

Indice

Introduzione

1 Le Ipercolesterolemie Familiari: forme dominanti e recessive	pag 3
1.1 Ipercolesterolemia Familiare di Tipo 1 (FH-1)	
1.1.1Regolazione genica del recettore delle LDL (LDL-R)	pag 6
1.2 Struttura e funzione del recettore delle LDL	pag 10
1.2.1 Mutazioni nel gene del recettore delle LDL e FH-1	pag16
1.3 Ipercolesterolemia Familiare da difetto di ApoB-100 (FH-2)	pag 20
1.4 Ipercolesterolemia Familiare di tipo 3 (FH-3 o ADH3)	
1.4.1 Il gene PCSK9: struttura e regolazione	pag 22
1.4.2 Ruolo di PCSK9 nella regolazione dei livelli LDL-C	pag 26
1.4.3 Mutazioni “loss of function” e “gain of function” nel gene PCSK9	pag 30
1.4.4- Modalità di interazione di PCSK9 con il recettore LDL-R	pag 37
2-Scopo del lavoro	pag 43

3-Materiale e metodi

3.1-Estrazione di DNA da sangue	pag 45
3.2 Southern Blot	pag 46
3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag 49
3.4 Purificazione dei prodotti di PCR	pag 58
3.5 Sequenziamento	pag 59
3.6 PCR e RFLP per il gene Apo B	pag 60
3.7 Popolazione studiata	pag 61
3.8Analisi dei dati	
3.8.1 Preparazione del campione	pag 65

3.8.2 Genotipizzazione degli SNPs	pag 67
4-Risultati e discussioni	pag 71
5-Bibliografia	pag 84

INTRODUZIONE

1 Le Ipercolesterolemie Familiari: forme dominanti e recessive

Le malattie cardiovascolari nella loro globalità, e la cardiopatia ischemica (CHD), in particolare, rappresentano la principale causa di morte nella maggior parte dei paesi industrializzati. Evidenze epidemiologiche e sperimentali suggeriscono che, tra i vari fattori di rischio implicati, l'ipercolesterolemia svolge un ruolo preponderante, influenzando non soltanto lo sviluppo di malattia coronarica ma aumentando altresì il rischio di eventi cerebrovascolari e di arteriopatie periferiche. Sulla base della modalità di trasmissione ereditaria è possibile classificare le ipercolesterolemie genetiche in autosomiche dominanti (ADH) e in autosomiche recessive (ARH).

L'ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH) è una malattia genetica caratterizzata clinicamente da elevati livelli plasmatici di LDL-colesterolo, xantomatosi tendinea, arco corneale e coronaropatia precoce su base aterosclerotica. I criteri che consentono di effettuare una diagnosi di ADH certa includono: valori di colesterolo totale (CT) ≥ 290 mg/dl o LDL-C ≥ 190 mg/dl nell'adulto (in particolare si hanno valori di CT compresi tra 300mg/dl e 550 mg/dl in soggetti con ADH eterozigote e livelli sierici di

CT compresi tra 600mg/dl e 1200mg/dl in soggetti con ADH omozigote), dimostrazione di trasmissione verticale dell'ipercolesterolemia e presenza di xantomatosi tendinea.

L'ADH è una delle malattie monogeniche più frequenti nella popolazione, è geneticamente eterogenea e secondo le conoscenze attuali può essere causata da mutazioni a carico :

- del gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL-R) che causano un ridotto legame e catabolismo delle LDL plasmatiche (*Ipercolesterolemia familiare autosomica dominante tipo 1* , FH-1);
- del gene dell'apolipoproteina B-100 (ApoB) con conseguente produzione di una ApoB-100 difettiva che ha una ridotta affinità di legame per l'LDL-R (*Ipercolesterolemia familiare da difetto di ApoB-100*, Fdb o FH-2);
- del gene di PCSK9 con alterazioni della normale funzione dell'enzima proteolitico PCSK9 (*Ipercolesterolemia familiare autosomica dominante tipo 3*, FH-3);

L'ipercolesterolemia autosomica recessiva (ARH) presenta caratteristiche cliniche simili alla forma dominante tuttavia la gravità clinica è in genere inferiore.

Le alterazioni genetiche interessano:

- il gene *ARH* localizzato sul cromosoma 1 (1p35) che codifica per una proteina di 308 aminoacidi contenente un dominio di 170 aminoacidi denominato “Phosphotyrosine binding domain” (PTB).

Domini PTB sono presenti in varie proteine “adaptors”, si legano alla sequenza NPXY presente nella coda citoplasmatica di molti recettori cellulari di superficie, incluso l’LDL-R. Studi in vitro suggeriscono che la proteina ARH gioca un ruolo tessuto-specifico; essa è implicata nella stabilizzazione del legame LDL-recettore e nel trasferimento intracellulare delle LDL legate al recettore (*Garcia CK et al., 2001*). I pazienti omozigoti e doppi eterozigoti per mutazioni del gene ARH presentano caratteristiche cliniche simili a quelle degli omozigoti FH (la gravità clinica dell’ARH è comunque inferiore all’omozigosi FH), invece gli eterozigoti presentano livelli di colesterolo nella norma o, in alcuni casi, solo lievemente aumentati.

Mutazioni del gene ARH sono state identificate principalmente in Sardegna ed in altri paesi del bacino del Mediterraneo. Al momento attuale due sole mutazioni del gene ARH (Trp22>Stop e 432insA>Fs>Stop170) sono risultate responsabili di tutti i casi di ARH in Sardegna, dove solo la frequenza degli eterozigoti ARH è di 1:120 mentre quella degli omozigoti e dei doppi eterozigoti composti ARH (1:38.000) risulta circa 20 volte

superiore a quella (1:1.000.000) degli omozigoti FH in Italia e nel mondo occidentale (*Arca M et al.,2002*).

- i geni *ABCG5* (Sterolina 1) ed *ABCG8* (Sterolina 2) localizzati sul cromosoma 2p21 ed appartenenti alla famiglia dei trasportatori transmembrana ATP-binding cassette. Mutazioni in questi geni inducono alterazioni dell'eliminazione degli steroli vegetali a livello enterocitario;
- il gene *CYP7A1* codificante per l'enzima *colesterolo-7 α -idrossilasi*, che catalizza la prima tappa del catabolismo del colesterolo e della formazione degli acidi biliari;

1.1 Ipercolesterolemia Familiare di Tipo 1 (FH-1)

1.1.1 Regolazione genica del recettore delle LDL (LDL-R)

L'ipercolesterolemia familiare di tipo 1 è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante, è la più conosciuta delle forme monogeniche di ADH ed è dovuta a mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore delle LDL.

Il gene che codifica per il recettore delle LDL mappa sul braccio corto del cromosoma 19 (p13.1-p13.3), si estende per più di 45 kb e comprende 18 esoni e 17 introni (Fig.1) (*Hobbs H.H et al.,1990*).

L'mRNA del recettore delle LDL è grande circa 5,3 Kb e presenta un 3'UTR insolitamente lungo: 2.6Kb, la cui caratteristica principale è la presenza di sequenze ripetute di tipo Alu, delle quali non si sa se siano funzionali alla stabilità o al processamento del messaggero (*Yamamoto T et al., 1984*).

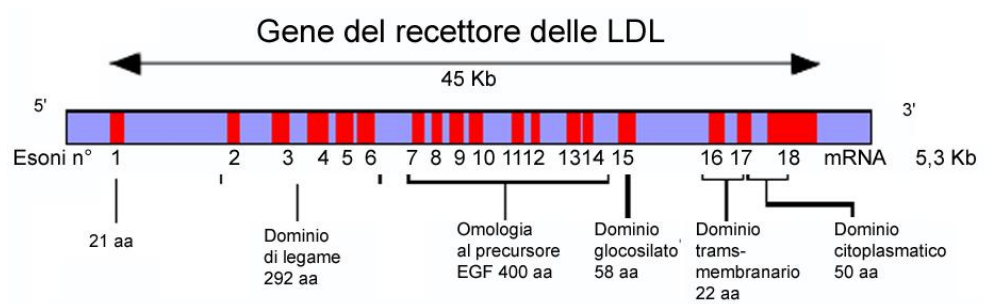


Fig.1: Struttura del gene che codifica per il recettore delle LDL

L'esone 1 codifica per il peptide segnale che precede il primo dominio e che poi verrà processato nella maturazione della proteina. Gli esoni 2-6 codificano per il dominio di legame che comprende 7 strutture ripetitive, ricche in cisteina, necessarie per l'interazione con il ligando. Gli esoni 7-14 codificano per il secondo dominio, omologo al precursore del fattore di crescita epidermico (EGF). In particolare, gli esoni 7-8 e 14 codificano per

le tre strutture ripetitive di 40 aminoacidi note come *growth-factor-like repeats* (EGF-A, EGF-B ed EGF-C). La regione fra i repeats B e C è codificata dagli esoni 9-13 e comprende 5 copie di un motivo ripetitivo di 40-60 aminoacidi, ciascuno dei quali contiene la sequenza Tyr-Trp-Thr-Asp.

L'esone 15 codifica per i 58 aminoacidi che costituiscono il terzo dominio ed includono i siti di legame per le catene glucosidiche O-legate. L'esone 16 e parte dell'esone 17 codificano per il quarto dominio che include i 22 aminoacidi idrofobici della regione transmembranaria. Infine, la parte restante dell'esone 17 e l'estremità 5' dell'esone 18 codificano per il quinto dominio, ovvero la parte citoplasmatica della proteina che consente la formazione dei clusters nei *clathrin-coated pits* e l'endocitosi del recettore. Oltre alle regioni codificanti per i domini necessari alla costituzione della proteina, il gene include anche gli elementi di regolazione della trascrizione genica. La regione di circa 150 basi fiancheggiante l'estremità 5' del gene contiene le sequenze responsabili della regolazione dell'espressione del gene LDL-R. In particolare, sono presenti 3 repeats da 16 bp, di cui due sono sito di legame della proteina Sp1, mentre il terzo repeat contiene una sequenza di 8 basi, denominata SRE (Cantafora A. et al., 1999).

Questo elemento regolativo è legato da fattori di trascrizione chiamati SREBPs. Le proteine SREBPs (sterol regulatory element-binding protein) appartengono alla famiglia dei fattori di trascrizione con motivo helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip) che comprende tre membri (SREBP)-1a, -1c, e -2.

SREBP-2 è codificato da un gene localizzato sul cromosoma 22q13, regola principalmente l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo.

SREBP -1a e -1c sono prodotti da un unico gene localizzato sul cromosoma 17p11.2 mediante un processo di splicing alternativo, e attivano i geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi e nel metabolismo dei carboidrati.

Ogni proteina SREBP è costituita da 1150 aa ed è organizzata in tre domini :

- ✓ Un dominio N-terminale di 480 aa che contiene la regione bHLH-zipper il legame al DNA;
- ✓ Due domini transmembrana idrofobici interrotti da un loop di 30 aa, che si proietta nel lume del reticolo endoplasmatico;
- ✓ Un dominio C-terminale di 590 aa, localizzato nel citosol, importante per il processo di maturazione degli SREBPs.

Gli SREBPs sono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico come precursori inattivi. La loro attivazione consiste nel rilascio del frammento N-terminale, processo che necessita dell'intervento di SCAP, una proteina

escort, che funziona da sensore per gli steroli e trasporta gli SREBPs dal reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi, e di due proteasi designate site-1 protease (S1P) e site-2 protease (S2P), localizzate a livello del Golgi. Quando i livelli di colesterolo nella cellula si abbassano, SCAP trasporta SREBP dalla membrana del reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi. In questa sede i precursori inattivi sono sottoposti a due consecuzionali eventi di clivaggio proteolitico: il primo nel loop lumenale mediato da S1P e il secondo nel primo dominio transmembrana mediato dalla metalloproteasi S2P ; si libererà quindi la regione citosolica N-terminale chiamata “ nuclear SREBP” che entrerà nel nucleo legando gli elementi di risposta agli steroli (SRE) nel promotore dei geni target, attivando la loro trascrizione. Quando i livelli di colesterolo nella cellula aumentano, SCAP cambia la sua conformazione, il complesso SCAP/SREBP non si forma, gli SREBPs non raggiungono l'apparato del Golgi, i domini bHLH-Zip non vengono rilasciati e si arresta quindi la trascrizione dei geni target tra i quali, oltre il gene codificante per il recettore delle LDL, anche quelli per HMG-CoA reduttasi e PCSK9 (*Weber L.W. et al.,2004*).

ed è formato da sette sequenze ripetute (R1-R7), ognuna delle quali è composta da circa 40 residui aminoacidici e contiene 6 residui di cisteina, coinvolte nella formazione di ponti disolfuro (cys1-cys3, cys2-cys5, cys4-cys6) (Goldstein J.L. et al 1985). Questo tipo di legami conferisce un'elevata stabilità al dominio, infatti, è grazie alla loro presenza che il recettore riesce a mantenere la sua stabilità anche in presenza della forte acidità endosomiale. Il recettore delle LDL può interagire con due ligandi: l'apoB e l'apoE. Le due proteine non hanno analogie nella sequenza aminoacidica e l'unico aspetto che le accomuna è la loro affinità per i polimeri carichi negativamente. Per il legame recettore-apoE è necessaria la quinta ripetizione (R5), infatti, se la s'inattiva, si ha una riduzione del legame del 60% (Mahley R.W et al.,1988). Il legame con l'apoB invece richiede la contestuale presenza delle ripetizioni R3 e R7 (Brown M.S et al.,1986). Questo indica che il singolo recettore è in grado di riconoscere ligandi diversi usando combinazioni diverse delle sette ripetizioni. Il legame recettore e ligando sembra essere basato su interazioni ioniche che si stabiliscono tra le cariche negative presenti nelle ripetizioni del recettore e le cariche positive dell'elica anfipatica che si ritrova nel ligando specifico, infatti, eliminando le cariche positive si abolisce il legame sia dell'apoE che dell'apoB (Goldstein J.L. et al 1985).

Il secondo dominio è formato da circa 400 residui aminoacidici e presenta una omologia del 35% con il precursore dell'Epidermal Growth Factor (EGF). Il dominio è strutturato in due ripetizioni EGF-A ed EGF-B, di circa 40 aminoacidi, ricche in cisteina; e un terzo dominio (EGF-C) separato dai primi due da un β -propeller domain contenente cinque copie di un motivo ripetitivo di 40-60 aminoacidi (*Rudenko G. et al 2003*).

Il terzo dominio, codificato da un singolo esone, è composto da una sequenza di 58 aminoacidi ricca in residui idrossilati (18 fra serine e treonine) che, durante la maturazione della proteina nell'apparato di Golgi, vengono per lo più glicosilati (*O-linked sugars*). Ogni catena è composta da un core di N-acetilgalattosammina più una molecola di galattosio ed una o due di acidi sialici. Questi zuccheri potrebbero avere un ruolo nel far sì che il recettore si estenda dalla superficie della membrana a causa del loro ingombro sterico.

Il quarto dominio (transmembranario) è composto da una serie di 22 aminoacidi idrofobici che attraversano la membrana. Il quinto dominio è formato da un segmento citosolico C-terminale di 50 aminoacidi. Nella porzione più vicina alla membrana la coda citoplasmatica è ricca di aminoacidi carichi positivamente, e distalmente è, invece, ricca di residui negativi (*Yamamoto T et al., 1984*).

La porzione citosolica della proteina contiene una specifica sequenza NPXY, importante per la localizzazione del recettore nelle fossette rivestite da clatrina e la successiva internalizzazione (*Chen W.J et al., 1990*).

Il recettore delle LDL, quindi, è una glicoproteina di membrana espressa sulla superficie cellulare e responsabile della rimozione dal plasma di circa i due terzi delle LDL circolanti, in particolare il 70% della rimozione recettoriale di LDL si realizza a livello epatico.

L'LDL-R è sintetizzato nel reticolo endoplasmatico, in forma di precursore parzialmente glicosilato con una massa apparente di 120KDa, e nel Golgi in cui avviene la glicosilazione definitiva che fa assumere al recettore una massa apparente di 160KDa (*Tolleshaug H et al., 1982*). Dal Golgi i recettori raggiungono la superficie cellulare, in cui si raggruppano in regioni specializzate della membrana plasmatica, comunemente definite "fossette rivestite da clatrina". Nello spazio extracellulare, a pH neutro, l'LDLR assume una conformazione denominata "aperta" che consente il legame da parte dei domini R1-R7 con le LDL.

In seguito all'interazione recettore-ligando, la clatrina polimerizza e forma prima un'invaginazione e poi un endosoma, all'interno del quale l'ambiente acido determina la dissociazione delle LDL dal recettore (*Jeon H. et al., 2001*). Parte dell'LDL-R ritorna sulla superficie cellulare mediante un processo che prende il nome di recycling (Fig.3) (*Brown M.S.*

et al.,1983). Le LDL vengono trasportate in un lisosoma, dove gli esteri del colesterolo sono idrolizzati in colesterolo e acidi grassi liberi, mentre la proteina ApoB-100 in aminoacidi liberi (*Gent J. et al.,2004*).

Il rilascio delle lipoproteine è stato proposto come il risultato di un cambiamento conformazionale pH-dipendente dell'LDL-R, in cui il legame delle LDL con i domini R1-R7 è sostituito dall'interazione tra quest'ultimi con il β -propeller domain, assumendo una conformazione detta "chiusa" (*Rudenko G. et al., 2002*).

