione tra dislipidemie, aterosclerosi e patologie coronariche. L'incidenza di queste patologie è notevolmente aumentata e costituisce la principale causa di morte nei Paesi industrializzati e in molti Paesi in via di sviluppo.

Gli importanti progressi nel campo della biologia molecolare ed il completamento del progetto genoma hanno portato negli ultimi 10 anni all'identificazione di numerosi geni coinvolti nei meccanismi fisiopatogenetici associati alle dislipidemie. Questi geni rappresentano i bersagli del futuro di nuove terapie farmacologiche.

Il primo obiettivo di progetto di dottorato è stato quello di analizzare tre geni, ApoA1, LPL e LCAT coinvolti nel metabolismo delle HDL le cui mutazioni sono associate a dislipidemia aterogena.

ApoA1 gioca un ruolo essenziale nella formazione, maturazione e nel metabolismo delle HDL. Variazioni genetiche e mutazione nella sequenza di questo gene possono influire sui livelli di HDL e sul rischio coronarico compromettendo l'attivazione di LCAT e riducendo livelli di ApoA1 e HDL. Alle variazioni genetiche si associano condizioni cliniche più o meno gravi ma quasi sempre associate a CAD.

LPL, enzima chiave nel metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi, non agisce direttamente sulle HDL ma la sua azione ha degli importanti effetti indiretti sul metabolismo delle HDL, tanto che uno dei segni del deficit di LPL sono proprio i bassi livelli di HDL.

LCAT è associato alle HDL e dalla sua azione si produce colesterolo esterificato. Le due rare sindromi associate a mutazioni su questo gene si caratterizzano per i livelli bassi di HDL, sebbene solo la deficienza dell'enzima in omozigosi sia associata a CAD prematura.

In una prima fase dello studio abbiamo analizzato una popolazione di 55 bambini che oltre ad avere bassi livelli di HDL avevano anche alti livelli di trigliceridi

Abbiamo quindi confrontato le frequenze alleliche delle variazioni identificate dopo aver condotto l'analisi mutazionale sui tre geni con le frequenze alleliche dei database EUSNPs e 1000 Genomi, e nel caso delle varianti identificate nel gene LPL, con quelle di una popolazione generale di bambini normolipidemici. Con lo scopo di selezionare le variazioni

di sequenza che con maggiore probabilità possono essere alla base del fenotipo osservato, abbiamo applicato i seguenti 3 criteri: 1) significatività statistica del confronto di frequenza allelica tra la nostra popolazione e il DB EUSNPs; 2) significatività statistica del confronto di frequenza allelica tra la nostra popolazione e il DB EU1000 Genomi; 3) caratterizzazione funzionale già riportata in letteratura come mutazione causa di patologia. La positività anche ad uno solo dei precedenti criteri ha costituito motivo di selezione delle variazioni di sequenza e indicazione per esse di probabile causa di patologia. Naturalmente, gli sviluppi futuri del progetto implicano l'effettuazione della caratterizzazione funzionale di quelle mutazioni così selezionate, ma per le quali non sia già stata descritta.

Considerando quindi i criteri descritti, nel gene ApoA1 non è stata individuata nessuna variante associata al fenotipo AD.

Nel gene LPL le variazioni -281 T>G, D9N, N291S, L365V risultano già descritte in letteratura come associate a bassi livelli di HDL.

La variazione -281 T>G al 5'UTR diminuisce l'attività del promotore del gene LPL di circa il 50% in quanto influenza il legame con specifici fattori di trascrizione. Le variazioni D9N e N291S rispettivamente nell'esone 2 e nell'esone 6 del gene, sono associate a bassi livelli di HDL e alti livelli di trigliceridi nonostante, nella nostra popolazione, solo la seconda risulti associata in maniera statisticamente significativa a tale fenotipo.

La variazione L365V nell'esone 8 è classificata come mutazione associata a deficit di LPL in quanto causa una severa riduzione della massa dell'enzima e perdita dell'attività enzimatica. Infatti dal confronto delle frequenze sia con i database che con la nostra popolazione generale risulta associata a fenotipo AD.

Tra le varianti introniche identificate nel gene LPL solo la 755+33 C>G nell'introne 5 risulta associata al fenotipo AD, nonostante non ci sia nessuna descrizione precedente.

