



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti

DOTTORATO DI RICERCA IN:

FISIOPATOLOGIA DEL METABOLISMO: LIPIDI E LIPOPROTEINE
XXII CICLO

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

*Una nuova strategia ipocolesterolemizzante: ruolo del
peptide EGF-A nell'inibizione in vitro dell'attività
catalitica del mutante PCSK9-D374Y*

Dottorando

Dott.ssa Mariangela Ditta

Coordinatore

Ch.mo Prof. M. Averna

Tutor

Dott. A. B. Cefalù

SSD MED/09

A.A. 2010/2011

Indice

Introduzione

1. Le Ipercolesterolemie Familiari: forme dominanti e recessive	pag.2
2. Ipercolesterolemia Familiare di Tipo 1 (FH-1)	pag.4
2.1 Regolazione genica del recettore delle LDL (LDL-R)	pag.4
2.2 Struttura e funzione del recettore delle LDL	pag.6
2.3 Mutazioni nel gene del recettore delle LDL e FH-1	pag.9
3. Ipercolesterolemia Familiare da difetto di ApoB-100 (FH-2)	pag.12
4. Ipercolesterolemia Familiare di tipo 3 (FH-3 o ADH3)	pag.13
4.1 Il gene PCSK9: struttura e regolazione	pag.13
4.2 Ruolo di PCSK9 nella regolazione dei livelli di LDL-C	pag.16
4.3 Mutazioni “loss of function” e “gain of function” nel gene PCSK9	pag.18
4.4 Modalità di interazione di PCSK9 con il recettore LDL-R	pag.22
Obiettivi	pag.26

Materiali e Metodi

1. Sintesi del cDNA umano full-length di PCSK9	pag.29
1.1 Colture cellulari di HepG2	pag.29
1.2 Estrazione dell'RNA totale	pag.29
1.3 RT-PCR	pag.30
1.4 Long PCR	pag.30
1.5 Purificazione del prodotto di PCR	pag.32
1.6 Sequenza diretta	pag.32
2. Clonaggio del cDNA di PCSK9 in un vettore di espressione	pag.33
2.1 Caratteristiche del vettore di espressione pCMV-3TAG-8	pag.33
2.2 Digestione con enzimi di restrizione e purificazione diretta dei prodotti di digestione	pag.34
2.3 Reazione di legame e trasformazione di cellule batteriche	pag.35
2.4 Analisi dei ricombinanti: minipreparazioni di plasmidi	pag.35
2.5 Preparazione di DNA plasmidico (Maxi Prep)	pag.35
2.6 Mutagenesi in situ	pag.36
3. Esperimenti di Western-Blot su lisati cellulari di HepG2 e HuH7	pag.37

3.1 Colture cellulari di HepG2 e HuH7	pag.37
3.2 Trasfezioni transienti	pag.38
3.3 Esperimenti di Western-Blot	pag.39
4. Esperimento di internalizzazione delle LDL in HepG2 e HuH7	pag.40
4.1 Isolamento delle LDL e marcatura con il Dil	pag.40
4.2 Internalizzazione delle LDL-Dil	pag.41
4.3 Statistica	pag.42
Risultati	
1.Risultati e Discussione	pag.44
1.1 Sintesi del cDNA full-length di PCSK9 e clonaggio nel vettore pCMV-3Tag-8	pag.44
1.2 Mutagenesi in situ per la costruzione del vettore di espressione pCMV-3Tag-8PCSK9 con mutazione D374Y	pag.46
1.3 Trasfezioni transienti di pCMV-3tag-8PCSK9-D374Y in HepG2 e HuH7	pag.47
1.4 Valutazione dell' internalizzazione delle LDL-Dil in HepG2 e HuH7	pag.50
Conclusioni	pag.54
Bibliografia	pag.57

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;

2. Ipercolesterolemia Familiare di Tipo 1 (FH-1)

2.1 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).

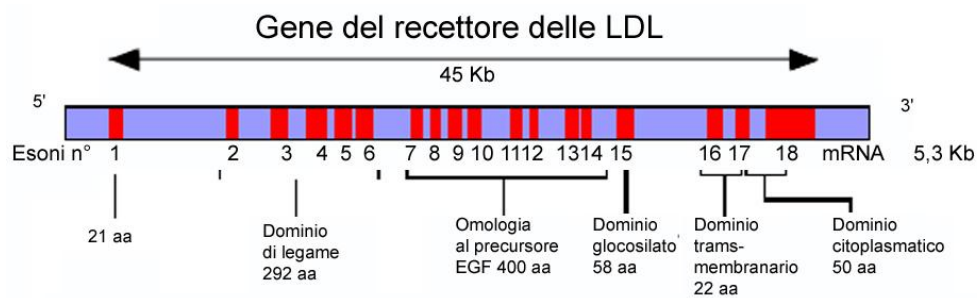


Fig.1: Struttura del gene che codifica per il recettore delle LDL

L'eson 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'eson 15 codifica per i 58 aminoacidi che costituiscono il terzo dominio ed includono i siti di legame per le catene glucosidiche O-legate. L'eson 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-zip per 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 consecutivi eventi di clivaggio proteolitico: il primo nel loop luminale 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).

2.2 Struttura e funzione del recettore delle LDL

Il recettore delle LDL è composto da una singola catena polipeptidica di 839 aminoacidi che si struttura in cinque domini (Fig.2).