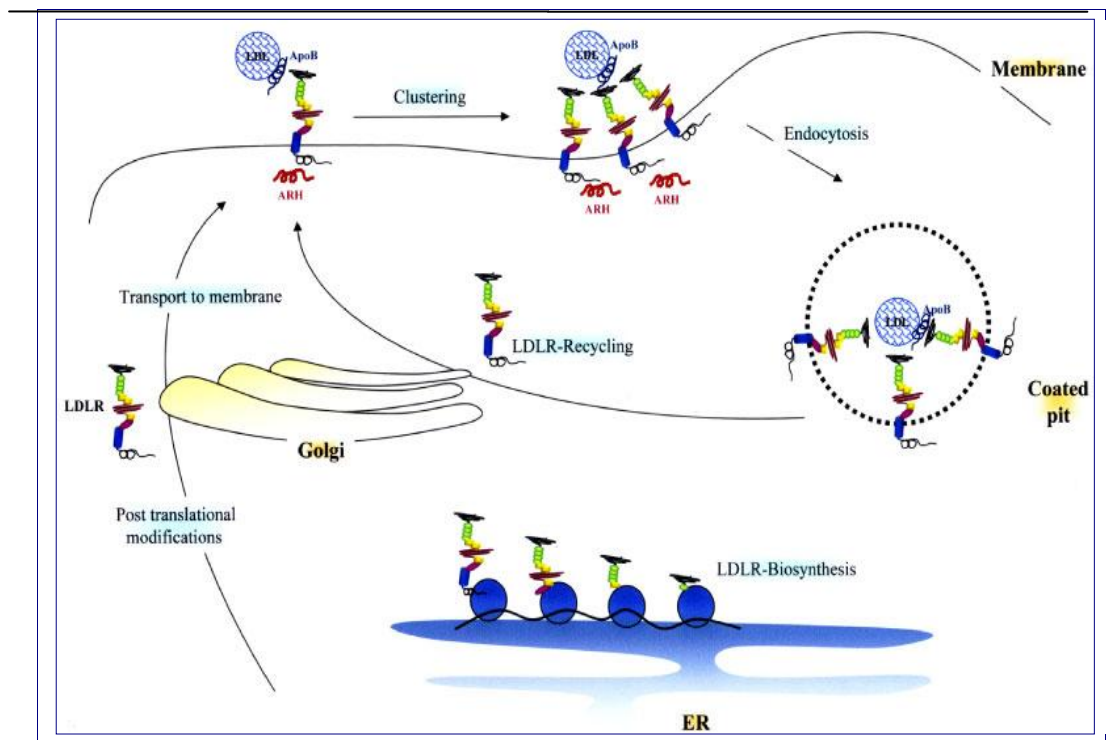


Fig.3: Rappresentazione schematica del recycling del recettore delle LDL

1.2.1 Mutazioni nel gene del recettore delle LDL e FH-1

Mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore delle LDL sono responsabili della forma di ipercolesterolemia familiare di tipo 1 e comportano alterazioni della biosintesi e del trasporto del recettore con conseguente disfunzione del processo di rimozione delle LDL dal circolo sanguigno.

Attualmente sono note più di 1000 mutazioni di cui più del 50% sono principalmente mutazioni missenso mentre solo una piccola parte sono grandi riarrangiamenti o inserzioni e delezioni (www.ulc.uk/fh). E' stata effettuata una classificazione delle mutazioni in 5 classi differenti in relazione alla funzione recettoriale alterata:

- *Classe 1: mutazioni che determinano un difetto di sintesi (allele nullo)*

Condizione nella quale o non si ha la sintesi della proteina oppure vi è una espressione del 50% dei recettori sulla membrana qualora la mutazione responsabile del difetto sia in eterozigosi.

- *Classe 2: mutazioni che determinano un difetto di trasporto e maturazione del recettore dal reticolo endoplasmatico ruvido all'apparato del Golgi*

Nei mutanti di classe 2 il trasporto al Golgi è profondamente compromesso o del tutto abolito (infatti, la massa apparente del recettore rimane di 120KDa) e la proteina è degradata prima che raggiunga la superficie cellulare (Tolleshaug H et al., 1982). Ciò avviene perché nel reticolo endoplasmatico esiste un meccanismo che impedisce l'invio delle proteine con una struttura sbagliata al Golgi. Il blocco nel trasporto è causato sia da mutazioni missenso che da piccole delezioni in frame che alterano la sequenza aminoacidica del recettore in modo da alterarne parzialmente o totalmente la struttura.

Le mutazioni mappano specificamente negli esoni che codificano per il dominio di omologia con il precursore del fattore di crescita epidermico (sottoclasse A) e il dominio di legame alle LDL (sottoclasse B).

- *Classe 3: mutazioni che comportano un legame difettivo del recettore con le LDL*

Il recettore è normalmente trasportato sulla membrana, ma non è capace di legare le LDL. La maggior parte di queste mutazioni comportano sostituzioni o grossi riarrangiamenti nel dominio di legame, una parte minore delezioni che mappano invece nel dominio di omologia al precursore dell'EGF (Hobbs H H et al., 1986).

- **Classe 4:** mutazioni che causano una difettosa internalizzazione del complesso LDL-recettore

Sono mutazioni molto rare che determinano una difettosa localizzazione del recettore nelle invaginazioni della membrana cellulare rivestite dalla proteina clatrina. Dal punto di vista funzionale si tratta di un recettore incapace di trasportare le LDL dentro la cellula (Hobbs H H et al., 1986). Si possono distinguere due sottoclassi: la prima (classe A) implica mutazioni nella coda citoplasmatica, mentre la seconda (classe B) coinvolge anche alterazioni del vicino dominio transmembranario.

- **Classe 5:** mutazioni che determinano un difetto di riciclaggio del recettore

Il dominio di omologia al precursore dell'EGF media la dissociazione del ligando dal recettore nell'endosoma, infatti, le tre regioni ricche in cisteina di questo dominio sono responsabili di accelerare il rilascio delle LDL indotto dall'ambiente acido dell'endosoma. Nel recettore mutato la lipoproteina non si dissocia e quindi il recettore non è libero di tornare sulla membrana ad essere riciclato, ma sarà inviato a degradazione nel lisosoma; è chiaro che in questo caso la vita media della proteina sarà estremamente ridotta (Davis CG et al., 1987).

In Italia, come in altri paesi occidentali, la frequenza stimata di FH-1 nella forma eterozigote è di circa 1:500 nella popolazione generale (Wilson D.J.

et al.,1998) e fa di questa una delle sindromi monogeniche ad alto rischio cardiovascolare più frequente nella popolazione.

Nei soggetti FH-1 eterozigoti, le cellule, e in particolare gli epatociti, esprimono circa la metà dell'attività recettoriale normale (40-60%) per cui l'emivita delle LDL plasmatiche è raddoppiata rispetto al normale (da 2,5-3 giorni a 4,5 giorni).

Nei soggetti omozigoti, la cui frequenza della FH è stimata 1/1.000.000, l'attività recettoriale residua varia dallo 0% al 30% e l'emivita plasmatica delle LDL è aumentata fino a 6 giorni. Tuttavia, in alcune popolazioni isolate geograficamente e culturalmente come gli ebrei è stata riscontrata una più elevata frequenza della FH-1, in particolare una più alta frequenza solo di alcune mutazioni a causa dell'effetto fondatore (*Wilson D.J. et al.,1998*).

Il colesterolo in eccesso veicolato dalle LDL, nei soggetti con FH si deposita preferenzialmente in alcuni tessuti quali cute, tendini e arterie, dando origine a lesioni caratteristiche (xantelasmi a livello cutaneo, xantomatosi tendinea e placche). La gravità di queste lesioni, soprattutto quelle a carico della parete arteriosa, è direttamente correlata sia ai livelli plasmatici di LDL-colesterolo che al tempo di esposizione ad elevati livelli di LDL-colesterolo.

1.3. Ipercolesterolemia Familiare da difetto di ApoB-100 (FH-2)

Questa forma di ipercolesterolemia, clinicamente simile alla forma di ipercolesterolemia classica (FH-1), è una patologia a trasmissione autosomica dominante provocata da mutazioni a carico del gene che codifica per l'apolipoproteina B100.

L'ApoB100 costituisce circa il 95% delle apolipoproteine (ApoB, ApoC ed ApoE) presenti nelle LDL e rappresenta il principale ligando del recettore delle LDL. La produzione di ApoB difettose, incapaci di legarsi al recettore, altera il catabolismo delle LDL, che permanendo per un periodo più prolungato in circolo, causano un incremento secondario dei livelli plasmatici di colesterolo, comunque inferiore rispetto a quello dei soggetti con FH-1.

Il gene che codifica per l'ApoB è localizzato nel braccio corto del cromosoma 2, si estende per circa 43kb ed è organizzato in 29 esoni e 28 introni; è tessuto specifico ed è espresso principalmente nelle cellule epatiche e nelle cellule epiteliali dell'intestino (*Knott TJ et al., 1985*).

L'ApoB è la principale proteina dei chilomicroni e delle VLDL, è essenzialmente l'unica proteina delle IDL e LDL, e la possiamo ritrovare nel plasma in due forme: ApoB100 ed ApoB48.

L'ApoB100, sintetizzata a livello epatico, è una componente strutturale delle VLDL ricche in trigliceridi, ha una massa molecolare di 513KDa ed è costituita da 4536 aminoacidi (*Knott TJ et al.,1985*). Essa rappresenta la forma proteica matura.

L'ApoB48, sintetizzata a livello intestinale, è necessaria per l'impacchettamento dei lipidi nei chilomicroni ed ha una massa che è il 48% di quella dell'ApoB100. La sua sintesi è il risultato di un processo di *editing* dell'RNA messaggero, meccanismo post-trascrizionale tessuto specifico, durante il quale la citosina che normalmente si trova nel codone 2153 (CAA) viene sostituita da un uracile mediante una reazione di deaminazione, catalizzata dalla citidina deaminasi. Ciò conduce alla formazione di un codone di arresto (UAA) e alla sintesi di una forma tronca dell'ApoB (*Innerarity TL et el.,1996*).

La frequenza stimata di FH-2 nella forma eterozigote è di circa 1:500-1:700 individui nella popolazione caucasica del Nord America e in Europa . Attualmente sono state identificate solo quattro mutazioni del gene dell'ApoB responsabili di FH-2: Arg3480Trp, Arg3500Gln, Arg3500Trp e Arg3531Cys delle quali la più frequente è la mutazione Arg3500Gln (*Boren J. et al.,2001*).

Nei soggetti portatori di tali anomalie genetiche le LDL persistono in circolo e vengono allontanate attraverso vie non-recettoriali che

favoriscono lo sviluppo di una aterosclerosi prematura. Tuttavia, l'ipercolesterolemia di tipo 2 risulta meno grave rispetto alla FH-1, sia in termini di incremento delle LDL in circolo che della prevalenza della cardiopatia ischemica.

1.4. Ipercolesterolemia Familiare di tipo 3 (FH-3 o ADH3)

1.4.1 Il gene PCSK9: struttura e regolazione

Nel 2003, la scoperta di due mutazioni missenso nel gene PCSK9 localizzato sul cromosoma 1p32 in due famiglie francesi, ha condotto all'identificazione di una terza forma di Ipercolesterolemia autosomica dominante o FH-3 (*Abifadel M, et al.; 2003*).

La forma FH-3 è relativamente rara, la frequenza stimata è di circa il 2% dei soggetti con ADH e dal punto di vista fenotipico non si discosta dalle due forme descritte precedentemente. Il gene implicato, denominato *proprotein convertase subtilisin/kexine type 9 (PCSK9)* è localizzato sul cromosoma 1p33-p34.3, si estende per 22Kb e comprende 12 esoni.

PCSK9 codifica per una proteina di 692 aminoacidi: *Neuronal apoptosis regulated convertase-1(NARC-1)*, espressa principalmente nel fegato, nelle

cellule mesenchimali renali, nell'epitelio intestinale, oltre che nel tessuto nervoso (*Seidah NG. et al.,2003*).

NARC-1 deve il nome al suo ruolo nella differenziazione neuronale, infatti, il suo mRNA è upregolato quando viene indotta l'apoptosi in colture primarie di neuroni. E' il nono membro di una famiglia di proproteine convertasi (PCSK1-PCSK8, chiamate anche PC1/PC3, C2, furina, PC4, PACE4, PC5/PC6, PC7/LPS, SKI-1/S1P), che regolano diversi processi biologici e risultano essere coinvolte nel processamento e nell'attivazione di diverse proteine del pathway di secrezione cellulare (*Seidah N.G. et al.,2003*).

La proteina NARC-1, comunemente chiamata PCSK9 comprende una sequenza segnale (SP) di 30 aminoacidi, un predominio di 152 aminoacidi (Pro), un dominio catalitico che contiene la triade catalitica di aspartato (D186), istidina (H226), serina (S386) e i residui di asparagina (N) altamente conservati, necessari per l'attività della proteina; segue la regione carbossiterminale di 269 aa ricca in cisteina, contenente un sito di N-glicosilazione (Asn₅₃₃) (*Seidah NG. et al.,2003*). La proconvertasi PCSK9 è sintetizzata sottoforma di zimogeno solubile (preproPCSK9) che dopo il clivaggio del peptide segnale genera un precursore di circa 75 KDa (pro-PCSK9), sottoposto a livello del reticolo endoplasmatico ad un processo di autocatalisi intramolecolare indipendente dal Ca²⁺ tra la Gln-152 e la Ser-

153 del predominio (Fig.4). Tale processo separa il dominio catalitico dal prodominio, ma quest'ultimo rimane adeso e sembra funzioni sia da chaperon molecolare che da inibitore dell'attività catalitica di PCSK9. Per gli altri membri della famiglia delle proconvertasi, è necessario un secondo taglio proteolitico per rilasciare il predominio e smascherare pertanto il sito catalitico, portando all'attivazione dell'attività proteasica.

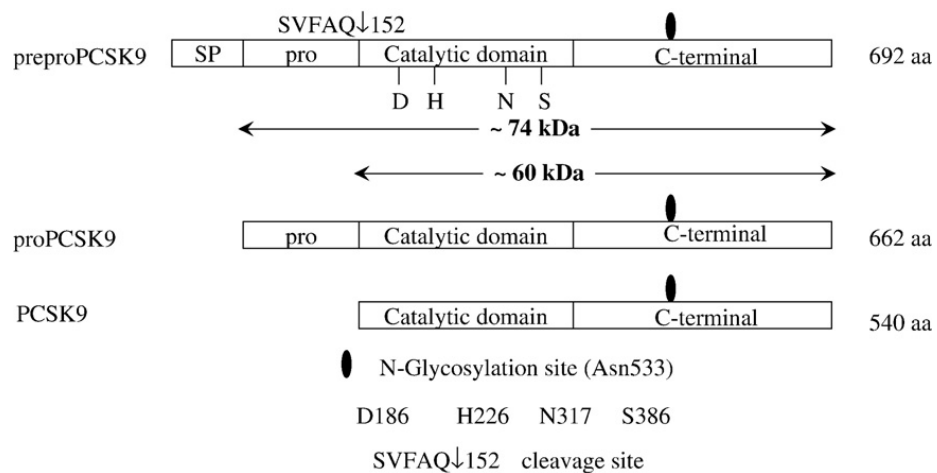


Fig.4: Rappresentazione schematica dei domini proteici di PCSK9

In PCSK9 non è stato identificato nessun sito proteolitico secondario e nessun evento fisiologico che causa la dissociazione del predominio inibitorio dal sito catalitico. A questo punto la proteina PCSK9 (60KDa), una volta giunta a maturazione, può essere efficientemente secreta nel

circolo sanguigno, dove i normali livelli di proteina sono compresi in un range tra 50 e 600 ng/ml (*Lagace TA et al., 2006*).

Per quanto riguarda il meccanismo di regolazione genica, Horton JD. e Maxwell KN. (*Horton JD. et al., 2003; Maxwell KN. et al., 2003*) in esperimenti condotti su topi hanno dimostrato che il gene PCSK9 si comporta come gli altri geni colesterologeni, cioè la sua espressione è down-regolata in presenza di alti livelli di colesterolo intracellulare e up-regolata in seguito a riduzione di colesterolo.

L'identificazione degli elementi di risposta agli steroli (SRE), nel promotore del gene PCSK9 di ratto e uomo (*Dubuc G. et al., 2004*), ha consentito l'individuazione del ruolo svolto dalle proteine SREBPs nella regolazione dell'espressione genica di PCSK9. Le proteine SREBPs, come già discusso precedentemente in merito alla regolazione genica del recettore delle LDL, sono fattori trascrizionali, che in seguito alla variazione dei livelli di colesterolo, attivano o meno l'espressione di geni colesterologeni.

Dubuc et al. studiando l'espressione di PCSK9 hanno dimostrato che il livello di mRNA epatico di PCSK9 è aumentato dalla deplezione di colesterolo e up-regolato dalle statine che, inibendo il 3-idrossy-3methylglutaryl-coenzime A reductase (HMGCoA), hanno un ruolo importante nell'inibizione della sintesi del colesterolo. Le statine

aumentano, inoltre, l'espressione della sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2), e di conseguenza l'attivazione dei geni LDL-R e PCSK9 (*Dubuc G. et al., 2004*).

L'espressione epatica di PCSK9 è inoltre regolata dall'insulina tramite il fattore SREBP-1c. I livelli di mRNA di PCSK9 sono infatti aumentati di 4-5 volte in presenza di insulina in colture primarie di epatociti di topi e ratti come anche in vivo in condizioni di iperinsulinemia-normoglicemia in topi. L'overespressione mediata da adenovirus di una forma dominante o negativa di SREBP-1c conferma il ruolo di questo fattore di trascrizione nella stimolazione insulino-mediata dell'espressione di PCSK9 (*Costet P. et al., 2006*).