Infine delle varianti identificate nel gene LCAT la variazione 428-23 C>A nell'introne 3 risulta associata al fenotipo AD.

Dallo studio condotto sui 55 pazienti con fenotipo caratterizzato sia da bassi livelli di HDL che alti livelli di trigliceridi, la prevalenza degli alleli potenzialmente mutati è 0.18 (20 alleli positivamente selezionati su 110).

La prevalenza degli alleli mutati nella popolazione generale risulta invece di 0.013.

Una delle forme più severe di deficienza di HDL è rappresentata dalla malattia di Tangier, un disordine autosomico recessivo caratterizzato da livelli di HDL estremamente bassi. Come già detto, questa malattia è dovuta a mutazioni nel gene ABCA1 che svolge un ruolo chiave nel trasporto inverso del colesterolo. La mancanza di una proteina ABCA1 funzionale ostacola l'efflusso di colesterolo al di fuori delle cellule determinando l'accumulo di colesterolo all'interno di esse, prevenendo la conversione delle particelle ApoAI-lipid poor in pre-beta-HDL e causandone così il rapido catabolismo principalmente per via renale.

Il secondo obiettivo del progetto del dottorato riguardava la caratterizzazione mutazionale del gene ABCA1 in un paziente adulto che mostrava chiare caratteristiche cliniche associate alla malattia di Tangier. Inoltre l'intero quadro familiare mostrava bassi livelli di HDL.

Il probando è risultato essere eterozigote composto per due varianti introniche, delle quali una descritta solo recentemente come associata a malattia, mentre l'altra è stata descritta in questo lavoro per la prima volta. Tali variazioni compromettono il normale processo di splicing. La reazione di splicing avviene ad opera dello spliceosoma attraverso due reazioni consecutive di trans-esterificazione, i siti esatti per tali reazioni sono definiti dalla presenza di sequenze consensus. La prima sequenza consensus viene chiamata sito di splicing al 5' ed è relativamente corta. Nei mammiferi solo i primi due nucleotidi dell'introne di tale sequenza (*GU*) sono universalmente conservati, nonostante non siano gli unici nucleotidi importanti. La seconda sequenza consensus al sito di splicing 3' viene definita da tre elementi separati: il sito di ramificazione, il tratto di polipirimidine ed il dinucleotide *AG*.

Le mutazioni nei siti di splicing spesso si verificano nei dinucleotidi *GT* (*GU* nell'RNA) e *AG*, localizzati rispettivamente all'inizio di un introne (*sito donatore di splicing*) o alla sua fine (*sito accettore di splicing*). Le mutazioni nei siti di splicing possono portare all'omissione di un intero esone (*exon skipping*) o alla ritenzione di un intero introne (*intron retention*), oppure ancora all'attivazione di un sito criptico di splicing. Sebbene la maggior parte delle alterazioni patologiche siano state osservate in posizione +1/+2 o -1/-2 rispettivamente del sito donatore e accettore di splicing, anche sostituzioni in altre posizioni, che possono essere vicine o distanti dai dinucleotidi canonici (*AG*, *GT*), possono essere responsabili di un fenotipopatologico.

La variante 1195-27 G>A è già stata descritta in un paziente caratterizzato da livelli di HDL e ApoAI caratteristici della malattia di Tangier (HDL: 5 mmol/dl; ApoAI: <30 mg/dl). Gli

autori del lavoro hanno eseguito solo un'analisi in vitro tramite l'utilizzo di un minigene wild type e uno mutante. Tramite questa analisi hanno dimostrato che la variante induce l'attivazione di un sito intronico accettore di splicing che provoca la ritenzione di parte dell'introne nel messaggero maturo. Il risultato è il frameshift e la formazione di una proteina tronca che dovrebbe perdere la funzionalità. Il paziente già descritto era risultato eterozigote per la variazione 1195-27 G>A e dunque per spiegare il fenotipo clinico di malattia di Tangier sarà necessario la ricerca di un'altra mutazione. Inoltre l'analisi mutazione dei altri geni coinvolti nel metabolismo delle HDL, quali ApoAI, LCAT e LPL, ha dato risultato negativo.

Nel nostro progetto abbiamo confermato in vivo il risultato in vitro raggiunto dagli autori del lavoro. Infatti, anche nel nostro probando abbiamo identificato la variante intronica 1195-27 G>A in eterozigosi.