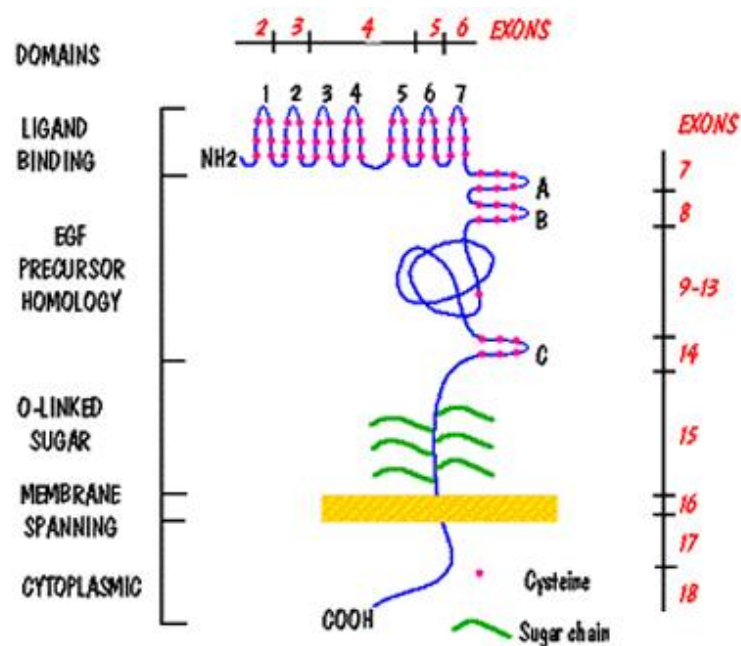


Fig.2: Struttura della proteina LDL-R

L'estremo NH₂-terminale del recettore delle LDL consta di una sequenza idrofobica segnale per il RER di 21 aminoacidi.

La porzione N-terminale (i primi 292 residui aminoacidici) costituisce il dominio di legame al ligando ed è particolarmente ricca in cisteina. Questo dominio è localizzato sulla superficie esterna della membrana plasmatica 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 si 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*).

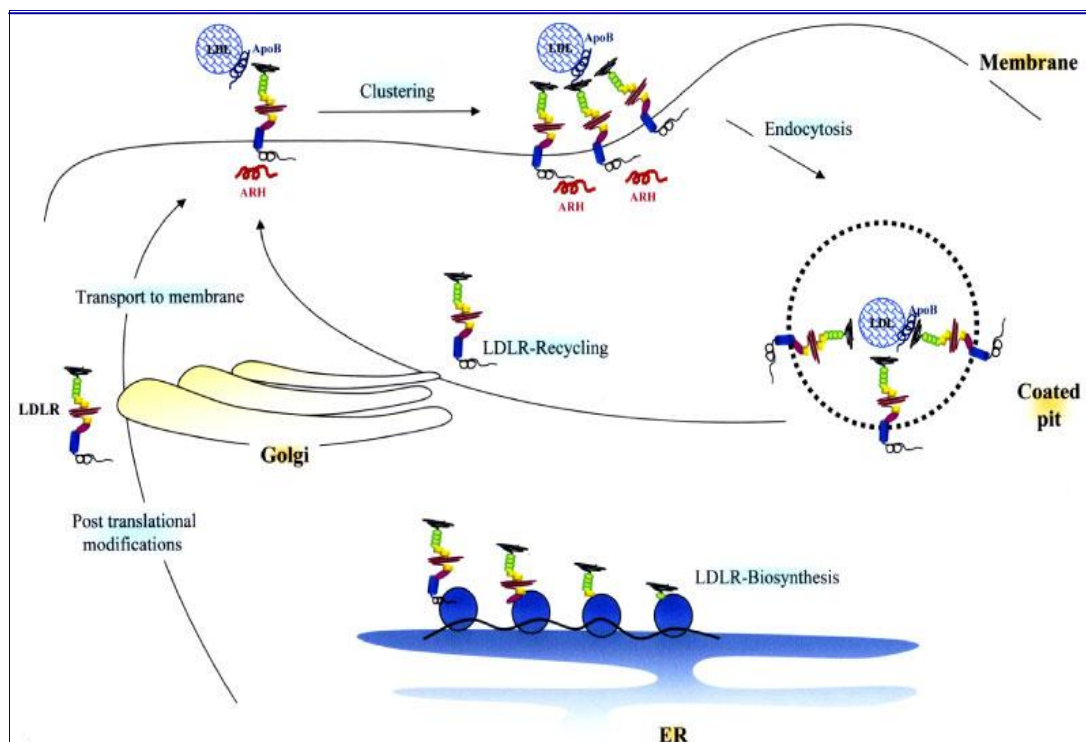


Fig.3: Rappresentazione schematica del recycling del recettore delle LDL

2.3 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 Ashkenazi 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.

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 al., 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.

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

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.

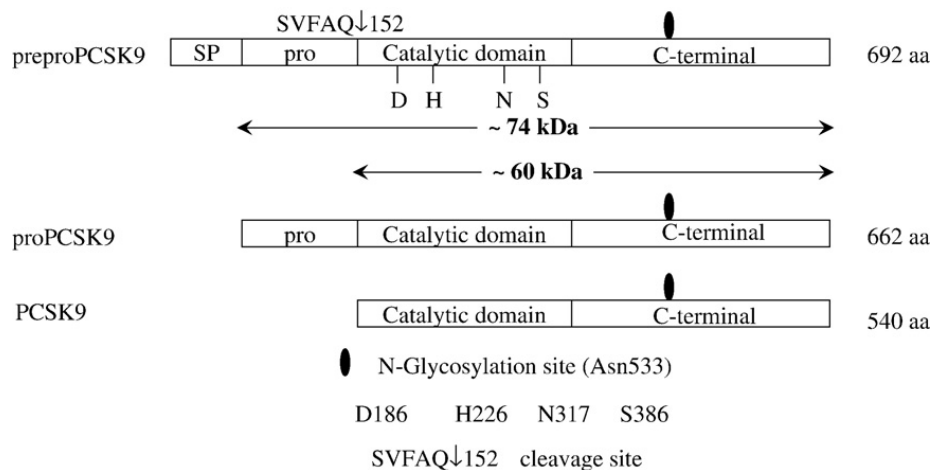


Fig.4: Rappresentazione schematica dei domini proteici di PCSK9

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 colesterogenici, 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 colesterogenici.

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-idrossi-3methylglutaryl-coenzima 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*).