14.2 Ruolo di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C

PCSK9 è una proproteina convertasi coinvolta sia nella differenziazione neuronale (*Seidah N.G. et al., 2003*) che nella regolazione dei livelli sierici di LDL-C attraverso la degradazione dell' LDL-R (*Abifadel M. et al., 2003*).

Esperimenti condotti in vitro e su modelli animali, al fine di valutare l'attività biologica di PCSK9, indicano un ruolo della proteina nel controllare i livelli di LDL-R; è stato dimostrato, infatti, che

l'overespressione di PCSK9 “wild-type” umana e murina in fegato di topi mediata da adenovirus, determina un raddoppio dei livelli di colesterolo totale per incremento specifico di 5 volte di LDL-C (*Maxwell KN. et al., 2004; Park SW. et al., 2004*).

L'incremento dei livelli di LDL-C sembrano dipendere da un meccanismo mediato dall'LDL-R poiché l'overespressione della proteina PCSK9 in topi knock-out per l'LDL-R non si associa all'incremento dei livelli di LDL-C (*Benjannet S et al., 2004; Maxwell KN et al., 2004; Park SW et al., 2004*).

Recenti studi hanno fornito spunti circa il sito e la modalità di azione della proteina PCSK9. L'aggiunta di PCSK9 ricombinante nel mezzo di coltura di epatociti determina un aumento dei livelli di LDL-C, una drastica riduzione nel numero di molecole LDL-R senza variare i livelli di mRNA dell'LDL-R. Questi risultati suggeriscono una regolazione post-trascrizionale di PCSK9 sull'LDL-R e che PCSK9 agisca principalmente sul processo di internalizzazione e riciclaggio dell'LDL-R, senza interferire con la sua sintesi (*Lagace TA et al., 2006*).

Al contrario topi knockout *Pcsk9*^{-/-} mostrano un incremento dei livelli di LDL-R nel fegato e una riduzione delle concentrazioni di colesterolo plasmatico (*Rashid S. et al., 2005*).

L'effetto di PCSK9 sull' LDL-R appare inoltre essere cellula-specifico; come dimostrato da vari esperimenti, l'overespressione di PCSK9 riduce il

numero di LDL-R nel fegato e nelle cellule intestinali, ma non nei fibroblasti (*Park SW et al., 2004*). Ulteriori studi dimostrano che l'attività catalitica è necessaria per la maturazione e la secrezione della proteina ma sembra non essere coinvolta nella degradazione dell'LDL-R (*McNutt M.C et al., 2007*).

PCSK9 interagisce con l'LDL-R mediante la formazione di specifiche interazioni molecolari con il dominio EGF-A del recettore (*Kwon J.H et al., 2007*); questo legame e la successiva internalizzazione del complesso nel comparto endosomiale sono necessari affinché la proteina esogena possa ridurre i livelli di LDL-R.

E' stato osservato che PCSK9 agisce principalmente con un meccanismo extracellulare, tuttavia differenti studi suggeriscono anche un'attività intracellulare della proteina sebbene questo meccanismo non sia ancora ben noto (*Park S. et al., 2004*).

A supporto del ruolo esogeno di PCSK9, Lagace et al mediante un elegante studio in vivo condotto su due topi in parabiosi, hanno dimostrato che PCSK9 umana secreta dal fegato di un topo transgenico (LDL^{-/-}) è in grado di ridurre l'espressione epatica di LDL-R e quindi determinare l'aumento dei livelli di LDL-C nel topo wild-type (*Lagace et al., 2006*).

L'attività fisiologica di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C attraverso l'attivazione del pathway degradativo del recettore può, tuttavia,

essere alterata dalla presenza di mutazioni distribuite nei vari esoni del gene. Ad oggi le mutazioni individuate nel gene PCSK9 sono state suddivise in due categorie a secondo del loro effetto sulla funzione proteica. Distinguiamo mutazioni con perdita di funzione di PCSK9 “*Loss of function*” che determinano riduzione dell’LDL-C plasmatico e si associano ad ipocolesterolemia e mutazioni con guadagno di funzione “*Gain of function*” associate ad un aumento di LDL-C plasmatici e conseguente ipercolesterolemia (*Ipercolesterolemia familiare tipo 3*). (Fig.5)

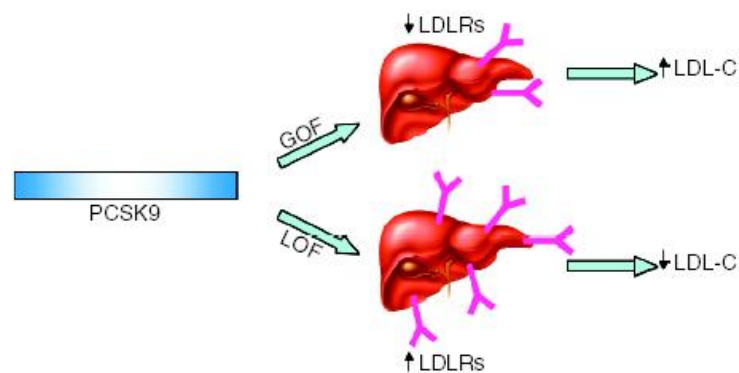


Fig.5: Mutazioni Gain of function (GOF) e Loss of function (LOS) di PCSK9

E’ stato riportato che mutazioni in PCSK9 con guadagno di funzione determinano una riduzione del 23% dei recettori espressi sulla superficie cellulare e un decremento del 38% di internalizzazione delle LDL. Invece,

mutazioni in PCSK9 con perdita di funzione sono associate all'incremento del 16% dei livelli di LDL-R espressi sulla superficie cellulare e all'aumento del 35% di internalizzazione delle LDL (*Cameron J. et al., 2006*).

1.4.3 Mutazioni “loss of function” e “gain of function” nel gene PCSK9

• Mutazioni “Loss of function” del gene PCSK9 e ipocolesterolemia

Nel 2005 Cohen et al. sequenziando l'intera regione del gene PCSK9 in 128 soggetti (50 % Afro-Americani e 50 % Europei-Americani) appartenenti al Dallas Heart Study e con livelli di colesterolo inferiori a 58mg/dl, hanno identificato due mutazioni nonsense (Y142X e C679X) responsabili dell'introduzione di un codone di stop prematuro e quindi della formazione di proteine PCSK9 tronche, prive di funzione, rispettivamente di 141 e 678 aminoacidi.

Queste mutazioni nonsense sono comuni negli Afro-Americani (2%) e rare negli Europei-Americani (< 0,1%), ma sono comunque associate ad una riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C del 40%. Lo studio suggerisce che individui eterozigoti per mutazioni nonsense di PCSK9, presentano

bassi livelli di LDL-C plasmatico, dovuti ad una riduzione dell'attività di PCSK9 e quindi ad un incremento dei recettori espressi sulla membrana cellulare (*Cohen et al., 2005*).

Queste conclusioni sono state supportate da esperimenti eseguiti su topi Knockout per PCSK9, che hanno rivelato come l'assenza della proteina determini un incremento dei livelli di LDL-R negli epatociti, un'accelerata clearance delle LDL plasmatiche e una significativa riduzione dei livelli di colesterolo plasmatici, riconducendo al quadro clinico dell'ipocolesterolemia (*Rashid S. et al., 2005*). Studi su popolazione, condotti successivamente, hanno portato all'identificazione di diverse mutazioni missenso nel gene PCSK9 associate ad ipocolesterolemia: R46L, E57K, H391N, Q554E (*Berge KE. et al., 2006; Kotowski KI. et al., 2006*), G106R, N157K, R237W (*Berge KE. et al., 2006*).

Tali mutazioni sono state studiate mediante esperimenti di trasfezione di PCSK9, sia wild-type che mutata, in cellule HepG2; i risultati ottenuti dimostrano un significativo aumento del numero di LDL-R sulla superficie cellulare e dell'internalizzazione dell'LDL, rispettivamente del 16% e del 35%, se paragonati al PCSK9 wild-type. (*Cameron J. et al., 2006*).

La somministrazione di statine a topi Knockout per PCSK9 determina un esagerato incremento nel numero di LDL-R nel fegato ed un'aumentata clearance delle LDL dal plasma. Questi dati dimostrano che PCSK9 regola

la quota di proteina LDL-R e suggeriscono che inibitori di PCSK9 possano agire sinergicamente con le statine per aumentare l'LDL-R e ridurre il colesterolo plasmatico (*Berge KE. et al., 2006*).

Berge et al. hanno dimostrato che in un gruppo di eterozigoti FH-1 che rispondevano bene alla terapia con statine, l'8,8% erano eterozigoti per le mutazioni R46L o N157K del gene PCSK9. Queste mutazioni, come già detto, sono state associate a bassi livelli plasmatici di colesterolo, suggerendo che mutazioni con perdita di funzione del gene PCSK9 potrebbero ulteriormente ridurre i livelli di colesterolo (*Berge KE. et al., 2006*).

Studi condotti da Zhao et al. hanno portato all'identificazione di tre mutazioni *loss of function* di PCSK9 (Y142X, L235F, C679X), associate a maggiori riduzioni dei livelli di LDL-C plasmatici, che impediscono la secrezione della proteina matura interferendo con la sua sintesi (mutazione Y142X), il suo processo di autocatalisi intramolecolare (mutazione L235F) e il suo corretto folding (mutazione C679X) (*Zhao Z. et al., 2006*).

Un'altra mutazione *loss of function* del gene PCSK9 (D97R) determina un'alterazione del meccanismo di processamento e trasporto dal reticolo endoplasmatico della proteina PCSK9 impedendone la completa maturazione (*Horton J.D et. al., 2006*).

Nel 2006 Fasano et al. hanno identificato nuove mutazioni *loss of function* del gene PCSK9 (Ala68fsLeu82X, T77I, V114A, A443T, A522T, P616L) associate a bassi livelli di LDL-C ed APO-B in soggetti con Ipoβetaliipoproteinemia Familiare (malattia genetica a trasmissione autosomica co-dominante caratterizzata da bassi livelli plasmatici di colesterolo ed apolipoproteina B), negativi per l'analisi genetica del gene dell'ApoB (Fasano et al., 2006).

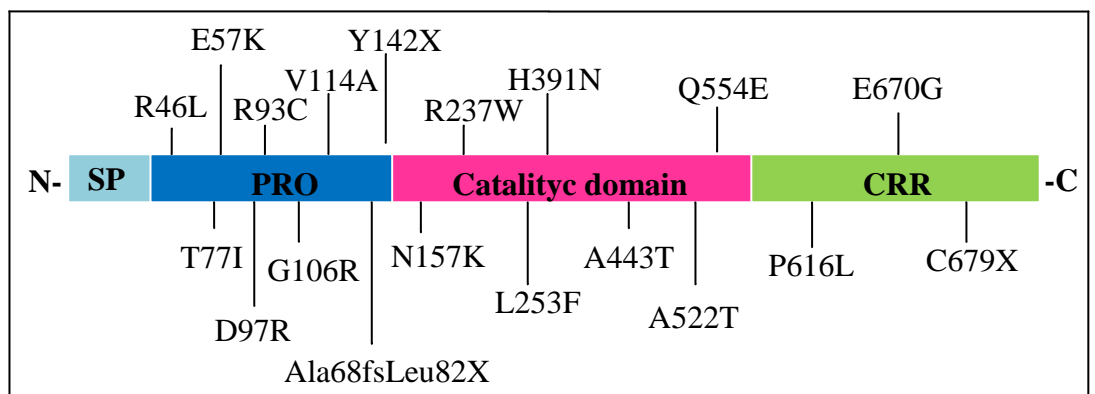


Fig.6: Mutazioni missenso e nonsense "Loss of function" (LOF) di PCSK9

● Mutazioni "Gain of function" del gene PCSK9 e ipercolesterolemia

Nel 2003 Abifandel et al., mediante analisi di linkage, hanno identificato in famiglie francesi una regione sul cromosoma 1 umano che segregava con

l'ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH). In questa regione sono state identificate alcune mutazioni nel gene PCSK9.

Gli individui affetti presentavano due mutazioni missenso nel gene PCSK9; la mutazione S127R, in corrispondenza del sito di processamento dello zimogeno e la mutazione F216L in corrispondenza del dominio catalitico della proteina. (*Abifadel M. et al., 2003*). I livelli di LDL colesterolo di questi pazienti prima del trattamento erano notevolmente aumentati (3.1 ± 0.7 g/l) rispetto a quelli di pazienti controllo non affetti (1.0 ± 0.3 g/l) (*Lambert G., 2007*).

In seguito, ulteriori studi in pazienti con ADH e normali livelli di LDL-R e ApoB, hanno condotto all'identificazione di altre mutazioni missenso nel gene PCSK9: la mutazione D374Y, in corrispondenza del dominio catalitico della proteina, in famiglie norvegesi, inglesi e dello Utah, e le mutazioni R218S e R357H in famiglie francesi (*Allard D. et al., 2005*).

In Italia, nel 2006 sono state, invece, descritte le mutazioni R496W e N425S ritrovate in due pazienti con diagnosi clinica di ipercolesterolemia familiare e portatori di mutazioni nel gene LDL-R. Entrambi i pazienti con doppia eterozigosi per mutazioni sia del gene PCSK9 che dell'LDL-R, presentavano un aumento del 40% dei livelli plasmatici di colesterolo rispetto ai semplici eterozigoti per mutazioni dell'LDL-R (*Pisciotta L. et al., 2006*).

Successivi studi hanno riportato l'individuazione di altre mutazioni missenso *gain of function* associate ad alti livelli di LDL-C; Kotowski I. K. et al descrissero le mutazioni H417Q, E482G, F515L, H553R (Kotowski I. K. et al, 2006); Benjannet riportò la mutazione missenso H226A responsabile dell'alterazione del processo catalitico e dell'affinità di PCSK9 verso LDL-R (Benjannet et al., 2006).

Studi condotti sia in vitro su colture cellulari che in vivo su topi knockout, confermano le alterazioni funzionali della proteina PCSK9 causate da mutazioni *gain of function*.

Sun X.M. et al. mediante esperimenti effettuati su cellule di epatoma di ratto, trasfettate con vettori contenenti WT e vettori mutagenizzati per le varianti D374Y ed S127R di PCSK9, evidenziano un'alterazione del corretto clivaggio del mutante PCSK9/S127R e un incremento della secrezione di ApoB, con conseguente aumento della sintesi di lipoproteine. Questi autori suggeriscono che l'eccesso di lipoproteine, riscontrato in soggetti con mutazioni in eterozigosi nel gene PCSK9, possa essere causato da un'alterazione della secrezione di ApoB mediata da PCSK9. Quindi è possibile che PCSK9 sia normalmente coinvolto nella regolazione della degradazione della proteina ApoB e che le forme mutanti interferiscano con questo pathway. Tuttavia, rimane poco chiaro quale sia questo

possibile meccanismo attuato da PCSK9 nella regolazione dei livelli della proteina ApoB (*Sun X.M et al., 2005*).

Studi condotti da Cameron et al. attraverso esperimenti di trasfezione in cellule HepG2 dimostrano che le varianti *gain of function* di PCSK9 S127R e D374Y, inducono un decremento dell'espressione dell'LDL-R sulla superficie cellulare e una riduzione dei livelli di internalizzazione delle LDL. In particolare, il mutante *gain of function* D374Y mostra una riduzione dei livelli della proteina recettoriale e dell'internalizzazione delle LDL, rispettivamente, del 36% e del 68% rispetto al PCSK9 WT, il mutante S127R mostra, invece, un decremento rispettivamente del 10% e 7%. Dal confronto di questi dati emerge il maggiore effetto ipercolesterolemizzante della variante D374Y rispetto alla S127R (*Cameron J. et al., 2006*).

Recenti esperimenti di Grefhorst A. et al. riportano informazioni riguardo la cinetica e l'attività sia della proteina PCSK9 WT che della variante PCSK9-D374Y. Somministrando a topi *Pcsk9^{-/-}*, attraverso prima una singola iniezione e poi infusioni continue, 32µg di proteina PCSK9 umana ricombinante, è stato osservato, entro 60 minuti, una riduzione dell'espressione dell'LDL-R pari al 60%. Gli stessi esperimenti, condotti in parallelo, infondendo ai topi *Pcsk9^{-/-}* il mutante PCSK9-D374Y, hanno evidenziato un incremento della clearance del mutante stesso e soprattutto

una notevole riduzione, di circa 10 volte, dell'espressione dell'LDL-R rispetto all'esperimento di infusione con PCSK9 WT. Quest'ultimo dato è dovuto possibilmente all'elevata affinità di legame del mutante PCSK9-D374Y per l'LDL-R che risulta essere circa 30 volte maggiore rispetto all'affinità che la stessa proteina WT possiede per il recettore (*Grefhorst A. et al., 2008*).