L'analisi mediante lo studio d'espressione condotto sui linfociti-monociti da sangue venoso periferico del probando ha confermato che la variazione provoca la ritenzione di parte dell'introne con formazione di una proteina tronca.

L'analisi mutazione del gene ABCA1 ha inoltre portato all'identificazione nel probando di una nuova mutazione intronica finora mai descritta: la 1510 -1 G>A.

L'analisi in vivo di questa variante ha dimostrato che essa provoca il taglio di una parte dell'esone con formazione di una proteina tronca. È probabile che la proteina che si forma non raggiunga la superficie cellulare e rimanga bloccata nel reticolo endoplasmatico o che venga inibita l'oligomerizzazione di ABCA1, in entrambi i casi si produrrà una proteina non funzionale.

A conferma che entrambe le variazioni sono associate all'alterazione dei livelli di HDL, tutti i familiari del probando, caratterizzati da bassi livelli di HDL, sono risultati eterozigoti per una o per l'altra variazione intronica .

Anche in questo caso l'analisi mutazionale degli altri geni ha dato esito negativo.

In conclusione il probando risulta un eterozigote composto per le due varianti introniche 1195-27 G>A e 1510-1 G>A, con effetto funzionale sui meccanismi di splicing. Questi risultati evidenziano una chiara relazione tra le mutazioni individuate a livello genotipico e i livelli di colesterolo HDL rilevati a livello fenotipico. Dal punto di vista metodologico, inoltre, evidenziano che lo studio dell'mRNA con approcci adatti all'analisi delle alterazioni dello splicing di ciascun esone di geni malattia, possono consentire l'individuazione e la

caratterizzazione funzionale di mutazioni introniche in maniera più efficace della ricerca mutazionale diretta sul DNA, in special modo in geni estesi quali l'ABCA1.

CAPITOLO VI: Conclusioni

Dai nostri risultati è possibile trarre le seguenti conclusioni, relativamente alla caratterizzazione di popolazioni e pazienti con bassi valori di colesterolemia HDL e, alti valori di trigliceridemia.

1) Risulta particolarmente utile lo studio di casistiche pediatriche, per ridurre al minimo l'influenza esercitata dai fattori ambientali.

2) Dal punto di vista metodologico, l'analisi mutazionale semiautomatizzata per sequenziamento in formato multiwell, nonché l'analisi funzionale a livello dell'mRNA, si rivelano strumenti molto potenti di indagine genetica, specialmente se usati in sinergia.

3) L'analisi effettuata nella popolazione con AD sui tre geni che più sono descritti influenzare i livelli di HDL ha portato ad identificare 5 alleli potenzialmente mutati (in particolare 4 nel gene LPL e 1 nel gene LCAT) con una prevalenza totale di 0.18.

5) La positività del 18% degli alleli, pur spiegando parte del fenotipo, evidenzia il probabile coinvolgimento di altri geni nell'insorgenza di questa sindrome. Ciò può essere dovuto alla complessità del metabolismo delle HDL e le numerosi interazioni tra queste lipoproteine con enzimi, recettori, altre lipoproteine e proteine trasportatrici. La ricerca mutazionale dovrebbe essere allargata anche ad altri geni candidati. Inoltre risulta fondamentale ampliare la popolazione su cui effettuare l'analisi mutazionale. L'identificazione di altri geni associati alla sindrome da basse HDL, l'individuazione e caratterizzazione delle loro alterazioni molecolari, è di cruciale importanza sia a scopo diagnostico e prognostico oltre che per la definizione di nuove terapie.

6) L'analisi mutazionale del gene ABCA1 ha permesso di individuare una nuova mutazione di splicing che insieme a quella recentemente identificata può essere associata alla malattia Tangier. Ciò contribuisce ad allargare il catalogo delle mutazioni responsabili di questo raro disordine, migliorandone l'aspetto diagnostico.

RINGRAZIAMENTI

All'inizio della stesura di questa tesi non pensavo di scrivere nessun ringraziamento. Le difficoltà, i risultati "non aspettati", l'amarezza di accettare una nuova realtà, le delusioni, mi avevano quasi convinta a lasciare questo lavoro quasi anonimo, a non dire una parola.