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

PCSK9 è una proteina 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)

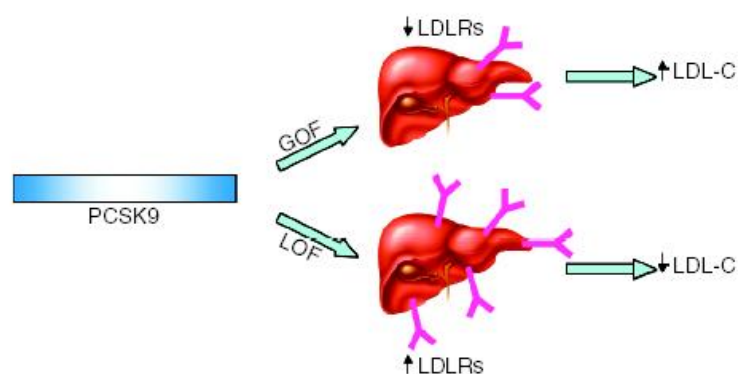


Fig.5: Mutazioni Gain of function (GOF) e Loss of function (LOS) di PCSK9

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).

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'augmentata 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 Ipobetalipoproteinemia 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).

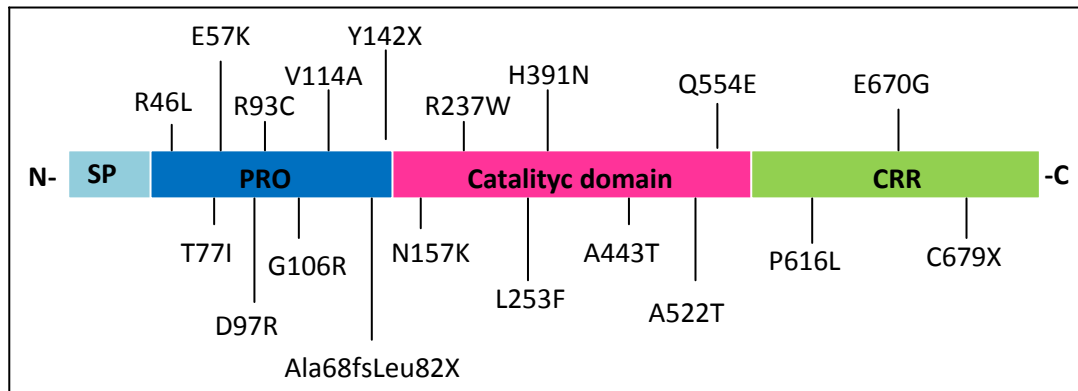


Fig.6: Mutazioni missenso e nonsense "Loss of function" (LOF) di PCSK9

• 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. (Abifandel 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).

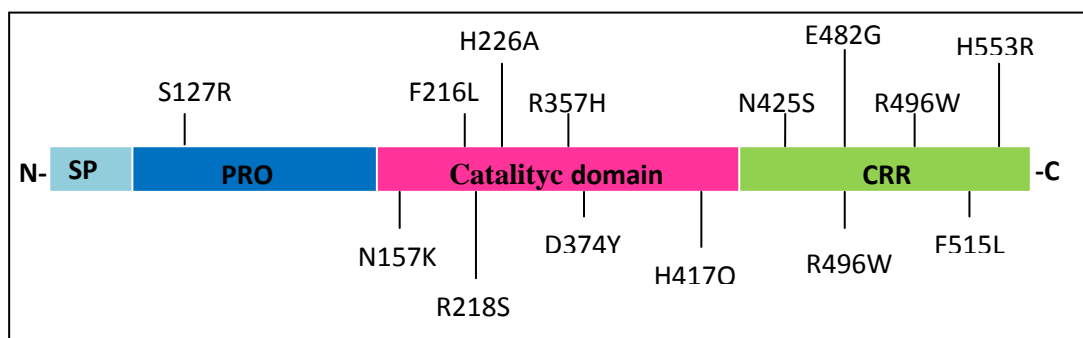


Fig.7: Mutazioni missenso "Gain of function" (GOF) di PCSK9

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).

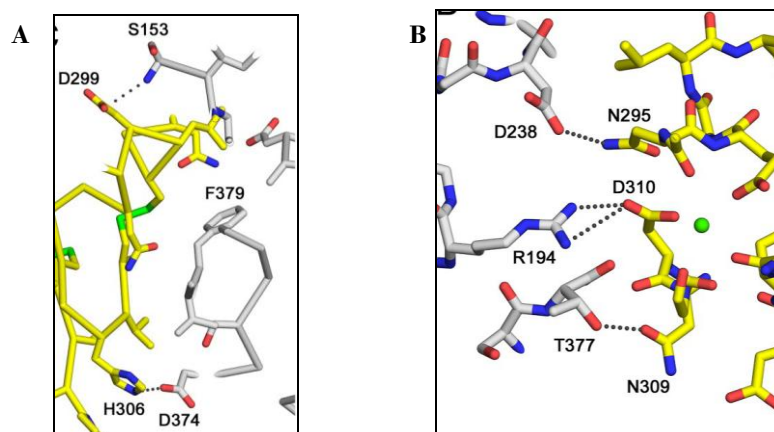


Fig.8: Residui aminoacidici coinvolti nelle interazioni molecolari PCSK9/LDL-R

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).

Obiettivi

Scopo dello studio

Gli studi sperimentali, pubblicati negli ultimi anni, dimostrano l'importante ruolo della proteasi PCSK9 come fattore implicato nella regolazione del metabolismo lipidico. PCSK9 regola direttamente i livelli di LDL-C plasmatici, modulando l'espressione della proteina LDL-R sulla superficie cellulare, attraverso interazioni molecolari sito-specifiche che avvengono tra la regione N-terminale del proprio sito catalitico e il dominio EGF-A dell'LDL-R.