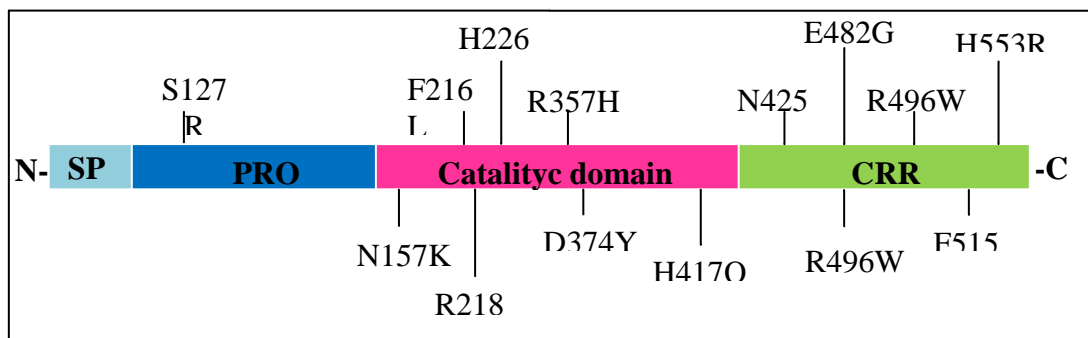


Fig.7: Mutazioni missenso "Gain of function" (GOF) di PCSK9

1.4.4 Modalità di interazione di PCSK9 con il recettore LDL-R

L'importante ruolo fisiologico svolto dalla proteina PCSK9 nel regolare i livelli di LDL-C, attraverso la degradazione dell'LDL-R, è possibile grazie a specifiche interazioni molecolari calcio-dipendenti che si instaurano fra il

dominio EGF-A del recettore e specifici residui aminoacidici della regione N-terminale del dominio catalitico di PCSK9 (*Kwon H.J. et al., 2007*).

I dati ottenuti dall'analisi cristallografica evidenziano che una prima interazione del complesso PCSK9/EGF-A avviene attraverso la formazione di un β -sheet antiparallelo tra i residui 377-379 di PCSK9 e 308-310 della regione N-terminale di EGF-A. Ulteriori interazioni molecolari coinvolgono i residui 153-155 della regione N-terminale del dominio catalitico di PCSK9; si tratta sia di interazioni idrofobiche (Phe-379, Ile-369, Cys-378) che di legami a idrogeno.

In particolare, la formazione di ponti salini tra PCSK9-Ser-153 ed EGF-A/Asp-299, PCSK9-Arg-194 ed EGF-A/Asp-310 e i legami idrogeno tra PCSK9-Asp-238 ed EGF-A/Asn-295, PCSK9-Thr-377 ed EGF-A/Asn-309 contribuiscono alla specificità del legame della proteina PCSK9 al dominio EGF-A dell'LDL-R (Fig.8). Mutazioni in questi residui possono, quindi, alterare la specificità di legame. A tal proposito è stato osservato che le sostituzioni dell'EGF-A/Asn-295 in Ala e dell'EGF-A/Asp-310 in Glu così come mutazioni nei residui Arg-194 e Phe-379, determinano una drastica riduzione dell'affinità di legame di PCSK9 per l'LDL-R, dimostrando dunque la specificità di queste interazioni nella formazione del legame (*Kwon H.J. et al., 2007*).

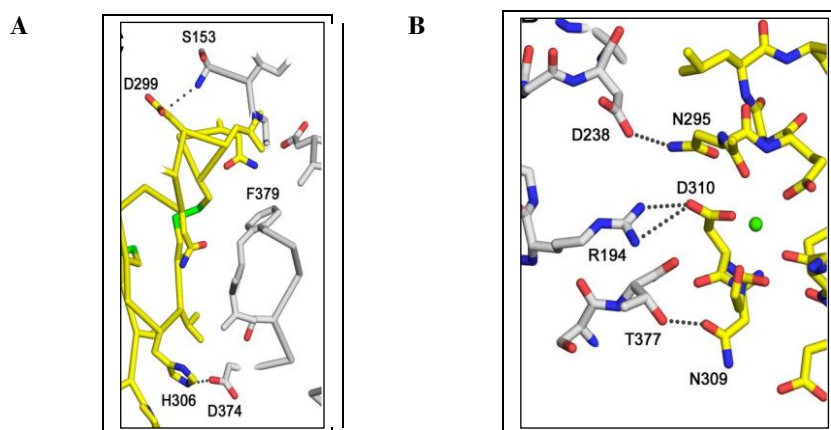


Fig.8: Residui aminoacidici coinvolti nelle interazioni molecolari PCSK9/LDL-R

L'integrità del dominio EGF è quindi essenziale per il normale turnover dell'LDL-R (Davis C.G et al. 1987), così come l'integrità del repeat EGF-A è fondamentale per l'attività della proteasi PCSK9 nella regolazione dell'espressione della proteina recettoriale sulla superficie cellulare (Zhang D.W et al., 2007).

Fino ad oggi sono state identificate più di 1000 mutazioni associate alla ipercolesterolemia familiare (FH) e alcune di queste ricadono proprio nella regione EGF dell'LDLR. Tra queste più di 25 mutazioni missenso e frameshift individuate nel dominio EGF-A dell'LDLR sono correlate a ipercolesterolemia familiare. Molte di queste mutazioni coinvolgono i residui di cisteina presenti in tale dominio e interferiscono così con il corretto folding del recettore (Hobbs H H, 1992). Altre mutazioni missenso

coinvolgono i residui altamente conservati presenti nel dominio EGF-A interferendo con il trafficking alla membrana cellulare a causa del misfolding della proteina (*Boswell E.J et al.,2004*). Delezioni all'interno di tale dominio sono state trovate in alcuni pazienti con ipercolesterolemia familiare, ma gli effetti delle delezioni sulla funzione del recettore non sono stati provati sperimentalmente.

Invece, delezioni del dominio N-terminale dell'LDL-R (*Ligand-binding domain*) non alterano significativamente il legame di PCSK9 al recettore stesso, ciò suggerisce che la proteasi può legare l'LDL-R indipendentemente dalle lipoproteine (*Zhang D.W et al., 2007*). Tuttavia, risulta ancora poco chiaro se l'LDL-R interagisce con le lipoproteine e PCSK9 simultaneamente o se il legame di PCSK9 all'EGF-A del recettore precede l'interazione LDL/LDL-R (*Zhang D.W et al., 2007*).

Da studi strutturali di Cunningham e collaboratori è stato evidenziato che PCSK9 forma interazioni stabili con l'LDL-R sulla superficie cellulare secondo un rapporto stechiometrico di 1:1 ad una Kd di 170nM a pH neutro (*Cunningham D. et al.,2007*). Successivamente al legame PCSK9/LDL-R, il complesso viene internalizzato a livello cellulare ed inviato verso un pathway endosomiale in cui l'ambiente acido favorisce un aumento dell'affinità tra le due proteine (*Qian W.Y et al.,2007*). La stabilizzazione delle interazioni molecolari fra PCSK9 e l'LDL-R nell'ambiente

endosomiale, altera il processo di “recycling” che consente al recettore di poter ritornare sulla membrana cellulare e favorisce la degradazione del complesso stesso a livello lisosomiale (Cunningham D. et al.,2007).

Al fine di comprendere al meglio il meccanismo d’azione di PCSK9, è stato ipotizzato un ulteriore modello cellulare in cui il dominio EGF-A, contenente una sequenza segnale indispensabile per l’interazione con una proteina endosomiale, consente al recettore delle LDL di ritornare sulla superficie cellulare. Il legame di PCSK9 potrebbe interferire con la sequenza segnale impedendo il recycling del recettore delle LDL. In alternativa, PCSK9 potrebbe contenere un diverso segnale di smistamento che direziona il complesso recettore LDL-PCSK9 verso i lisosomi (*Qian W.Y et al.,2007*).

Considerata l’importanza del dominio EGF-A nel favorire l’interazione sito-specifica di PCSK9 e la conseguente degradazione della proteina recettoriale, per la prima volta uno studio in vitro condotto da Shan L. e collaboratori ha dimostrato in che modo l’impiego di una forma sintetica del peptide EGF-A possa inibire la degradazione dell’LDL-R da parte di PCSK9 e ripristinare, quindi, l’uptake delle LDL, competendo con il dominio EGF-A dell’ LDL-R per il legame di PCSK9 (*Shan L. et al.,2008*). Gli autori, impiegando come modello sperimentale le cellule epatiche

HepG2, hanno prima trattato le cellule con PCSK9 ricombinante e successivamente con concentrazioni crescenti di peptide sintetico EGF-A.

I dati sperimentali ottenuti, dimostrano che l'incubazione con il PCSK9 ricombinante, effettivamente, incrementa la degradazione della proteina matura dell' LDL-R in cellule HepG2. Tuttavia, l'aggiunta del peptide EGF-A nel mezzo di coltura inibisce questo effetto e determina, invece, un incremento della componente proteica dell' LDL-R nelle cellule HepG2 incubate con PCSK9 per 6 o 18 h. Questo effetto appare minimo ad una concentrazione di 1.5 μ M di EGF-A ma mostra un chiaro incremento alla concentrazione di 15 μ M di peptide sintetico.

In particolare, la detection dei livelli totali della proteina LDL-R, mediante analisi western-blot, su lisati di cellule HepG2 dopo incubazione con PCSK9 per 18 h e lo studio dell'uptake delle LDL-marcate con Dil, mediante un saggio di binding, hanno evidenziato un effetto dose-dipendente del peptide EGF-A sull'inibizione della degradazione dell' LDL-R e un conseguente recupero dell'uptake delle LDL, suggerendo il possibile ruolo di questo peptide come molecola inibitoria dell'attività catalitica della proteasi PCSK9 sull' LDL-R (*Shan L. et al.,2008*).

2 Scopo del lavoro

Il nostro progetto di ricerca nasce dall'evidenza di una mancata correlazione tra alcune forme di Ipercolesterolemia Familiare e le mutazioni note ad essa associata.

Finora, una maggiore o minore gravità clinica è stata correlata solo ai livelli circolanti di colesterolo totale ed LDL, i quali, a loro volta, sono strettamente dipendenti dall'attività funzionale residua del LDLR, nonché a mutazioni a carico del gene Apo-B100 e PCSK9.

Oggetto di studio sono stati dei pazienti siciliani che pur manifestando una patologia con sintomi tali da poter essere ricondotta ad una forma di Ipercolesterolemia Familiare, sono risultati negativi a tutti i saggi di screening sulle più comuni mutazioni.

Mediante la tecnica del sequenziamento sono state indagate inoltre le regioni del DNA all'interno delle quali cadono le mutazioni a carico del gene LDL, Apo B-100 e PSCK9 e in tutti i casi i risultati sono stati negativi.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato localizzare e possibilmente identificare gli eventuali geni coinvolti nella genesi dell'Ipercolesterolemia Familiare nei pazienti risultati negativi per le mutazioni note mediante la tecnica del microarray.

3 Materiale e Metodi

Lo studio è stato condotto su un gruppo di pazienti con diagnosi di Ipercolesterolemia Familiare. I campioni sono stati forniti da strutture ospedaliere della città di Palermo e per tutti era presente il consenso informato del paziente all'utilizzo del proprio campione biologico per finalità di ricerca scientifica e in modo anonimo.

I criteri per la selezione dei pazienti adulti, affetti da Ipercolesterolemia Familiare (FH) prendevano in considerazione i parametri sotto riportati:

	Punteggio
Paziente con LDL-colesterolo > 330 mg/dl	8
Paziente con LDL-colesterolo tra 250 e 329 mg/dl	5
Paziente con LDL-colesterolo tra 190 e 249 mg/dl	3
Paziente con LDL-colesterolo tra 155 e 198 mg/dl	1
Paziente con Coronaropatia precoce	2
Paziente con Malattia cerebrovascolare e/o periferica precoce	1
Paziente con Xantomatosi tendinea	6
Paziente con Arco Corneale	4
Parente di I° grado con Coronaropatia precoce	1
Parente di I° grado con LDL-colesterolo > 190 mg/dl	1
Parente di I° grado con Xantomi tendinei	2

Bambini (età < 18 anni) nella famiglia con LDL-colesterolo > 160 mg/dl

2

I pazienti con punteggio superiore a 6, sono stati candidati allo studio genetico per l'identificazione della mutazione responsabile del fenotipo FH.

3.1 Estrazione di DNA da sangue

Ai pazienti oggetto del nostro studio è stato effettuato un prelievo di sangue periferico in presenza di EDTA come anticoagulante per l'estrazione del DNA.

Tale estrazione è stata eseguita con il metodo classico Fenolo-Cloroformio utilizzando una lisi osmotica al fine di eliminare l'emoglobina e recuperare i nuclei dei leucociti che successivamente vengono sottoposti a digestione over-night con soluzione salina-edta + sds 10% + proteinasi K alla temperatura di 37 °C, quindi purificato con fenolo-cloroformio e successivamente precipitato con etanolo.

L'acido nucleico è stato infine risospeso in tampone TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8)

Il DNA così estratto è stato prima quantizzato mediante lettura fluorometrica a 260 nm (Nanodrop) e successivamente utilizzato per identificare riarrangiamenti del gene LDLR mediante Southern Blot e per ricercare mutazioni tramite sequenziamento.

3.2 Southern Blot

Allo scopo di identificare gli eventuali grossi riarrangiamenti del gene LDL-R, sono stati condotti in prima istanza degli esperimenti di Southern blot.

Per costruire la sonda usata in questi esperimenti è stato usato il plasmide ricombinante pLDLR-3 (Fig. 9). Il pLDLR3 é un vettore in cui è stato clonato il cDNA completo del gene ldl-r, un frammento di circa 5,3Kb che oltre a contenere tutti gli esoni del gene, ha anche una grossa porzione di 3'UTR che è particolarmente ricca in sequenze Alu. Queste sequenze sono mediamente ripetute nel genoma umano, quindi una sonda che le contenesse, darebbe con molta probabilità delle ibridazioni aspecifiche. L'enzima di restrizione Xho1 riconosce un sito nel

polylinker al 3' del frammento ed uno alla fine della sequenza codificante. Mediante una digestione con Xho1 è stato così possibile eliminare la porzione del 3'UTR dal vettore (Fig. 9A) a cui è rimasta legata la restante parte del cDNA (LDLR 2,6Kb). Per separare il vettore dal frammento LDLR 2,6Kb è stato necessario digerire con un altro enzima, Hind III, che riconosce un sito nel polylinker al 5' del frammento (Fig. 9B). La dimensione dei frammenti ottenuti è stata, per entrambi i frammenti, di circa 2,6Kb: non è stato dunque possibile separarli tramite elettroforesi. Per superare questo problema è stato usato un altro enzima di restrizione, Ase1, che ha un unico sito di restrizione nel vettore e non riconosce sequenze all'interno del cDNA.

La digestione con Ase1 divide il vettore in due frammenti di circa 800bp e 1800bp. Ciò ha consentito di separare agevolmente la miscela di frammenti rendendo possibile la purificazione del frammento LDLR (2,6Kb) tramite elettroeluzione (fig. 9 C). Esso è stato successivamente subclonato nel plasmide Bluescript ks (+) che era stato precedentemente digerito con gli enzimi XhoI e Hind III al fine di creare delle estremità coesive con quelle del frammento.

Il frammento LDLR2,6Kb marcato radioattivamente con ^{32}P tramite la tecnica del random primed, è stato usato come sonda nell'esperimento di Southern blot.

Esperimenti di Southern blot preliminari, in cui il DNA genomico è stato tagliato con un solo enzima di restrizione, hanno mostrato dei risultati poco interpretabili poiché il pattern di restrizione che si ottiene con l'uso di un singolo enzima è caratterizzato da frammenti di grosse dimensioni e ciò non permette la discriminazione di un eventuale riarrangiamento di piccole dimensioni. La digestione con due enzimi, invece, dà un pattern che è adatto al nostro studio. Sono stati scelti gli enzimi BamHI e Hind III che, tagliano il gene LDL-R nei frammenti della lunghezza di circa 16Kb, 10Kb, 7Kb, 5,5Kb, 2,5Kb (Fig.10) (65).

Tutti i 20 pazienti selezionati sono stati analizzati. In ogni esperimento è stato inserito un controllo negativo costituito dal DNA di un soggetto non ipercolesterolemico, ed un marcatore di peso molecolare noto (DNA del fago ϕ digerito con BamHI- HindIII).

3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Nel nostro studio la tappa fondamentale è rappresentata dalla Polymerase Chain Reaction (PCR) avente come scopo quello di andare ad amplificare i geni con le modalità che verranno di seguito descritte.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere amplificata esponenzialmente in vitro ad opera di un enzima detto *Taq polimerasi*, che diversamente dalle altre DNA polimerasi è capace di resistere anche alla temperatura di denaturazione del DNA, tappa fondamentale che rende il DNA a singolo filamento e quindi disponibile all'azione polimerasica. Per poter iniziare la sintesi del nuovo filamento, la *Taq polimerasi* necessita di un corto oligonucleotide di innesco (primer) che si appaia allo stampo nelle immediate vicinanze del segmento di DNA che si vuole amplificare. È dunque necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per poter sintetizzare gli oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad esse e che fungeranno da primers. Durante la reazione di PCR i primers assumono un doppio ruolo: nei primi cicli ciascuno di essi funziona da sonda, ovvero “cerca” lungo il genoma la sequenza specifica a cui legarsi; dopo che entrambi i primers si sono legati con il corretto orientamento e, quindi, hanno selezionato la regione da

amplificare, agiscono da “vettori” dell’amplificazione. Aggiungendo un primer oligonucleotidico per ciascuno dei due filamenti separati, entrambi i filamenti di DNA possono servire da stampo.

Il termociclatore è uno strumento che, automaticamente e in modo rapido, permette di variare la temperatura necessaria alle varie fasi del ciclo. Infatti il miscuglio di reazione viene ciclicamente scaldato a 93-97 °C in modo da denaturare i filamenti, che sono così disponibili per l’annealing con i primers, che si ha a 30-70 °C. A questo punto la Taq polimerasi può sintetizzare i nuovi filamenti di DNA a partire dai primers, questa fase è detta *estensione* e si svolge alla temperatura di 65-72 °C. L’amplificazione è una reazione a cascata, perché ogni tratto di DNA che si genera, a sua volta, funge da stampo per quelli successivi per cui, al termine di n cicli, si ha un aumento esponenziale pari a 2^n molecole di DNA a doppia elica.