E invece adesso mi ritrovo qui, a qualche giorno da questo benedetto 20 dicembre che arriverà e passerà e si porterà via 3 anni del mio sudore, dei miei studi, 3 anni di momenti belli e brutti, 3 anni della mia vita. E mi sembra quasi impossibile non ringraziare tutte quelle persone che mi hanno accompagnato in questo percorso.

Come non ringraziare il Prof. Lucarelli per avermi fatto capire che la scienza si deve amare al 100%, che essere uomo di scienza significa dedicare ad essa una parte del cuore e del cervello costantemente. Puoi andare via dal laboratorio, puoi chiudere un faldone o spegnere il pc, la scienza te la porti dentro e spesso è proprio quando non si è in laboratorio che arrivano le migliori idee. Grazie Prof. perché in questi anni grazie a lei sono cresciuta e ho capito che, anche se a volte vorrei davvero cambiare lavoro, la verità è che sono ancora profondamente innamorata di quell'infinitamente piccolo e che con una pipetta in mano mi sento davvero realizzata.

Grazie al Prof. Ferraguti, che spero non se la prenda, ma per me è "Giampi". Grazie per i tuoi consigli, per il prezioso supporto informatico, per le chiacchierate del tardo pomeriggio. Grazie perché sempre, ma soprattutto in questi ultimi giorni mi stai dimostrando il tuo affetto sincero.

Grazie a Silvia per avermi insegnato che la precisione e l'ordine sono due cose che non possono mancare in questo lavoro. Grazie per questi anni passati insieme tra un esperimento e una chiacchiera, tra un ragionamento e una sana risata. Grazie anche a Giorgio per i suoi aiuti tecnici e per l'ES26-2 che mia ha portato sempre bene.

Grazie a Sabina, per tutte le volte che hai sopportato le mie lamentele, per il nostro caffè della mattina che è entrato a far parte dei nostri protocolli sperimentali. So che anche a te mancherà da morire. Grazie per gli abbracci e per le tue critiche che ormai faccio anche da sola.

Grazie a Claudia. Non posso descriverti né come una collega né come una semplice amica. Tu per me sei una sorella. Grazie per tutto quello che fai per me ogni giorno, grazie per la tua allegria, il tuo modo di affrontare la vita, grazie per rendere speciale ogni giorno. Grazie per aver condiviso con me sia le cose belle che quelle brutte, per i nostri momenti di svago ma anche quelli di concentrazione, ricorda che ti devo almeno una scatola di Maloos.

Claudia grazie soprattutto per farmi sentire ogni giorno una persona amata e mai sola. So che quello che siamo diventate non potrà finire mai.

Grazie al Prof. Ceci, a Giancarlo, Roberto e Martina per tutte le giornate passate insieme. Un ringraziamento particolare va a Gianluca perché senza di te su chi avrei riversato i miei momenti di ira? Mi mancherai “ni”.

Grazie al Prof. Arca e alla Dott.ssa Montali per avermi permesso di svolgere questo progetto di ricerca. Grazie a Ilenia, Alessia, Ester e tutti i colleghi della prima Clinica Medica. Vi conosco da tre anni eppure a volte mi sembra di conoscervi da sempre. Grazie per il vostro sostegno e l’amicizia che mi avete mostrato.

Come non ringraziare la mitica Dott.ssa Crudeli, per gli amici “Annabella”. Da quando portavi le provette di sangue tra le penne quanti momenti unici abbiamo passato insieme. Sono sicura che riusciremo a realizzare i nostri sogni.

Un grazie speciale va a Claudio, per tutte le cene che mi hai preparato dopo le giornate passate a scrivere la tesi, per le serate passate a ridere, perché anche se siamo “opposti”, insieme riusciamo a non pensare alle cose tristi e a sorridere per le cose più semplici. Grazie perché sei la dimostrazione che a volte la prima sensazione è quella che conta e tu sei entrato subito nel mio cuore.

Grazie a tutti gli amici dell’Enoteca D’Orio, il vostro sorriso e la vostra compagnia hanno scaldato le serate degli ultimi mesi.

Grazie alle mie fantastiche coinquiline Jennifer, Ilaria e Carla. Siete state un regalo bellissimo in un momento di grandi cambiamenti. Vi voglio un mondo di bene.

Grazie a mia madre perché, anche se spesso ho voluto essere diversa da te, mi rendo conto che molte delle cose che mi piacciono di me vengono proprio da te.

Grazie a mia sorella Ilenia, per le soddisfazioni che mi da e per avermi aiutato nonostante la distanza.