Osservazioni provenienti da studi presenti in letteratura, dimostrano che sia mutazioni nel dominio EGF-A del recettore che nei domini funzionali di PCSK9 possono aumentare o ridurre l'affinità di legame tra le due proteine, comportando nel primo caso un aumento della degradazione del recettore con conseguente fenotipo ipercolesterolemico, nel secondo caso una ridotta degradazione dell'LDL-R e quindi un fenotipo ipocolesterolemico.

Mutazioni con guadagno di funzione "gain of function" di PCSK9 sono state strettamente associate con un fenotipo ipercolesterolemico. In particolare, studi in vitro e in vivo, hanno evidenziato il forte effetto ipercolesterolemizzante della variante PCSK9-D374Y, responsabile di una drastica riduzione dell'espressione della proteina LDL-R con conseguente incremento dei livelli di LDL plasmatiche. La necessità di sviluppare, quindi, terapie farmacologiche sempre più mirate e specifiche per il trattamento dell'ipercolesterolemia e dell'aterosclerosi, ha condotto, negli ultimi anni, alla ricerca di molecole farmacologiche che abbiano come target molecolare proprio la proteina PCSK9, considerato che alterazioni funzionali della stessa possono condurre ad un fenotipo ipercolesterolemico.

A tal proposito, lo scopo dello studio descritto in questa tesi è stato quello di analizzare in vitro, su linee cellulari di HepG2 e HuH7, l'efficacia del peptide sintetico EGF-A nell'inibire l'attività proteolitica del mutante PCSK9-D374Y e testare, quindi, il possibile ruolo farmacologico di questa molecola per lo sviluppo, in futuro, di un trattamento mirato per la cura dell'ipercolesterolemia.

Materiali e Metodi

1. Sintesi del cDNA umano full-length di PCSK9

1.1 Colture cellulari di HepG2

Le cellule HepG2 (una linea cellulare derivata da un carcinoma epatico umano), sono state coltivate in fiasche da 25 cm² in terreno D-MEM-glutamax (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) con siero bovino fetale (FCS) al 10%, penicillina e streptomicina alla concentrazione di 100 UI/ml, aminoacidi non essenziali all'1%, a 37°C in ambiente saturo al 5% di CO₂.

1.2 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule HepG2 utilizzando un kit commerciale di estrazione (RNAwiz™, Ambion). Alle cellule in coltura si aggiunge la soluzione di lisi RNAwiz™ Reagent contenente guanidinio isotiocianato che oltre a lisare le cellule denatura l'RNasi impedendo così la degradazione dell'RNA. Il campione viene omogeneizzato per disaggregare e lisare completamente le cellule. Successivamente si aggiunge cloroformio in ambiente acido (pH 4) per eliminare le membrane, le proteine ed il DNA. Si lascia 15 min. in ghiaccio e successivamente si centrifuga a 12000 RPM per 10 min. a 4°C.

La fase acquosa sovrastante viene prelevata senza rimuovere la pellicola di proteine e DNA che si è formata all'interfaccia. Nella fase acquosa è presente solo l'RNA che viene precipitato a freddo (-20°C) aggiungendo 1 volume di isopropanolo e lasciando decantare per almeno 10 min. (più lungo è questo tempo tanto maggiore è la resa finale di RNA). Si centrifuga a 10000 rpm per 15 min. a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante si rimuovono i sali aggiungendo 1 ml di etanolo al 75%, centrifugando nuovamente e rimuovendo il surnatante. Il precipitato viene asciugato all'aria per eliminare ogni traccia di etanolo e viene quindi solubilizzato in H₂O sterile. La quantità di RNA ottenuto viene determinata mediante una misura spettrofotometrica effettuata a 260 nm.

1.3 RT-PCR

L'RNA estratto è stato successivamente retrotrascritto mediante RT (Reverse Transcriptase). Tale metodica sfrutta la reazione di polimerizzazione, catalizzata dall'enzima Trascrittasi Inversa (RT), una DNA polimerasi RNA-dipendente, che consente di ottenere da una molecola di RNA, utilizzata come stampo, una molecola di cDNA. La reazione di retrotrascrizione è caratterizzata da due fasi:

- la prima fase, denominata di *denaturazione*, in cui l'RNA stampo (1 µg), oligo-dT (20 pmoli) e H₂O (fino ad un volume finale di 5 µl) vengono incubati per 5 min a 70° C, 5 min a 4° C e 5 min in ghiaccio;
- la seconda fase, che rappresenta la vera e propria *reazione d'amplificazione*, in cui al mix di denaturazione vengono aggiunti i reagenti mancanti, affinché tale reazione avvenga: Buffer (5x); dNTPs (2,5 mM ciascuno); MgCl₂, cofattore dell'enzima, (3 mM); l'enzima RT (ImProm-IITM); l'RNAsi inibitor, che impedirà la degradazione dell'RNA ed H₂O.

Profilo termico :	
25°C 5'	1 ciclo
48°C 60'	1 ciclo
70°C 15'	1 ciclo

Tab.1: Profilo termico della RT-PCR

1.4 Long PCR

Il cDNA full-length di PCSK9 (2076 bp) da clonare, è stato amplificato utilizzando la Taq Expand, una polimerasi caratterizzata da una elevata fedeltà di incorporazione e attività di proofreading in 3'-5', in grado di amplificare frammenti di DNA più lunghi di 20 Kb (Expand 20 Kb plus PCR System, Roche).

Oltre al cDNA utilizzato come stampo, sono necessari i seguenti reagenti:

Buffer (10x); dNTPs (2,5 mM ciascuno); primer 5' (10 pmoli); primer 3' (10 pmoli); Taq polimerasi (5U) (Expand 20 Kb PLUS PCR System, Roche) ed H₂O (fino ad un volume finale di 50 µl).

Primer 5': GCAAGCTTATGGGCACCGTCAGCTCCAG

Primer 3': CACTCGAGCTGGAGCTCCTGGGAGGCCT

La Long PCR è caratterizzata sempre da tre step termici (denaturazione–ibridazione–amplificazione) e l'unico elemento che la differenzia, rispetto ad una PCR tradizionale, è l'elevato numero di cicli per consentire l'amplificazione di lunghi frammenti di DNA.