Tali molecole sono le copie della sequenza di DNA compresa tra i due primers.

La quantità di DNA necessaria per la PCR è veramente piccola (meno di 1 µg di DNA genomico totale, ma a volte basta una singola molecola di DNA).

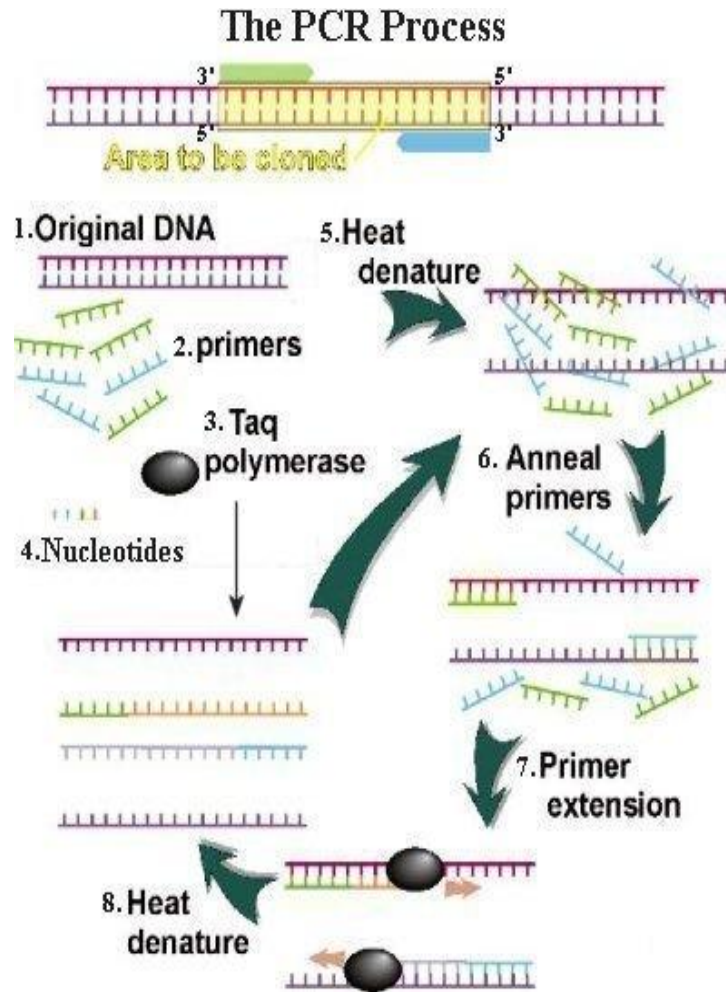


Figura 4

La scelta dei primers è sicuramente cruciale per il successo e l'efficacia della reazione di amplificazione (figura 4).

Il requisito fondamentale per considerare ottimale un set di primers è la capacità di ibridare in modo efficiente e specifico alla sequenza di interesse, con un'ibridazione trascurabile nei confronti di altre sequenze presenti nel campione.

La distanza tra i due primers è piuttosto flessibile e può variare da 100 a 10000 paia di basi (10 kb), tuttavia al di sopra dei 3 kb si osserva una netta diminuzione dell'efficienza della reazione. La lunghezza dei primers dovrebbe essere preferibilmente compresa tra le 20 e le 30 basi, per assicurare la specificità del processo è importante che la lunghezza non sia inferiore alle 16 basi.

La sequenza nucleotidica dei primers viene stabilita in base alla sequenza di DNA di interesse, mediante l'utilizzo di uno specifico software, il "Primer v. 1.1". Questo software permette di analizzare i vari tratti del DNA da amplificare, eliminando quelli troppo ricchi in GC, quelli che hanno una temperatura di melting troppo alta o troppo bassa, quelli che presentano ripetizioni di basi o di gruppi di basi.

Il software permette inoltre di individuare e scartare gli oligonucleotidi che possono ripiegarsi a formare hairpin, o quelli che tendono a formare dimeri o trimeri.

In base ai criteri sopra descritti dettagliatamente abbiamo effettuato la scelta delle nostre regioni di interesse e quindi dei primers da noi in seguito utilizzati.

Il profilo termico di amplificazione, eseguito in un termociclatore Thermo Hybaid., è di seguito riportato nella tabella.

I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati verificati tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% ed una loro immagine è stata acquisita mediante scansione laser.

Denaturazione	95°C	5'	1 ciclo
Denaturazione	95°C	1'	35 cicli
Annealing	59/67°C	1'	
Estensione	72 °C	1'	
Estensione Finale	72 °C	10'	1 ciclo

Tabella 1 - Profilo Termico geni LDLR e Apo B

ESONE	T° m	SIZE	PRIMERS
PROMOTORE	60	340	FW:GGCATTAGGCTATTGGAGGA RW: TGTGAGGTTTCTAGCAGGGG
1	60	377	FW:CTTGCAGTGAGGTGAAGACAT RW:TGCCATTACCCACAAGTCT
2	58	274	FW:TCTGATTCTGGCGTTGAGAG

			RW:AGCGGATCACTTGAGACCA
3	56	220	FW:GCCTCAGTGGTCTTTCTT RW:CCAGGACTCAGATAGGCTC
4.1	61	272	FW:GAGCTTCACACGGTGATGGT RW:CACTCATCCGAGCCATCTTC
4.2	60	283	FW:CAACAGCTCCACCTGCATC RW:AGCCCAGGGACAGGTGATA
5	63	417	FW:GGCTCAAGCAATCCTCCTG RW:AAGGAAGTGAGGCTCTGAGAG
6	60	248	FW:AACTGAGGCTCAGACACACC RW:TACAGCACTCATGTCTCAGTC
7	63	216	FW:CGAGAGTGACCAGTCTGCATC RW:GGTTGCCATGTCAGGAAGC
8	60	380	FW:CTCCGTCTCTAGCCATTG RW:AGGACATATGCAGGCATC
9	61	322	FW:GAGGCACTCTTGGTTCCACT RW:CTGGAGGCAGGAGGAGAGAG
10	61	385	FW:TGATCTGCAGGTGAGCGTC RW:TCCTGAAGCTCCTTCCTGC
11	56	352	FW:ATTCGTTGCACGCATTGG

			RW:GTGACAGACCAAGACCTCATT
12	66	264	FW:ACTGGCATCAGCACGTGAC RW:GCGTTCATCTTGGCTTGAGT
13	59	326	FW:TGTCTATCCCAGTGTTAACG RW:GCAGAAGAAGCGGAGTCAG
14	61	322	FW:GTGGAAACTCTGGAATGTTG RW:TTGACAGATGAGCAGAGAGAG
15	67	346	FW:TTCGTCATTAGGCGCACAG RW:GACGACACCTGGACTCCATCT
16	63	165	FW:GACCTCTGTTTCTATCCCCT RW:CAGGCACGAGGTCACATAGC
17	60	289	FW:CAGGAGTCAAGGTTATGGTAG RW:CTAATGCTGTCCTCGATCTGG
18	60	720	FW:CCAGAAGGTGAGAAGTAGGTG RW:CACGGATTCAGCCAGATCAT
ApoB	60°C	148	F W:CCAACACTTACTTGAATTCCAAAC RW :CTGTGCTCCCAGAGGGAATATATGG

Tabella : PRIMERS LDLR e Apo B

Denaturazione	95°C	5'	1 ciclo
Denaturazione	95°C	1'	35 cicli
Annealing	58/64°C	1'	
Estensione	72 °C	1'	
Estensione Finale	72 °C	10'	1 ciclo

Tabella 1 -Profilo Termico gene PCSK9

ESONI	T°m	SIZE	PRIMERS
PCSK9_E1_1	64°C	499	FW:CAGTATAGGATCGTCCGG RW:CACCAGCTCCTCGTAGTCG
PCSK9_E1_2	61°C	368	FW:CACGGCCTCTAGGTCTCCC RW:CCTGCATCCACTTCCTCTC
PCSK9_E2_1	60°C	328	FW:TTGCTGGGTTTCTTCCATT RW:AGCAATGGGCCTACTAAA
PCSK9_E3_1	60	260	FW:TTTGATCAGGTAAGGCCAG RW:ATGGATTCAGCTCAGATG
PCSK9_E4_1	59°C	496	FW:CATCTGGATTATGCGGT RW:CTAGCAGAGTCCTGCGCC
PCSK9_E4_2	60°C	445	FW:AGCAGTTTGACTGACAGCC

			RW:AGCGTTCTCCACTCCACAG
PCSK9_E4_3	59°C	497	FW:TCTGAGGTTGTGACTCGTG RW:CTGGTGAAAGCGCCTTAA
PCSK9_E4_4	59.5°C	390	FW:CTAGGCCTCCCTTTCCTTT RW:ACCTCCAGGATGGGGATG
PCSK9_E5_1	60°C	237	FW:TTGTTATAGGGTGGAGGG RW:CCAGATGGAGAGAGACCG
PCSK9_E6_1	59°C	430	FW:CTCTGTGCCTGTAAGGGGA RW:CTGACGACTCCTTCCAAAC
PCSK9_E7_1	59.5°C	297	FW:CCTCTCTTGGGCTCCTTTCT RW:ACAGACCCTGACTGCCAG
PCSK9_E8_1	60°C	310	FW:GTGTGCACTGGCAGGAGC RW:GGTCACACAGACCTCCCG
PCSK9_E9_1	60°C	285	FW:CTGTGGAGGTCCCCTCACT RW:CCAGCACTGACACACACA
PCSK9_E10_1	59.5°C	315	FW:TGATGAGGGTGCTTGATTG RW:GAAAGAGACCCCTCCTCA
PCSK9_E11_1	60°C	495	FW:AGCATCCCAGCATTTC AAT RW:GTGGTGGCACAAACTGAC
PCSK9_E12_1	60°C	494	FW:GATGTTCGGAGGGAGAAAA

			RW:GGCACCCAGAGTGAGTGT
PCSK9_E12_2	60°C	500	FW:ACTTGTCCCTCTCTCAGCC RW:CTGTCTCCAGCCTCTGGCA
PCSK9_E12_3	60°C	479	FW:TAAGTGTGGAGAAGCCCG RW:CATCACTCACCGAGCTTCT
PCSK9_E12_4	58°C	422	FW:CTGGGCTCCTCATTTTTAG RW:TATAAGCAAGGCATCACT

TABELLA PRIMERS PCSK9

3.4 Purificazione dei prodotti di PCR

Tutti i frammenti ottenuti dalle reazioni di amplificazione sono stati purificati tramite elettroforesi in gel di agarosio Low Melting Point all'1% in TAE 1X (0,04M Tris acetato, 0,001M EDTA) ed eluizione del DNA dal gel attraverso purificazione su colonna (PCR preps DNA purification kit - Promega). I campioni sono stati risospesi in acqua mQ e quantizzati mediante lettura spettrofotometrica (260nm); l'integrità dei prodotti è stata valutata visivamente su gel d'agarosio all'1,5% in TBE.

3.5 Sequenziamento

I geni LDLR, PCSK9 e APOB sono stati amplificati mediante PCR e sequenziati utilizzando il metodo di Sanger applicato al sequenziatore automatico a capillare ABI310 (Applied-Biosystems).

Questo metodo consiste nell'impiego di nucleotidi che, modificati nella loro struttura chimica (ddNTP) e marcati con fluorocromo (Cy 5.5) vengono incorporati nella sintesi del neo-filamento da una DNA polimerasi termoresistente, la quale utilizza come innesco un primer specifico per ogni esone amplificato.

La sintesi del DNA si arresta al momento dell'incorporazione dell'analogo 2',3'-dideossinucleotide che, mancando del 3'-OH, non permette la formazione del legame fosfodiesterico 3'-5' e l'ulteriore sintesi del filamento di DNA.

In questo modo si ottengono filamenti complementari fluorescenti, ognuno di lunghezza diversa, che terminano con uno dei quattro ddNTP all'estremità 3' e che vengono separati per elettroforesi su capillare. Durante l'elettroforesi il campione viene colpito da una sorgente luminosa (laser) che eccita i fluorofori ed emette diverse fluorescenze, che vengono rilevate da un sensore; infine il segnale viene elaborato da un opportuno software, che mostra la sequenza del DNA in forma grafica a quattro colori.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositata in Gene Bank.

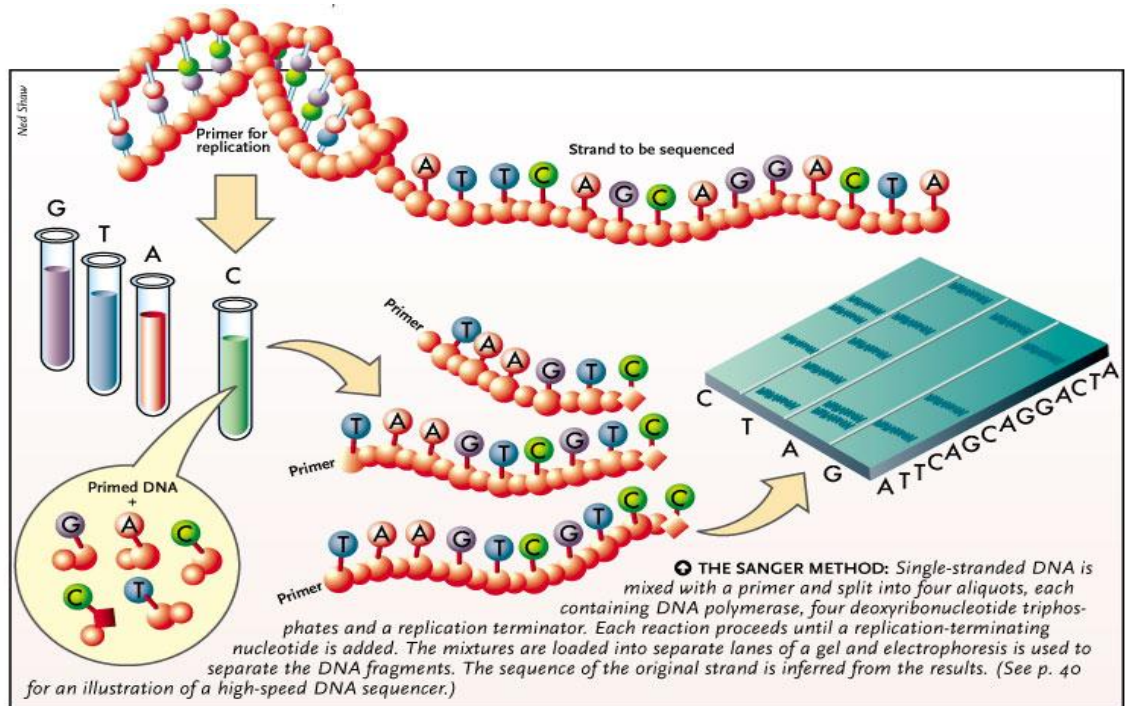


Figura: metodo Sanger

3.6 PCR e RFLP per il gene Apo B

Tale analisi è stata eseguita con un metodica basata su PCR e RFLP descritta da altri autori (64). In breve, è stata amplificata la porzione del gene Apo B che comprende la mutazione, utilizzando un primer che inserisce un sito di restrizione riconosciuto dall'enzima Msp1 (66). Nel caso in cui è presente la mutazione, il sito di restizione viene abolito.

3.7 Popolazione studiata

Una volta completata l'analisi dei campioni, per quei soggetti, i cui geni sopra descritti, sono risultati privi di mutazioni, sono stati reclutati gli altri componenti della famiglia sia affetti che non, in modo da costruire i rispettivi alberi genealogici, per uno studio di linkage, utilizzando i soggetti non affetti come gruppo controllo (figure 6, 7, 8, 9 e 10).

Nella Famiglia A (Figura 6) abbiamo 7 soggetti di cui 4 affetti da ipercolesterolemia: il padre (I:1), la madre (I:2), il figlio (II:1) ed una nipote (III:2). L'indagine genomica è stata condotta anche sui soggetti sani al fine di riscontrare le differenze a livello genico rispetto ai portatori di FH.

La Famiglia B (Figura 7) è composta da 13 componenti di cui 4 risultano affetti da ipercolesterolemia: II1, II3, III2 e IV1.

Come si evince dalla figura 8 nella Famiglia D ci sono sei soggetti affetti da ipercolesterolemia: II1, II3, III5, III7 e IV1. Gli altri membri della famiglia non risultando affetti da FH sono stati utilizzati come gruppo di controllo per validare le mutazioni riscontrate.

La Famiglia G (Fig. 9) è composta da 9 componenti di cui 4 affetti: un padre II9, un figlio III11 ed entrambi i nipoti IV1 e IV2. I campioni dei soggetti sani venivano utilizzati come gruppo controllo.

Nella Famiglia I (Figura 10) abbiamo 9 soggetti di cui 7 affetti: la sorella II2, il fratello III1, la moglie II3, i 3 figli (III1, III3 e III5) e un nipote IV6. I soggetti sani anche in questo caso sono stati utilizzati come gruppo controllo.