Un grazie immenso va a mio padre, al quale dedico questo lavoro. Anche se in questi anni non sono mancati i momenti di silenzio e di lotta tra noi due, non posso non ammettere che tu sei la persona che amo di più al mondo. Grazie papà perché ogni giorno mi dai la forza per andare avanti.

Grazie alle mie due piccole pesti, Gaetano ed Emanuele. Siete la gioia più grande dei miei ritorni in Sicilia. Grazie a mia nonna, ai miei zii e ai miei cugini perché, anche se siamo lontani, sento il vostro amore costantemente.

Grazie all'intramontabile trio Melissa, Madda e Fabiana. La nostra amicizia ha superato brillantemente gli anni dell'università e adesso, che ognuno di noi ha fatto le sue scelte, rimaniamo sempre le vecchie amiche di biologia.

Grazie a tutte le persone che non ho menzionato ma che hanno contribuito a rendere le mie giornate più piacevoli e sorridenti.

Infine l'ultimo pensiero va al posto che mi ha ospitato negli ultimi sei anni: l'ex laboratorio centrale, ex camera mortuaria, primo piano, di fronte la Banca di Roma. Sei anni bellissimi che non dimenticherò mai, perché con le persone giuste qualsiasi posto può diventare il migliore del mondo.

BIBLIOGRAFIA

Ajees AA, Anantharamaiah, GM, Mishra V K, Hussain M M, Murth HMK. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006; 103: 2126-2131.

Albers JJ, Bergelin RO, Adolphson JL, Wahl PW. Population-based reference values for lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT). *Atherosclerosis* 1982; 43(2-3):369-79.

Arakawa R, Yokoyama S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem* 2002; 277(25):22426-9.

Barr DP, Russ EM, Eder HA. Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Am J Med.* 195; 11(4): 480-93.

Barter PJ. Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atheroscler. Supp.* 2002; 3(4):39-47.

Brautbar A. and Ballantyne CM. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. *Nature Reviews Cardiology* 2011; 8: 253-265.

Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaró S, Olivecrona T. Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am J Physiol* 1990; 258(4 Pt 1):C673-81.

Carlson LA, Philipson B. Fish-eye disease. A new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia. *Lancet* 1979; 2(8149):922-4.

Chen CH, Albers JJ. Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107(3):1091-6.

Clee S.M; Zwinderman A.H.; Engert J.C.; Zwartz K.Y.; Molhuizen H.O.F.; Roomp K.; Jukema J.w.; van Wijland M.; van Dam M.; Hudson T.J.; Brooks-Wilson A.; Genest J.; Kastelein J.J.P.;

and Hayden M. R. Common Genetic Variation in ABCA1 Is Associated With Altered Lipoprotein Levels and a Modified Risk for Coronary Artery Disease. *Circulation* 2001;103:1198-1205.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001; 42(7):1007-17.

Denis M, Haidar B, Marcil M, Bouvier M, Krimbou L, Genest J. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2004; 279(40):41529-36.

Diamond GA, Kaul S. Prevention and treatment: a tale of two strategies. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51(1):46-8. doi: 10.1016/j.jacc.2007.07.083.

Fasano T, Zanoni P, Rabacchi C, Pisciotto L, Favari E, Adorni MP, Deegan PB, Park A, Hlaing T, Feher MD, Jones B, Uzak AS, Kardas F, Dardis A, Sechi A, Bembi B, Minuz P, Bertolini S, Bernini, Calandra S. Novel mutations of ABCA1 transporter in patients with Tangier disease and familial HDL deficiency. *Mol Genet Metab* 2012; 107(3):534-41.

Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M et al: Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8181-8186.

Francis GA. The complexity of HDL. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(12):1286-93.

Fredrickson DS, Altrocchi PH, Avioli LV, et al. Tangier disease-combined clinical staff conference at the National Institute of Health. *Ann Intern Med* 1961; 55: 1016.

Gillotte KL, Zaiou M, Lund-Katz S, Anantharamaiah GM, Holvoet P, Dhoest A, Palgunachari MN, Segrest JP, Weisgraber KH, Rothblat GH, Phillips MC. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J Biol Chem* 1999; 274(4):2021-8.

Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996; 37(4):693-707.

Gordon DJ, Rifkin BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321(19):1311-6.