Profilo termico :	
92°C 5'	1 ciclo
92°C 90"	10 cicli
65 °C 1'	
68°C 2'	
92°C 90"	20 cicli
65 °C 1'	
68°C 2' + 10"/ciclo	
68°C 10'	1 ciclo

Tab.2: Profilo termico della Long PCR

1.5 Purificazione del prodotto di PCR

Il prodotto della long PCR è stato purificato mediante elettroforesi in gel di agarosio Low Melting Point 1% e successivamente eluito dal gel con H₂O mQ (30µl) attraverso purificazione su colonna (PCR preps DNA purification kit - Promega). La quantità di prodotto ottenuto è stata determinata mediante una misura spettrofotometrica effettuata a 260 nm.

1.6 Sequenza diretta

L'intero prodotto amplificato e purificato è stato analizzato mediante sequenza diretta per verificare il corretto incorporamento dei nucleotidi durante la fase di amplificazione.

La procedura di sequenza, ormai effettuata quasi sempre con metodi automatizzati, consta di una prima fase di preparazione della opportuna reazione di sequenza da amplificare in un comune termociclatore, di una seconda fase di purificazione del prodotto ottenuto e di una terza fase in cui il prodotto purificato viene caricato in un sequenziatore automatico per l'analisi finale.

La reazione di sequenza necessita: del prodotto purificato come stampo di DNA, la cui quantità generalmente varia in dipendenza delle dimensioni del frammento da sequenziare (10ng di stampo ogni 100bp di templatato); di uno dei due primers specifici per lo stampo in analisi (solitamente 3,2pM di primer senso), di 8µl di Big Dye Terminator v 1.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems), contenente deossinucleotidi, dideoossinucleotidi marcati, buffer e taq polimerasi, e di una quantità variabile di H₂O per portare la reazione ad un volume finale di 20 µl.

Profilo termico :	
96°C 10"	25 cicli
50°C 5"	
60°C 4'	

Tab.3: Profilo termico della reazione di sequenza

Successivamente, il prodotto ottenuto è stato purificato mediante l'impiego di una colonnina contenente resina Sephadex G-50 (Pharmacia), di cui 5 μ l opportunamente diluiti in H₂O (15 μ l), sono stati caricati nel sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems) e sottoposti ad elettroforesi capillare per 56 minuti [10 minuti di riempimento del capillare con polimero, 10 minuti di precorsa a 6-10mA (corrente costante) e 36 minuti l'elettroforesi a 6-10 mA]. L'analisi del dato grezzo è stata eseguita usando il programma Sequencing Analysis 3.4.1; il successivo confronto con le sequenze in banca dati è stato eseguito con il programma Sequence Navigator .

2. Clonaggio del cDNA di PCSK9 in un vettore di espressione

2.1 Caratteristiche del Vettore di espressione pCMV-3TAG-8

Il vettore di espressione scelto per clonare il cDNA full-length di PCSK9 è il pCMV-3TAG-8 (Stratagene) (Fig.9). Tale vettore, lungo 5,2 Kb, deriva dal vettore pCMV-Script e caratteristica particolare è che contiene delle sequenze codificanti 3 copie di uno specifico epitopo o FLAG nella regione carbossiterminale dell'inserto clonato.

Questo epitopo sintetico detto FLAG, è una piccola tag costituita da otto residui aminoacidici (DYKDDDDK), altamente immunoreattiva ma non interferisce con la funzione della proteina target. La presenza di tre copie dell'epitopo in ciascun vettore consente una migliore detection e caratterizzazione della proteina di fusione.

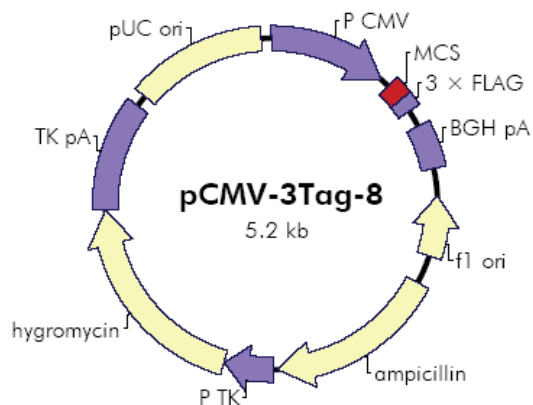
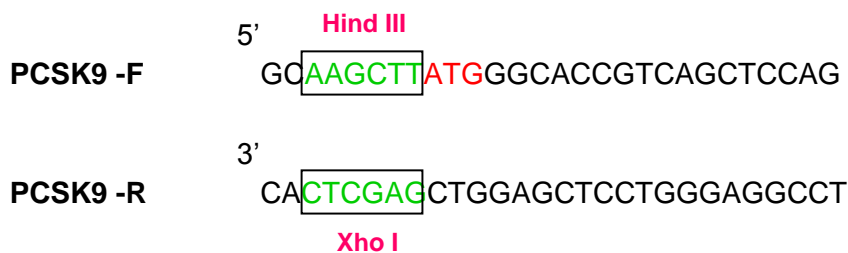


Fig. 9: Mappa del vettore pCMV-3Tag-8

Oltre alla sequenza FLAG, il vettore contiene anche: un promotore del citomegalovirus (CMV) che permette l'espressione costitutiva dell'inserto clonato in molte linee cellulari; un marcatore selettivo per l'Ampicillina (Amp^R) e un marcatore selettivo per l'Igromicina per la selezione in linee cellulari di mammifero; un'origine di replicazione derivante dal plasmide pUC che permette la trascrizione del costrutto in cellule E.Coli (JM109); un'origine di replicazione f1; i promotori T3 e T7 ed un sito di legame per il ribosoma (RBS) che consentono la trascrizione e traduzione; un segnale di poliadenilazione del Bovine Growth Hormone (BGH) e una sequenza di terminazione della trascrizione che incrementano la stabilità di mRNA; e un sito polylinker, riconosciuto da diversi enzimi di restrizione (MCS).