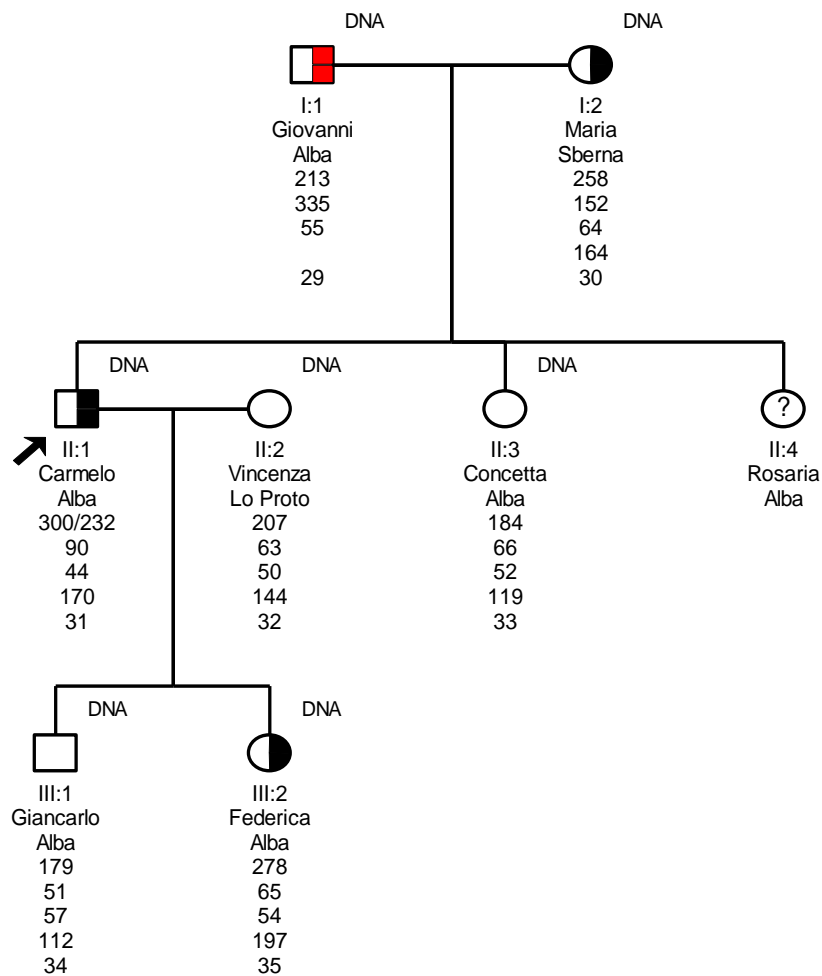


Fig. 6: Albero genealogico famiglia A

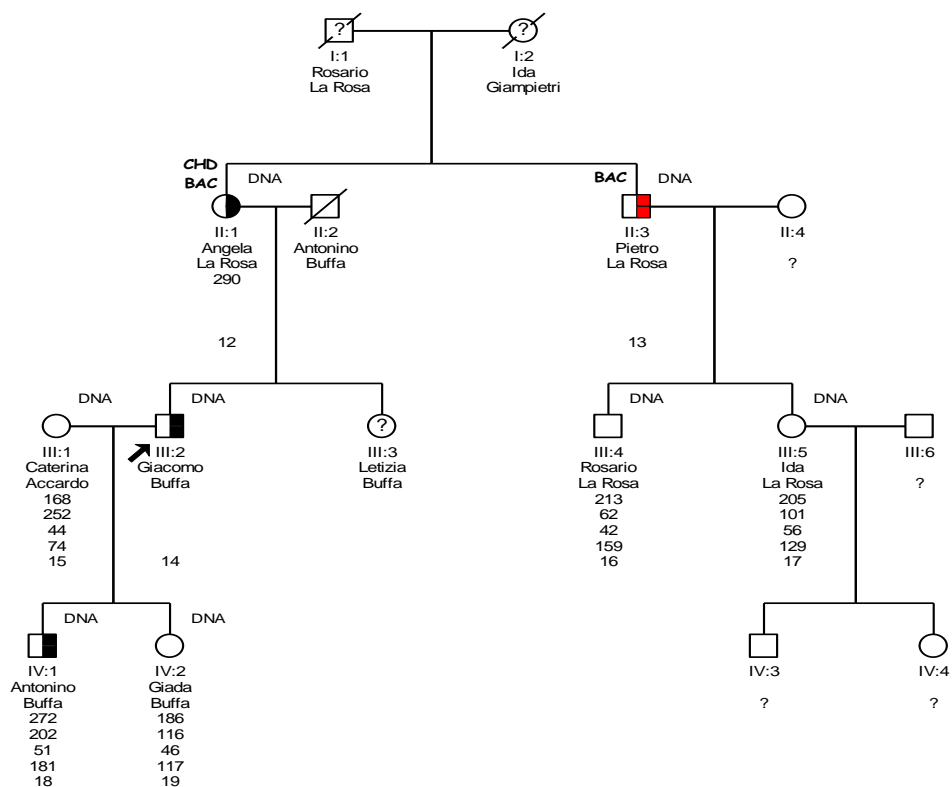


Fig 7: Albero genealogico famiglia B

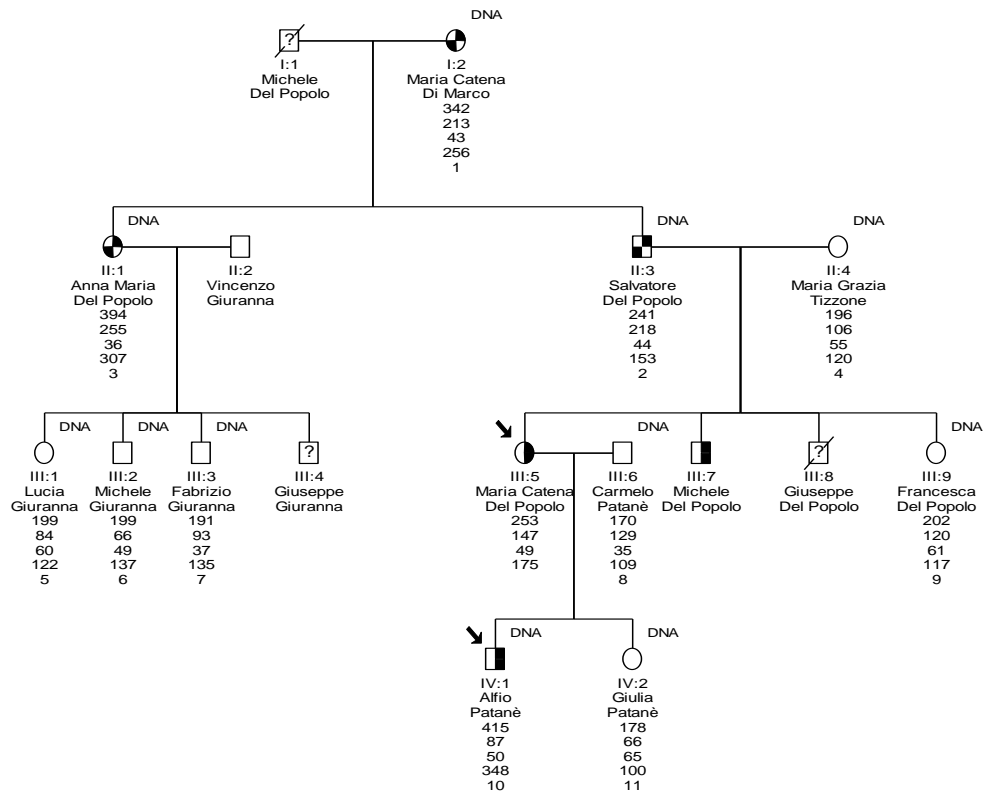


Fig.

8: Albero genealogico Famiglia D

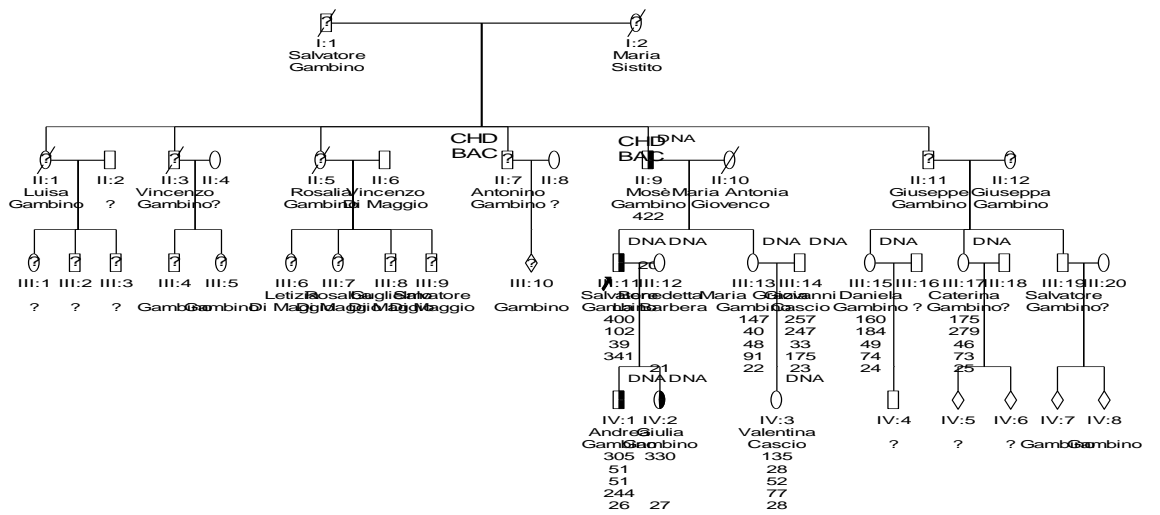


Fig 9: Albero genealogico famiglia G

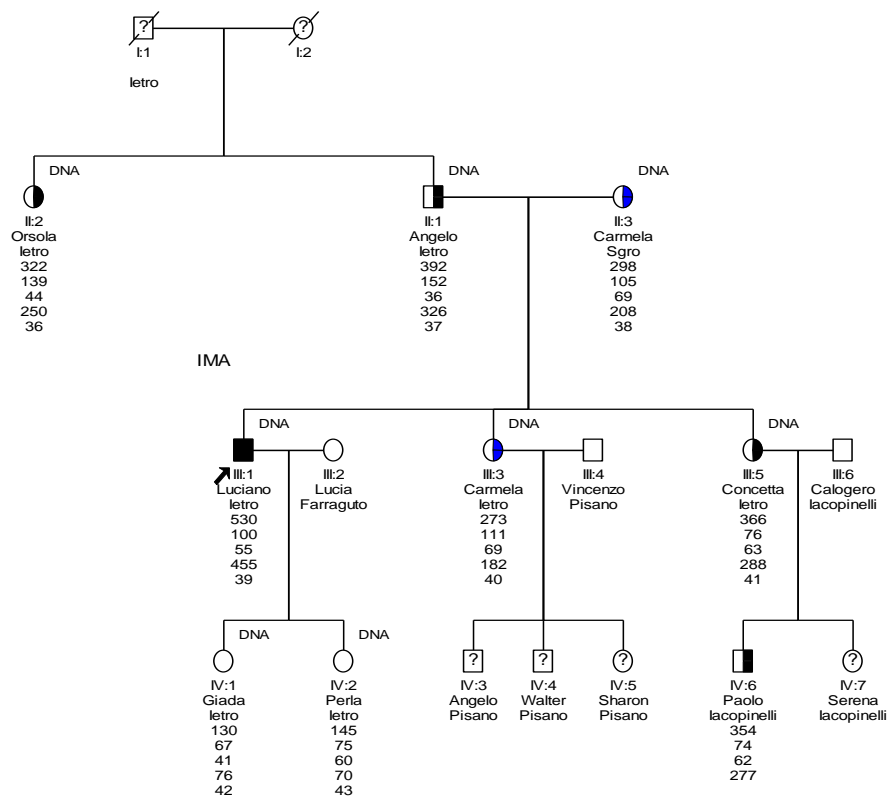


Fig.

10: Albero genealogico Famiglia I

3.8 Analisi dei dati

3.8.1 Preparazione del campione

Quasi tutte le tecniche di genotipizzazione richiedono del DNA molto purificato come materiale di partenza per la ricerca degli SNP.

L'isolamento degli acidi nucleici è infatti la prima fase di qualsiasi studio su base genomica. La qualità dei dati di genotipizzazione del DNA è direttamente correlata alla purezza ed all'integrità del materiale di partenza.

L'estrazione del DNA è stata eseguita su sangue fresco prelevato in tubi Vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante, ed è stata eseguita mediante Kit, utilizzando il protocollo specifico per sangue intero.

Dopo una iniziale incubazione con una soluzione di lisi, il lisato è stato caricato sulla colonna in modo che il DNA potesse legarsi alle membrane di silice, mentre il restante lisato è stato eliminato per centrifugazione.

Dopo alcuni lavaggi il DNA è stato eluito all'interno di un tubo di raccolta mediante un opportuno buffer di eluizione. Nelle spin column, le proprietà di legame delle matrici e le velocità di microcentrifugazione combinate, ci hanno permesso una rimozione del 90-95% dei contaminanti e un analogo recupero dei frammenti di DNA.

I campioni di DNA così ottenuti, sono stati sottoposti a determinazione quantitativa, mediante spettrofotometro, e qualitativa mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio in tampone TBE 1X. La quantità media di DNA ottenuto dal sangue è risultata essere quantitativamente soddisfacente, circa 200 ng/ μ l, e piuttosto costante.

Per quanto riguarda la purezza il valore medio, pari a 1.65, ha denotato una scarsa contaminazione da parte di sostanze che residuano dal processo di estrazione (Figura 9).

Il DNA così ottenuto è risultato idoneo per la conduzione di una reazione di SNP array.

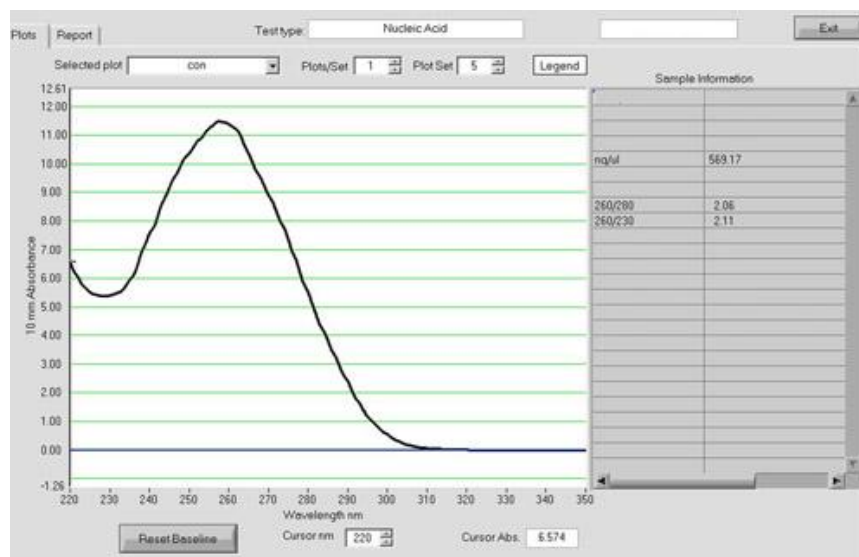


Figura 9. Elettroferogramma di un campione di DNA

3.8.2 Genotipizzazione degli SNPs

Per la rilevazione degli SNP è necessario considerare un insieme di parametri. Un'ideale piattaforma di genotipizzazione dovrebbe consentire la piena integrazione, partendo dalla scelta della tipologia di campione e passando alla sua raccolta e preparazione, alla genotipizzazione, all'analisi dei dati ed al loro rintracciamento.

Per il nostro lavoro abbiamo applicato la tecnologia Affymetrix utilizzando il kit Genome-Wide Human SNP Array 6.0. La strumentazione utilizzata per questa metodica consiste in una piattaforma Affymetrix per il processamento e l'analisi dei "microarrays". Il nostro sistema è composto

da uno scanner a 4 colori 7G completo di autoloader, tre stazioni fluidiche F450, un fornello di ibridazione HO 450, una workstation per la gestione della strumentazione e una workstation per l'analisi dei dati (Figura 11).



Figura 11 Piattaforma Affymetrix

I microarray ad alta densità della Affymetrix (Santa Clara, CA) vengono creati legando centinaia di migliaia di oligonucleotidi ad una superficie solida di silicio secondo una disposizione ordinata. Il campione di DNA da analizzare viene amplificato tramite PCR per incorporare i nucleotidi marcati in fluorescenza, e quindi ibridato all'array.

Ogni nucleotide dell'array ad alta densità funge da sonda allele-specifica. Le sequenze perfettamente corrispondenti si ibridano con maggiore efficienza al loro oligomero nell'array e forniscono quindi segnali di

fluorescenza più forti rispetto alle combinazioni sonda-bersaglio parzialmente o solo minimamente simili. I segnali di ibridazione vengono quantificati tramite scansione in fluorescenza ad alta risoluzione ed analizzati con un software dedicato. La scelta dei tamponi di ibridazione, del tempo di incubazione e delle condizioni di lavaggio è cruciale. Una limitazione di questo approccio è data dal fatto che l'ibridazione genera solitamente un rapporto segnale/rumore di fondo piuttosto basso, e si ottengono solo ridotte differenze di fluorescenza fra l'ibridazione dei bersagli marcati alle sequenze complementari e l'ibridazione a sequenze non perfettamente corrispondenti.