Hamon Y, Luciani MF, Becq F, Verrier B, Rubartelli A, Chimini G. Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood* 1997; 90(8):2911-5.

Hata A, Ridinger DN, Sutherland SD, Emi M, Kwong LK, Shuhua J, Lubbers A, Guy-Grand B, Basdevant A, Iverius PH. Missense mutations in exon 5 of the human lipoprotein lipase gene. Inactivation correlates with loss of dimerization. *J Biol Chem* 1992; 267(28):20132-9.

Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529(1-3):245-56.

Karathanasisi SK. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein AI, CIII, and AIV genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6374-8.

Keiper T, Schneider JG, Dugi KA. Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability. *J Lipid Res* 2001; 42(8):1180-6.

Lipid Research Clinics Population Studies Data Book, vol. 1, The Prevalence Study. NIH Publication n. 80-1527, Washington DC, National Institute of Health, 1980.

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, and Weisgraber K. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* 1984; 25(12):1277-94.

Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Wang N, Chen W, Tall AR. Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J Biol Chem* 2003; 278(39):37368-74.

Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 2002; 753-769.

Miller M, Zhan M. Genetic determinants of low high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Opin Cardiol*. 2004; 19(4):380-4.

Natarajan P, Forte TM, Chu B, Phillips MC, Oram JF, Bielicki JK. Identification of an apolipoprotein A-I structural element that mediates cellular cholesterol efflux and stabilizes ATP binding cassette transporter A1. *J Biol Chem* 2004; 279(23):24044-52.

Oram JF, Vaughan AM, Stocker R. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 2001; 276(43):39898-902.

Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006; 99(10):1031-43.

Osborne JC Jr, Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 1985; 24(20):5606-11.

Panagotopoulos SE, Witting SR, Horace EM, Hui DY, Maiorano JN, Davidson WS. The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. *J Biol Chem* 2002; 277(42):39477-84.

Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, Baralle FE, Dallinga-Thie GM, Geisel J, Keller C, Menys VC, Schmitz G. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis*. 2004; 175(2):269-79).

Rader DJ. *J Clin Invest*. 2006; 1; 116(12): 3090–3100.

Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999;145(2):227-38.

Santamarina-Fojo S, Hoeg JM, Assmann G, and Brewer HBJr. Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D, editors. McGraw-Hill. New York. 2817-2833; 2001.).

Santos RD, Asztalos BF, Martinez LR, Miname MH, Polisecki E, Schaefer EJ. Clinical presentation, laboratory values, and coronary heart disease risk in marked high-density lipoprotein-deficiency states. *J Clin Lipidol* 2008; 2(4):237-47.

Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation* 2001; 104(19):2376-83.

Sviridov D, Nestel PJ. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18(2):157-63.

Tanaka M, Takamura Y, Kawakami T, Aimoto S, Saito H. Effect of amino acid distribution of amphipatic helical peptide derived from human apolipoprotein A1 on membrane curvature sensing. *FEBS Letters* 2013; 587, 510-515.

Vedhachalam C, Liu L, Nickel M, Dhanasekaran P, Anantharamaiah GM, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Influence of ApoA-I structure on the ABCA1-mediated efflux of cellular lipids. *J Biol Chem* 2004; 279(48):49931-9.

Von Eckardstein A, Langer C, Engel T, Schaukal I, Cignarella A, Reinhardt J, Lorkowski S, Li Z, Zhou X, Cullen P, Assmann G. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *Faseb J* 2001; 15(9):1555-61.

Von Eckardstein. Differential diagnosis of familial high density lipoprotein deficiency syndromes. *Atherosclerosis* 2006; 186(2):231-9.

Wang X, Paigen B. Genetics of variation in HDL cholesterol in humans and mice. *Circ Res* 2005; 96(1):27-42.

Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res*. 2010; 51(8):2032-57.

Wilson PW. High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990; 4;66(6):7A-10A.

Winston A. Hide, Lawrence Chan, and Wen-Hsiung Li. Structure and evolution of the lipase superfamily. *Journal of Lipid Research* 1992; 33: 167-178.

Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, Yokoyama S. Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly. *J Biol Chem* 2003; 278(48):47890-7.

Zhou X, Engel T, Goepfert C, Erren M, Assmann G, von Eckardstein A. The ATP binding cassette transporter A1 contributes to the secretion of interleukin 1beta from macrophages but not from monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(3):598-604.