Per potere inserire in maniera orientata il frammento amplificato nel vettore di espressione pCMV-3Tag-8, sono stati disegnati i primer in modo tale da introdurre due siti di restrizione diversi nelle porzioni 5' e 3' (rispettivamente HindIII e XhoI).



2.2 Digestione con enzimi di restrizione e purificazione diretta dei prodotti di digestione

L'inserto, precedentemente amplificato, e il vettore plasmidico sono stati digeriti con gli opportuni enzimi di restrizione (Hind III e XhoI) nelle condizioni consigliate dalla ditta fornitrice (Fermentas; in genere 1-5 unità di enzima per 1µg di DNA per circa 2 ore a 37°C). I prodotti di digestione sono stati purificati direttamente su colonna (PCR preps DNA purification kit - Promega), risospesi in acqua mQ e analizzati allo spettrofotometro (260nm).

2.3 Reazione di legame e trasformazione di cellule batteriche

Dopo la digestione enzimatica, il vettore plasmidico e l'inserto sono stati incubati nel rapporto molare di 1:3 in Buffer 1x di legame (Promega) in presenza di 1 unità di enzima T4 DNA ligasi (Promega) a 4°C O.N.

Per la trasformazione, la miscela di legame (5µl) è stata incubata con (50µl) la sospensione di cellule supercompetenti di E. Coli JM109 (Promega) per 20' in ghiaccio, poi per 45-50 sec a 42°C e nuovamente in ghiaccio per 2'; quindi sono stati aggiunti 950 µl di terreno LB incubato a 37°C per 1 h in agitazione alla velocità di 150 rpm. In seguito la sospensione è stata piastrata su terreno di coltura LB-agar (37g/l) a cui è stata aggiunta l'ampicillina (ad una concentrazione finale di 100 µg/ml). Le piastre sono state incubate a 37°C O.N.

2.4 Analisi dei ricombinanti: minipreparazioni di plasmidi

Ciascuna colonia batterica isolata è stata amplificata singolarmente in 5ml di terreno LB contenente ampicillina (100 mg/ml) per una notte a 37°C, in agitazione alla velocità di 250 rpm. Da ogni coltura batterica è stata eseguita una minipreparazione del DNA plasmidico utilizzando un kit commerciale (Minipreps DNA purification kit – Promega). Il DNA plasmidico ottenuto, è stato digerito con gli opportuni enzimi di restrizione (Hind III e XhoI) ed analizzato su gel di agarosio. L'analisi di restrizione è servita per valutare la corretta inserzione del frammento che è stata poi confermata tramite sequenziamento.

2.5 Preparazione di DNA plasmidico (Maxi Prep)

Una volta identificati i cloni ricombinanti di nostro interesse, è stata fatta una maxipreparazione del DNA utilizzando un metodo commerciale (Qiagen Plasmid maxi Kit). Per ulteriore conferma è stata condotta sulle maxi ottenute, un'analisi per digestione e per sequenziamento.

2.6 Mutagenesi in situ

Il vettore plasmidico ,contenente l'inserto di interesse wild-type, è stato sottoposto ad una amplificazione mediante PCR, allo scopo di introdurre in vitro la sostituzione G/T c.1364 per riprodurre la mutazione D374Y.

Per tale reazione sono stati impiegati i seguenti reagenti appartenenti al Kit commerciale QuickChange Site Directed Mutagenesis: 5 µl di Buffer 10x, 1 µl di dNTPS mix, 3 µl di QuickSolution, 125 ng di primer Forward, 125 ng di primer reverse, 2,5U di PfuUltra HF Dna Polimerasi, H₂O fino ad un volume finale di 50 µl.

La mutagenesi è stata effettuata impiegando specifici primers uguali e complementari fra loro con il cambio nucleotidico da introdurre in posizione centrale (c.1364G/T).

PCSK9-D374Y_ F GGTGCCTCCAGCTACTGCAGCACCTG
PCSK9-D374Y_ R CAGGTGCTGCAGTAGCTGGAGGCACC

Profilo termico	
95°C 1'	1 ciclo
95°C 50"	18 cicli
60°C 50"	
68°C 6'	
68°C 7'	1 ciclo

Tab.4:Profilo termico della reazione di mutagenesi

Il prodotto ottenuto è stato digerito con l'enzima Dpn I a 37° per 1h allo scopo di digerire il DNA parenterale metilato e semimetilato.

La trasformazione è stata effettuata usando una sospensione di cellule supercompetenti di QXL-10 (Stratagene) e di β-mercaptoetanololo incubata per 10'

in ghiaccio; successivamente sono stati aggiunti alla miscela 2 μ l di prodotto di PCR digerito con DpnI e il tutto è stato incubato in ghiaccio per 30', poi per 45''-50'' a 42°C e nuovamente in ghiaccio per 2'; quindi sono stati aggiunti 500 μ l di terreno LB ed il tutto è stato ulteriormente incubato a 37°C per 1 h in agitazione alla velocità di 250 rpm. In seguito la sospensione è stata piastrata su terreno di coltura LB-agar (37g/l) a cui è stata aggiunta l'ampicillina (ad una concentrazione finale di 100 μ g/ml). Le piastre sono state incubate a 37°C O.N.