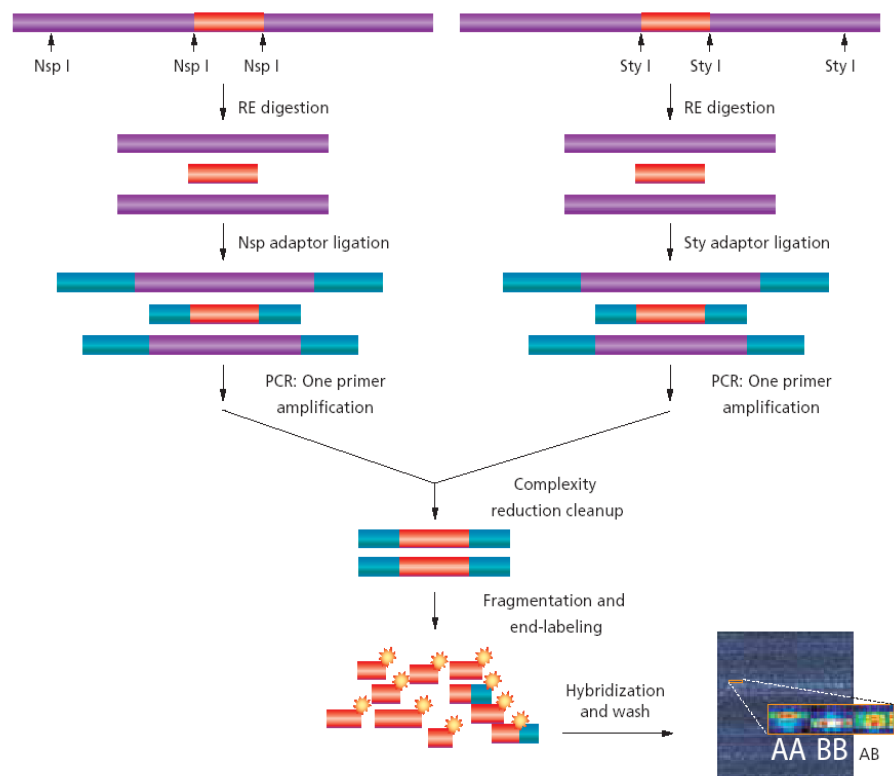


Figura 11 Schema rappresentativo della metodica applicata

Gli SNP array 6.0 contengono più di 900,000 sonde non polimorfiche e 906.600 sonde SNP. Tutte le sonde sull'array sono state create al fine di identificare le sequenze dei frammenti di restrizione degli enzimi Nsp1 o Sty1 di approssimativamente 200-1.100 bp, precedentemente amplificate attraverso il kit Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 5.0/6.0 (Figura 11).

Il DNA genomico totale (500 ng) è stato digerito con gli enzimi di restrizione NSp I e Sty I e successivamente legato ad adattatori che riconoscono 4bp. Tutti i frammenti derivanti dalla digestione enzimatica, indipendentemente dalle loro dimensioni, si legano agli adattatori. Un primer generico che riconosce la sequenza adattatore viene utilizzato per amplificare i frammenti di DNA legati agli adattatori. Le condizioni di PCR sono state ottimizzate in modo da amplificare frammenti preferenzialmente di dimensione compresa tra 200 e 1.100 bp. I prodotti di amplificazione di PCR (Figura 12) così ottenuti sono stati successivamente combinati e purificati utilizzando delle beads di polistirene.

Insieme al nostro campione, è stato processato un DNA di controllo fornito dal Kit Affymetrix; la misura del DNA genomico in seguito all'amplificazione è stata comparata con quello del campione di riferimento in modo da assicurare la perfetta qualità del prodotto.

Il DNA amplificato viene quindi frammentato (Figura 13), marcato e ibridato in un SNP Array 6.0

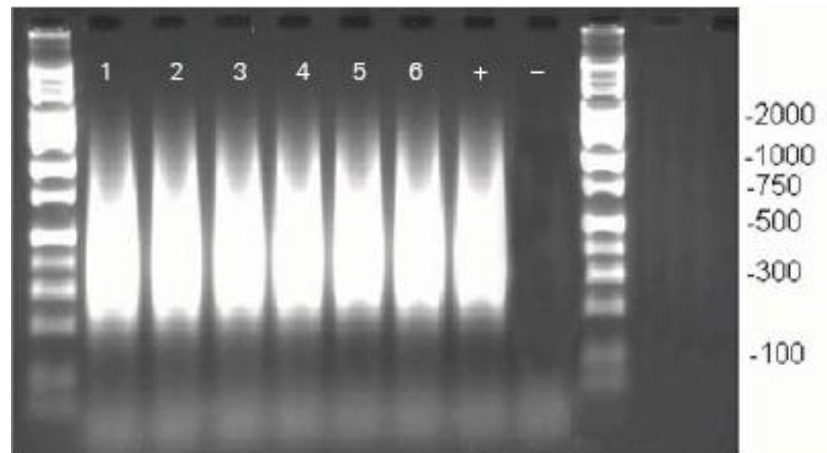


Figura 12 Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR

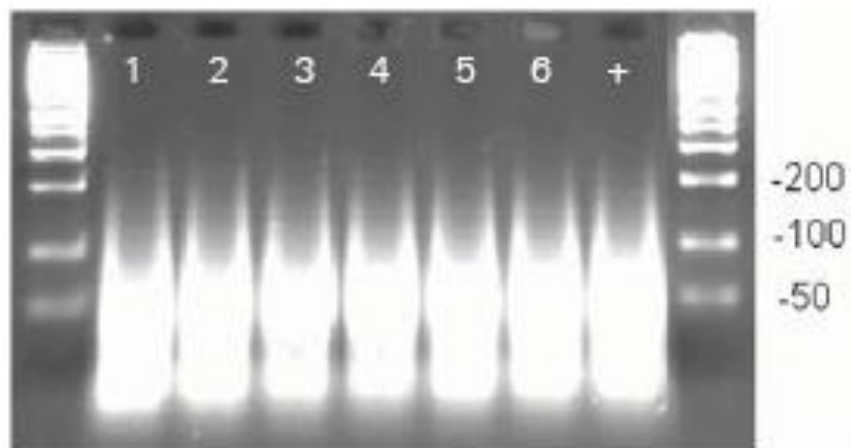


Figura 13 Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR dopo frammentazione

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Ad oggi sono note più di 1000 mutazioni nel gene che codifica per il recettore delle LDL. L'identificazione della mutazione causale consente la diagnosi di certezza di FH e permette che gli altri componenti della famiglia eventualmente affetti siano identificati e quindi sottoposti alle terapie adeguate, anche se ancora non presentano complicanze dell'ipercolesterolemia. Molte delle mutazioni identificate finora presentano una distribuzione che rispecchia l'isolamento geografico di alcune popolazioni. In alcuni paesi come il Sud Africa e la Finlandia, infatti, solo poche mutazioni sono responsabili della malattia (effetto capostipite) e ciò è un vantaggio perché permette l'utilizzo di test diagnostici veloci e poco costosi (56-57). In Sicilia invece, il riscontro di un alto numero di mutazioni rispecchia il dato storico dell'incontro di molteplici etnie. In realtà anche nella nostra regione ci sono delle mutazioni che ricorrono con una frequenza maggiore rispetto ad altre e ciò ha portato, in un precedente studio, all'ipotesi che si potessero usare test veloci per l'identificazione delle mutazioni nella nostra regione (60). I risultati di questo studio hanno mostrato che questo approccio fornisce la diagnosi molecolare soltanto nel 10 % (60) ed ha costretto alla scelta di tecniche che, anche se più lente ed onerose delle precedenti,

permettano di porre una diagnosi molecolare in un maggiore numero di casi attraverso l'identificazione di mutazioni note o non descritte precedentemente.

Allo scopo di identificare gli eventuali grossi riarrangiamenti del gene LDL-R, sono stati condotti in prima istanza degli esperimenti di Southern Blot.

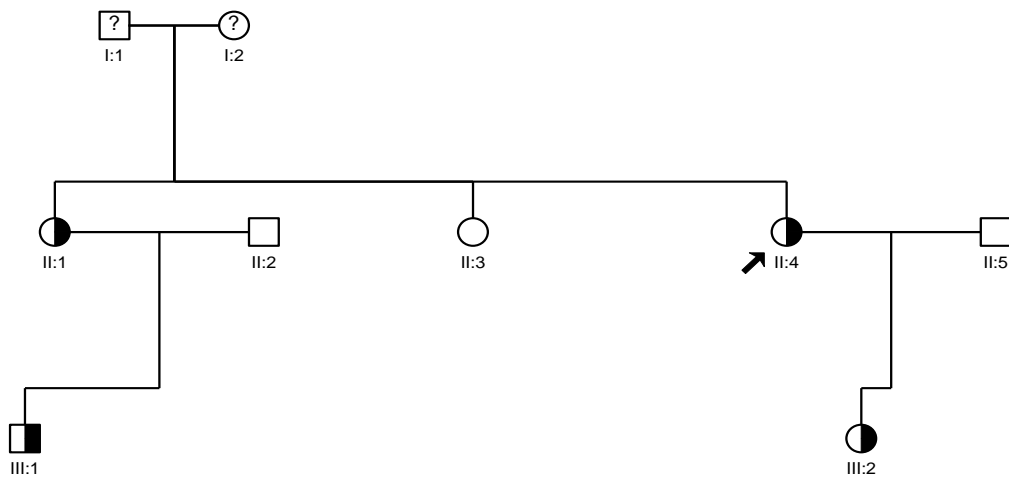
I risultati ottenuti dagli esperimenti di Southern Blot mostrano un pattern di digestione sovrapponibile con quello ottenuto utilizzando il DNA estratto dal campione di controllo proveniente da un soggetto non affetto.

Alla luce di questi risultati si può affermare, quindi, che nel gruppo di pazienti da noi selezionati ed analizzati, non si evidenziano grossi riarrangiamenti nel gene che codifica per il recettore delle LDL. Esclusa quindi la possibilità della presenza di grossi riarrangiamenti, l'attenzione è stata rivolta alla ricerca di mutazioni puntiformi o di piccoli riarrangiamenti. È stato inoltre ricercata la mutazione Arg3500Gln nel gene dell'apoproteina B e le mutazioni a carico del gene PCSK9.

Infatti, l'Ipercolesterolemia Familiare, caratterizzata da mutazioni del gene che codifica per il recettore delle LDL, è sostanzialmente sovrapponibile, dal punto di vista clinico, alla FDB (Familial Defective Apo B) che è causata da una mutazione del gene della apolipoproteina B

(Apo B 3500), il ligando del recettore delle LDL ed alla forma legata a mutazioni con guadagno di funzione di PCSK9. Abbiamo quindi voluto analizzare l'esistenza di eventuali portatori della mutazione del gene dell'Apo B (Apo B 3500) tra i soggetti da noi selezionati. Tale analisi è stata eseguita con un metodica basata su PCR e RFLP. Dopo la digestione con Msp1 sul prodotto di amplificazione, l'analisi elettroforetica ha permesso di evidenziare la presenza di portatori di ApoB 3500.

Viene riportato, l'albero genealogico di un paziente dove la mutazione è stata riscontrata.



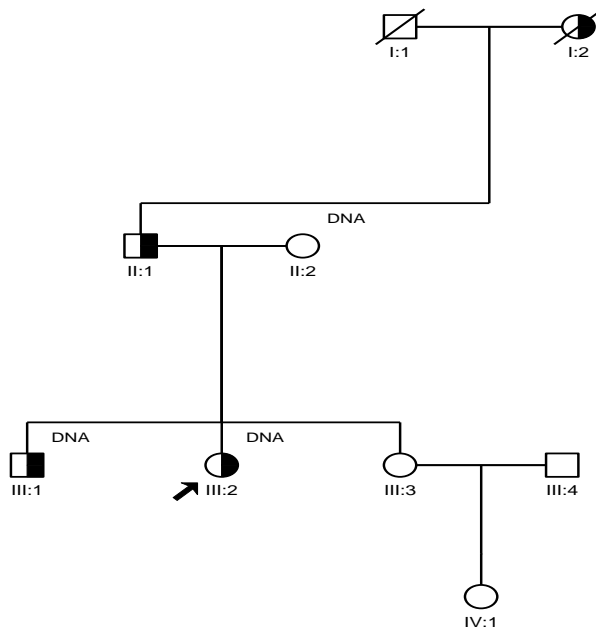
	AFFETTO/NON AFFETTO	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)
II:4	AFFETTO	378	160	50
II:1	AFFETTO	280	150	55
II:3	NON AFFETTO	189	137	47
III:2	AFFETTO	276	40	69
III:1	AFFETTO	268	179	32

Infine per identificare mutazioni puntiformi o piccoli riarrangiamenti nel gene che codifica per il recettore delle LDL è stato iniziato per tutti i pazienti selezionati, uno studio riguardante l'analisi comparativa delle sequenze codificanti. Tale studio è stato eseguito applicando la tecnica del sequenziamento diretto degli amplificati ottenuti da ognuno dei singoli esoni che costituiscono il gene. Le mutazioni del gene LDL-R note finora non sono uniformemente distribuite lungo tutto il gene, ci sono, infatti, degli esoni che presentano più frequentemente di altri punti di mutazione (hot spots).

Partendo da questo presupposto sono stati prima sequenziati gli esoni per i quali sono state descritte più mutazioni.

Il primo esone che è stato sequenziato è l'esone 4 che è l'esone che presenta più mutazioni rispetto agli altri. Tutti i pazienti sono stati analizzati per l'eventuale presenza di mutazioni in questo esone ed abbiamo identificato un probando portatore della mutazione D118N detta anche Sassari-2. Si è passati dunque al sequenziamento degli esoni che codificano per il dominio di omologia all'EGF (dall'esone 7 all'esone 14). Questi esoni sono stati sequenziati: un gruppo sono risultati negativi per la presenza di eventuali mutazioni; in altri, invece sono state identificate mutazioni puntiformi.

Tutte queste mutazioni tranne una sono mutazioni già descritte e codificate in un database contenente tutte le mutazioni del gene LDLR finora conosciute. Sotto viene riportato l'albero genealogico del paziente con la mutazione non descritta in letteratura c.2133C/A, C690X.



	AFFETTO/NON AFFETTO	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)
I:1	NON AFFETTO			
I:2	NON AFFETTO			
II:1	AFFETTO	359	in trattamer	28 in trattamento
II:2	NON AFFETTO	203	63	67
III:1	AFFETTO	387	210	44
III:2	AFFETTO	374	57	49

Tra le altre famiglie arruolate un probando è stato trovato portatore della mutazione Palermo 1 (G>A 1646) che rappresenta, peraltro, la mutazione più frequente in Sicilia (7 %) come dimostrato dal precedente studio condotto nella nostra regione (60).

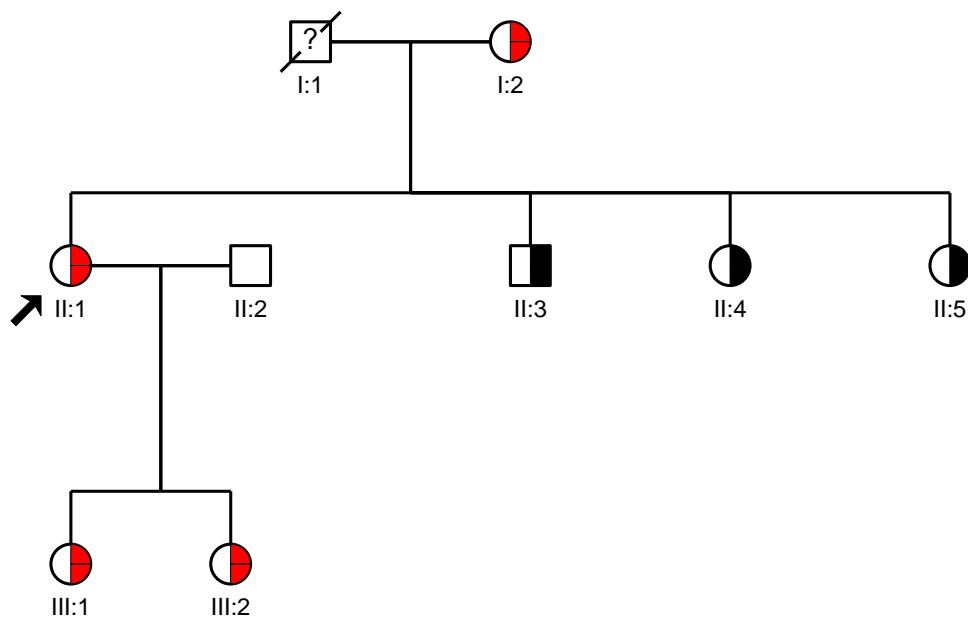
La mutazione Palermo 1 comporta la sostituzione di una glicina con un acido aspartico nella porzione della proteina codificata dall'esone 11 (dominio di omologia al precursore dell'EGF) causando la perdita della capacità di rilascio dell'LDL nell'endosoma: il recettore allora non è riciclato in superficie ed è degradato prematuramente.

La mutazione Sicily, Foggia, Naples 4 (G>A 1775) è stata riscontrata in un altro paziente proveniente dalla provincia di Siracusa. In questo caso una glicina è sostituita da un acido glutammico a causa di una sostituzione G>A nell'esone 12. Anche questa mutazione interessa la regione di omologia al precursore dell'EGF (EGF Spacer) e consente un'attività del recettore difettivo del 5-15%.

Studi effettuati in altre regioni d'Europa hanno evidenziato che tale mutazione ha un'alta frequenza nell' Europa centrale (es. Polonia), ponendo il quesito della sua origine. Lo studio degli aplotipi potrebbe dare informazioni sull'origine di questa mutazione.