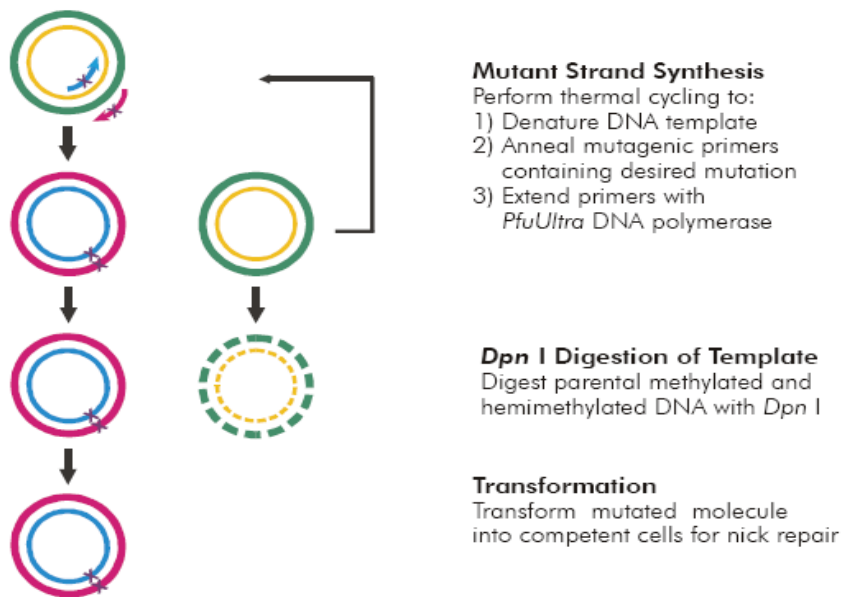


Fig. 10: Rappresentazione grafica del processo di Mutagenesi.

Le colonie ottenute sono state sottoposte a sequenziamento allo scopo di verificare l'esattezza del cambio introdotto.

3. Esperimenti di Western-Blot su lisati cellulari di HepG2 e HuH7

3.1 Colture cellulari di HepG2 e HuH7

Le cellule HepG2 e HuH7 (cellule di carcinoma epatico umano) sono state coltivate separatamente in fiaschette da 25 cm² in terreno DMEM, siero bovino fetale (FBS) al 10%, penicillina e streptomina (100 UI/ml), aminoacidi non essenziali all'1%, a 37°C in ambiente saturo al 5% di CO₂.

3.2 Trasfezioni transienti

Le cellule HepG2 e HuH7 (2.0×10^5 cellule/well) sono state piastrate 24h prima della trasfezione in una piastra da 24 wells (1.9 cm^2 well) in 0,5 ml di terreno DMEM-FCS 10% e trasfettate con il reagente *Lipofectamine 2000* (Invitrogen).

Tutti gli esperimenti di trasfezione sono stati effettuati utilizzando un rapporto DNA plasmidico:Lipofectamine di 1:2,5 ovvero 0.8 μg di DNA plasmidico: 2 μl di Lipofectamine. È stata creata una miscela costituita da 2 μl /well di Lipofectamine e 50 μl /well di OPTIMEM-I, che è stata incubata a temperatura ambiente per 5 min. Successivamente sono stati aggiunti 0,8 μg /well del vettore pCMV-3Tag8-D374Y precedentemente diluiti in 50 μl /well di OPTIMEM-I ed incubati a temperatura ambiente per 20 min. Il plasmide risospeso in Lipofectamine/OPTIMEM-I è stato aggiunto goccia a goccia alle cellule in coltura. Lo stesso protocollo è stato eseguito utilizzando il vettore pCMV-3Tag8-empty come controllo.

A 30h dalla trasfezione, alle cellule in coltura è stato aggiunto, sostituendo prima il mezzo con D-MEM serum-free, il peptide EGF-A a concentrazioni crescenti (12,5 μM , 25 μM e 50 μM).

Il peptide sintetico EGF-A, è un peptide di 40 aminoacidi, corrispondente alla porzione del dominio EGF-A del recettore LDLR umano (TNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCED).

E' stato sintetizzato dalla GenScript Corporation, U.S.A e la sequenza e la purezza del prodotto sono state confermate in HPLC e con spettrometria di massa.

A 48h dalla trasfezione le cellule sono state lavate due volte con 500 μl di PBS 1x, staccate dal pozzo mediante rimozione meccanica, risospese in PBS e centrifugate per 5' a 3000 rpm, lisate con RIPA buffer [NaCl 150 mM, 1% NP40, 0,5% Na-deossicolato, 0,1% SDS, 50mM TRIS ph 8, cocktail antiproteasico (Roche)] ed infine centrifugate in centrifuga refrigerata per 20' a 12.000 rpm.

La quantificazione delle proteine è stata effettuata mediante saggio Lowry (metodo colorimetrico) e lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda d'eccitazione di 660 nm (Biophotometer- Eppendorf).

3.3 Esperimenti di Western-Blot

La degradazione dell'LDL-R mediata dal mutante PCSK9-D374Y e il conseguente effetto del peptide EGFA è stata valutata con Western-blotting sia sui lisati cellulari di HepG2 che di HuH7.

L'analisi è stata effettuata caricando 20µg di lisati totali di ciascun campione, trattate precedentemente con Sample Buffer non riducente (1:1) e DTT (0,3 µl/10 µl), su un gel di poliacrilamide denaturante al 10% (SDS-PAGE), successivamente sottoposto a corsa elettroforetica per 42' a 200W in presenza di Running Buffer 1x (Running Buffer 10x, SDS1%, acqua distillata).

Dopo la prima corsa elettroforetica, le proteine migrate nel gel in base al loro peso molecolare, sono state trasferite su una membrana in PVDF (polivinildienedifluoride). La corsa di trasferimento, della durata di 1h e 30' e a 130W, è stata effettuata in Buffer di trasferimento (10% tampone di scorrimento, 20% metanolo, 70% acqua distillata).

Terminato il trasferimento, la membrana è stata incubata in agitazione per 2h a 4°C con la soluzione di Blocking (Blocking Milk 5% in PBS-Tween 0,05%), al fine di saturare i siti di legame specifici.

Seguono, dopo la rimozione della soluzione di Blocking, l'incubazione con gli anticorpi primari over night a 4° [Rabbit anti LDL-R (1:500) e mouse anti β-actin (1: 20000)], 3 lavaggi con PBS-Tween 0,1%, l'incubazione con gli anticorpi secondari per 1h a 4° [Goat anti-rabbit HRP coniugato (1:500) e rabbit anti-mouse HRP coniugato (1:20000)] ed infine, prima di procedere con lo sviluppo, ulteriori 3 lavaggi con PBS-Tween 0,1%.