Invece in un paziente originario di Catania è stata identificata la mutazione Pisa (Ins 4bp 1646). In questa mutazione presente nell'esone 8, una inserzione di 4 basi altera il codice di lettura della restante parte della proteina facendo assumere alla stessa una conformazione non corretta che abolisce l'attività del recettore. Da notare che questa mutazione non era, finora, mai stata descritta in un paziente siciliano.

Di particolare interesse in due probandi non consanguinei è stata identificata la mutazione 1257 C>G (Y398X) dell'esone 9. Tale mutazione inserisce un codone di stop prematuro con conseguente sintesi da parte dell'allele mutato di una proteina recettoriale tronca e non funzionante. Nella stessa famiglia è stata trovata la mutazione per il gene PCSK9.



Rosso :c.1257C/G Y398X esone 9 LDL-R

Nero: PCSK9 (A/G N425S ex 8)

	AFFETTI/NON AFFETTI	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)
I:1	AFFETTO	385	144	34
II:1	AFFETTO	364	152	52
II:2	NON AFFETTO			
II:3	AFFETTO	310	89	50
II:4	NON AFFETTO	231	80	41
III:1	AFFETTO	301	54	60
III:2	NON AFFETTO	182	68	53

La mutazione dell'esone 8 (G352D) denominata Potenza- 2 è stata identificata in un altro probando.

Abbiamo inoltre identificato una mutazione missenso dell'esone 10, 1380 G>T (G440C), mai descritta in altri pazienti affetti da Ipercolesterolemia Familiare.

Infine, per i pazienti, scelti fra quelli già analizzati per l'eventuale presenza di mutazioni a livello del dominio di omologia al precursore dell' EGF e risultati privi di mutazioni sono stati sequenziati gli esoni che codificano per il dominio di legame (dall'esone 2 all'esone 6) e per quello transmembranario (esoni 16 e 17). Grazie al fatto che i primers utilizzati nella reazione polimerasica a catena (PCR) sono stati disegnati in modo da includere le regioni di confine esone-introne, è stata

evidenziata in una paziente una mutazione del gene del recettore delle LDL, non descritta in altre popolazioni, che interessa appunto il sito di splicing 3' dell'introne 16 (G>A a 2390-1).

Mutazioni diverse da quella da noi riscontrata ma che interessano questo sito di splicing sono state descritte da altri autori (6) e questo dato suggerisce che questa regione possa essere un hot-spot per mutazioni puntiformi. E' ipotizzabile che uno splicing errato comporti l'eliminazione dalla proteina della porzione intramembranaria non permettendo al recettore di ancorarsi alla membrana e di interagire con la clatrina e facendo sì, invece, che il recettore non possa dirigere l'endocitosi delle LDL.

Tutte le famiglie sono state studiate per il gene PCSK9, l'unica mutazione è stata identificata in una famiglia, già descritta in precedenza, nella quale erano presenti soggetti ipercolesterolemici senza mutazione per il gene LDLR.

Lo stesso è stato fatto per PCSK9 ed è stata scoperta la presenza di mutazione in una famiglia.

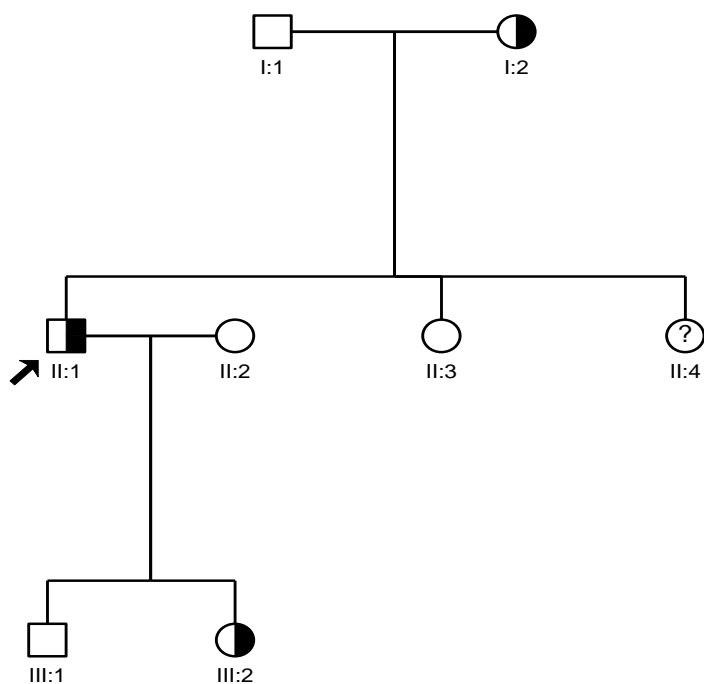
Per alcuni dei pazienti selezionati per questo studio, abbiamo avuto il consenso a condurre lo studio genetico anche sui parenti.

In 5 soggetti non è stata riscontrata nessuna mutazione nei geni esaminati.

Pertanto sono state sottoposte ad analisi le rispettive famiglie: A, B, G, D e I, i cui alberi sono stati descritti.

Pertanto si è proceduto con l'analisi di linkage mediante SNPs microarray, in modo da individuare nuovi loci contenenti geni potenzialmente implicati. Per effettuare tale analisi sono stati utilizzati i seguenti software: allegro e merlyn. Abbiamo ottenuto dei risultati interessanti solo per alcune famiglie, altre non sono risultate idonee, in quanto il numero dei componenti della famiglia era troppo piccolo.

Nella famiglia A è stato ottenuto un Lod score (LD) significativo sul cromosoma 19, in una regione compatibile con LDLR.



Fam A

	AFFETTI/NON AFFETTI	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)
I:1	NON AFFETTO	213	335	55
I:2	AFFETTO	258	152	64
II:1	AFFETTO	300	90	44
II:2	NON AFFETTO	207	63	50
II:3	NON AFFETTO	184	66	52
III:1	NON AFFETTO	179	51	57
III:2	AFFETTO	278	65	54

Per tale ragione si è deciso di ri-sequenziare il gene LDLR, che ad una prima analisi era stato escluso, e sul quale non è stata riscontrata nessuna mutazione.

In conclusione i risultati ottenuti utilizzando una strategia basata su Southern Blot e sequenza diretta del gene LDL-R, APOB e PCSK9 hanno incrementato la detection rate di mutazioni nella nostra popolazione dal 9.8 % al 55 %. Rimane, comunque, una grande percentuale che dovrebbe essere colmata mediante, il reclutamento di nuove famiglie, preferibilmente numerose, e l'utilizzo di metodologie innovative e di nuova generazione, quale exon sequencing. Tale strategia permetterebbe di identificare gli errori mendeliani dell'intero genoma in tempi e costi brevi.

I risultati ottenuti confermano l'eterogeneità della malattia in Sicilia e questo studio costituisce un punto di partenza per l'identificazione di possibili mutazioni specifiche del gene del recettore delle LDL nella nostra area geografica insulare correlabili con l'insorgenza con l'ipercolesterolemia familiare.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Schrott HG, Goldein JL, Hazzard WR, McGoodwin MM, Motulsky AG: Familial hypercholesterolemia in a large kindred. Evidence for a monogenic mechanism. *Ann Intern Med* 1:118,1972.
2. Khachadurian AK: A general review of clinical and laboratory features of familial hypercholesterolemia (type I hyperbeta-lipoproteinemia). *Protides Biol fluid* 19:315,1971.
3. Nevin NC, Slack J: hyperlipidaemic xanthomatosis. Mode of inheritance in 55 families with essential hyperlipidaemia and xanthomatosis. *J Med Genet* 5:9, 1968.
4. Haba T, Mabuchi H, Yoshimura A, Watanabe A, Wakasugi T, Tatami R, Ueda K, Ueda R, Kanetani L, Koizumi J, Miyamoto S, Takeda R, Takeshita H: Effect of ML-236B (compactin) on sterol synthesis and low density lipoprotein receptor activities in fibroblast in fibroblast of patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 67: 1532, 1981.
5. Khachadurian AK, Uthaman SM: Experience with homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 57 patients. *Nutr Metab* 15:135,1973.
6. Khachadurian AK: The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 37:402, 1964.
7. Bersot TP, Mahaley RW, Brown MS, Golstein JL: Interaction of swine lipoprotein with the low density lipoprotein receptor in human fibroblast. *J Biol Chem* 251:2395 1983.

8. Sirtori CR, Catapano AL, Franceschini G, Corsini A, Nosedà G, Fragiaco C, Panzeri E, Vaccarino V, Guenzi S, Casari G, Baralle F: Aortic and coronary atheromatosis in a woman with severe hypercholesterolemia without LDL receptor alteration. *Eur Heart J* 12:818, 1991.
9. Goldstein JL, Baus SK, Brown MS: Receptor-mediated endocytosis in cultured cells. *Method Enzimol* 98:241, 1983.
10. Tolleshaug H, Hobgood KK, Brown MS, Goldstein JL: The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupting the transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 32:941, 1983.
11. Kovanen PT, Biliheimer DW, Goldstein JL, Jaramillo JJ, Brown MS: Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptor *in vivo* in the dog. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1194, 1981.
12. Mountafis CD, Simon LA, Myant NB, Adams PW, Wynn V: The effect of cholestyramine on the faecal excretion of bile acids and neutral steroid in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 26:329, 1977.
13. Gotto AM Jr, Brown WV, Levy RI, Bibbaumer MI, Fredrickson DS: Evidence for the identity of the main apolipoprotein in low density and very low density lipoprotein in normal subject and patient with familial hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* 51:1486, 1972.

14. Jadhav AV, Thompon GR,: Reversible abnormalities of low density lipoprotein composition in familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest* 9:63, 1979.
15. Reichl D, Simons LA, Myant NB: The metabolism of low density lipoprotein in a patient with familial hyperbetalipoproteinemia. *Clin Sci Mol Med* 47:635, 1979.
16. Goldstein JL, Sobhani MK, Faust JR, Brown MS: Heterozygous familial hypercholesterolemia: failure of normal allele to compensate for mutant allele at a regulated gene locus. *Cell* 9:195, 1976.
17. Mancini M, Cortese C, Maciullo P, Gnasso A, Rubba P: *Iperlipidemie (Fisiologia, clinica, terapia); il Pensiero Scientifico Editore* 1991.
18. Cummings RD, Kornfeld S, Schnrider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL: Biosynthesis of the N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 258:15261, 1983.
19. Davis CG, Elhammer A, Russel DW, Schneider WJ, Korneld S, brown MS, Goldstein JL: Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblast. *J Biol Chem* 261:2828,1986.
20. Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS: Coated pits, coated vescicles, and receptor mediated endocytosis. *Nature* 279:679, 1979.
21. Helenius A, Mellman I, Wall D, Hubbard A: Endosome. *Tibs* 8:245, 1983

22. Brown MS, Anderson RGW, Goldstein JL: Recycling receptor: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32:663, 1983.
23. Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS: Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptor in human fibroblast. *Cell* 24:493, 1981.
24. Brown MS, Dana SE, and Goldstein JL: Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblast: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 1974, 249:789-796.
25. Brown MS, Dana SE, and Goldstein JL: Cholesterol ester formation in cultured fibroblast: stimulation by oxygenated sterol. *J. Biol. Chem.* 1975, 250:4025-4027.
26. Goldstein JL, Dana SE, and Brown MS: Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblast and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71:4288-4292.
27. Goldstein JL and Brown MS: Regulation of the low density lipoprotein receptor in human fibroblast. *Cell* 1975, 6:307-316.
28. Goldstein JL and Brown MS: Atherosclerosis: the low density lipoprotein receptor hypothesis, *Metabolism*: 26(11):1257-75.
29. Schneider WL, Brown MS, Goldstein JL: Kinetic defects in the processing of the low density lipoprotein receptor in fibroblast from

WHHL rebbith and a family with familial hypercholesterolemia. *Mol Biol Med* 1:353-67.

30. Bieri S, Djordjevic JT, Dali N, Smith R & Kroon PA. *Biochemistry* 34, 13059-13065 (1995).

31. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russel DW & Schneider WJ. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1,1-39 1985.

32. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahaley RW & Agard DA. *Sciende* 252, 1817-1822 (1991).

33. Schneider WJ, Beisiegel U, Schneider WJ. *J. Biol. Chem.* 257, 2664-2673 (1982).

34. Russel DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey WJ, Brown MS, Goldstein JL. Domain map of tha LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell* 37:577-85, 1984.

35. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML et al. The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with a multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39:27-38 1984.

36. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russel DW. The LDL receptor gene: A mosaic of exon shared with a different protein. *Science* 228:815-22 1985.

37. Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H ea al.: Biosynthesis of the N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 258:15261-73 1983.

38. Sabatini DD, Kriebich G, Morimoto T, Adesnik M: Mechanism for the incorporation of protein in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* 92:1-12 1982.
39. Lehrman MA, Goldstein JL, Brown MS, Russel DW, schneider WL, 1985. Internalization defective LDL receptor produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell.* 41(3)735-43.
40. Franke U, Brown MS, Goldstein JL 1984 : Assignment of the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: Synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2826-30.
41. Brown MS and JI Goldstain. The SRBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, Vol 89, 331-340, 1997.
42. A cholesterol mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34, 1986.
43. tolleshaug H, Goldstein JL, Schneider Wj, Brown MS: Posttraslational processing of the LDL receptor and its gene disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell* 30: 715, 1982.
44. Pathak RK, Merkle RK, Cummings RD, Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW: Immunocytochemical localization of mutant low density pipoprotein receptor that fail to reach the Golgi complex. *J Cell Biol* 106:1831, 1988.
45. Esser V, Russel DW: Transport-deficient mutation in the low density lipoprotein receptor: alterations in the cystein rich and cysteine

poor regions of the protein block intracellular transport. *J Biol Chem.* 263: 13276, 1988.

46. Hobbs H H et al : Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of LDL receptor alters its binding specificity. *J Biol Chem* 261:13114, 1986.

47. Goldstain et al., Chapter.120 Familial Hypercholesterolemia

48. Goldstain et al., receptor mediated endocytosis, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:1, 1985.

49. Goldstain JL et al. : Coated pits, coated vesicle and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279:679, 1979.

50. Davis CG et al., Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region, *Nature* 326:23, 1987.

51. Koivisto U et al., A single base substitution in the proximal Sp1 site of the human low density lipoprotein promoter as a cause of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10526-10530, 1994.

52. Koivisto U et al., A novel cellular phenotype for Familial Hypercholesterolemia due to a defect in polarized Targeting of LDL Receptor, *Cell* 105:575-585, 2001

53. Lehrman Ma et al., Alu-Alu recombination deletes splice acceptor site and produces secreted LDL receptor in a subject with familial hypercholesterolemia. *J. Biol Chem.* 262: 3354, 1987.

54. Boren J. et al., The molecular Mechanism for the Genetic Disorder Familial Defective Apolipoprotein B100, *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 2001.
55. Wilson DJ, Gahan M, Haddad L, Healt K, Whittall RA, Williams RR, Humphries SE, Day IN. A World Wide Web site for low density lipoprotein receptor gene mutations in familial Hypercholesterolemia: sequence based, tabular, and direct submission data handling. *Am J Cardiol* 1998;81(12):1509-1511.
56. Leren TP, Tonstad S, Gundersen KE, Bakken KS, Rodninger OK, Sundvold H, Ose L, Berg K. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Norway. *J Intern Med*. 1997; 241: 185-194.
57. Kotze MJ, Langenhoven E, Kriek JA, Oosthuizen CJ, Retief AE. DNA screening of hyperlipidemic Africaner for familial Hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 1992;42(1):43-46
58. Bertolini, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Per G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghibellini M, Rabbone I, Calandra S. Clinical expression of Familial Hypercholesterolemia in cluster of mutations of the LDL receptor gene that Cause a Receptor Detective or Receptor Negative Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;20:e41-e52.
59. Liquori R, Bianco AM, Argiriou A, Pauciullo P, Giannino A, Rubba P, De Simone V. LDL receptor cDNA sequence analysis in familial hypercholesterolemia patients: 5 novel mutations with higt

prevalence in families originating from southern Italy. *Hum Mutat* 2001;17(5):433.

60. Cefalù AB, Emanuele G, Marino G, Fiore B, Caldarella R, Vivona N, Noto D, Barbagallo C, Costa S, Gueli MC, Bertolini S, Notarbartolo A, Travali S, Averna M: Effectiveness of screening for known mutations in Sicilian patient with “probable” Familial Hypercholesterolemia. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease*, 11(6):394-400, 2001.

61. Roschlau P. Enzymatische bestimmung des gesamte-cholesterins in serum. *Chem klein biochem* 1974; 12:226-227.

62. Wahalefeld AW. Triglyceride determination after enzymatic hydrolysis, in *Metod of enzymatic analysis*, edited by Bergmeyer HU, New York, Academic Press. 1974; 4:1831-1835.

63. lopez-virella HF, Stone P, Ellis J, Coltwell LA: Cholesterol determination in the HDL separated by precepitation with polianions. *J Lipid Res* 1970; 11:583-595.

64. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

65. Bertolini S, Lelli N, Coviello DA, Ghisellini M, Masturzo P, Tiozzo R, Elicio N, Gaddi A and Calandra S. A large deletion in the LDL receptor gene-the cause of familial hypercholesterolemia in three italian families: a study that dates back to the 17th century (fh Pavia). *Ann. J. Hum. Genet.* 51:123-124, 1992.

66. Hansen PS, Rudiger N, Tybjarg-Hansen A, Faergeman O, Gregersen N: Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J. Lipid. Res.* 1991,32:1229-1233.
67. Cenarro et al. 1998, *Hum. Mut* 11:413.