La detection di LDL-R e β-actina è stata effettuata mediante l'ECL Hencanced Western Blotting Detection Kit (GH - Healthcore). La metodica di sviluppo sfrutta la capacità del complesso enzimatico della perossidasi di rafano legata all'anticorpo secondario di catalizzare una reazione chemioluminescente, in seguito all'aggiunta della soluzione ECL (Luminolo e H₂O₂), in grado di impressionare una lastra fotografica.

Il saggio autoradiografico è stato acquisito con *Clarity software* ed il segnale della proteina LDLR per ciascun pozzo è stato normalizzato con il segnale dato della proteina β-actina corrispondente.

4. Esperimento di internalizzazione delle LDL in HepG2 e HuH7

4.1 Isolamento delle LDL e marcatura con il Dil

Al fine di valutare in che modo il peptide EGF-A sia in grado di alterare l'attività del mutante PCSK9-D374Y e quindi i livelli di LDL-R, sono stati condotti esperimenti di internalizzazione delle LDL sia in cellule HepG2 che HuH7.

Le LDL plasmatiche sono state ottenute mediante due successive ultracentrifugazioni (L90 K Optima Beckman-Coulter-Ultracentrifuge, Fullerton, CA, U.S.A.). Dalla prima ultracentrifugata, effettuata a 37.000 g per 18h in un rotore T1-70 a 10°, è stata separata la frazione contenente VLDL e IDL (frazione top) dalla frazione sottostante contenente LDL e HDL (frazione bottom).

Al fine di ottenere solo la componente plasmatica contenente le LDL, la frazione bottom, trattata con bromuro di potassio per raggiungere una densità di 1063g/ml, è stata sottoposta ad una seconda ultracentrifugazione a 39.300 g per 20h in un rotore T1-70 a 10°C. Recuperate le LDL dalla frazione top, sono state prima dializzate in PBS 1X per 48h a 4°C, successivamente dosate in triplicato con il metodo BCA (BCA Protein Assay Kit – Pierce), e infine conservate a 4°C con antiproteasico (0,5 ml per 25ml di LDL) e antiossidanti BHT (20 µl per 25ml di LDL).

Le LDL ottenute sono state marcate con il fluoroforo Dil (3,3'-diottadecylindocarbocyanine) con λ di eccitazione di 520 nm e λ di emissione di 570 nm. Il Dil è un marcatore fluorescente che si lega alla porzione lipidica delle particelle lipoproteiche. I complessi che si vengono a formare possono essere rilevati con un microscopio a fluorescenza, un lettore di piastra o un citofluorimetro.

La procedura di marcatura consiste nell'incubare le LDL over-night a 37° al buio con il Dil (10µl di Dil ogni 2 mg di LDL); si ottengono dei derivati delle LDL altamente fluorescenti (dil (3)-LDL) in grado di legarsi con alta affinità al recettore LDL-R. Dopo le 24 h di marcatura per purificare le LDL-Dil, la miscela è stata sottoposta a cromatografia per esclusione, è stata fatta passare attraverso una colonna contenente Sephadex G-50 ed eluita in PBS 1X. Le molecole più grandi (LDL-Dil) sono escluse dalla resina e si muovono più rapidamente lungo la colonna. Le molecole più piccole (LDL) hanno accesso all'interno dei granuli del

gel, per cui impiegano un tempo maggiore per essere eluite. Le LDL-Dil sono state in seguito dosate in triplicato con il metodo BCA (BCA Protein Assay Kit – Pierce).

4.2 Internalizzazione delle LDL-Dil

Le cellule HepG2 e HuH7 sono state coltivate (2.0×10^5 cellule/well) in una piastra da 24 wells con DMEM-FCS 10% e cresciute fino ad una confluenza del 60-70%. A 24 h dalla piastratura sono stati effettuati gli esperimenti di trasfezione (vettore pCMV-3Tag-8 risospeso in Lipofectamine-DMEM); dopo 30h dalla trasfezione è stato aggiunto alle cellule 50 μ M del peptide EGF-A. Dopo una incubazione di 14h a 37°C, le cellule in coltura sono state nuovamente incubate per 4h a 37°C in ambiente saturo al 5% di CO₂ con terreni contenenti differenti concentrazioni di LDL-Dil:

- ✓ 10 μ g LDL-dil/ml di D-MEM;
- ✓ 20 μ g LDL-dil/ml di D-MEM;
- ✓ 40 μ g LDL-dil/ml di D-MEM;
- ✓ 80 μ g LDL-dil/ml di D-MEM;
- ✓ 10 μ g LDL-dil/ml di D-MEM supplementato da LDL non marcate (20X) (competizione che serve a valutare il binding aspecifico);
- ✓ PBS 1X, pari alla quantità in volume di LDL-dil alla concentrazione di 80 μ g/ml (per valutare la fluorescenza intrinseca delle cellule);

Allo scadere delle 4h, sono stati effettuati due lavaggi con Wash solution (PBS 1X, MgCl₂ 2mM e CaCl₂ 1mM) per eliminare la quota di LDL-Dil non internalizzate e successivamente un trattamento con buffer di lisi (NaOH 1mM e SDS 10%) per 30' a 37°C. Il lisato (150 μ l) di ogni pozzo è stato trasferito in una piastra OptiPlate™ da 96 wells e la fluorescenza emessa dalle Dil è stata letta mediante il lettore di piastra VICTOR™ (PerkinElmer Life Sciences) alla lunghezza d'onda d'eccitazione di 520 nm e una lunghezza di emissione di 570 nm. I risultati di fluorescenza sono stati normalizzati ed espressi come ng di Dil-LDL incorporato / mg di proteine cellulari.

Le proteine ottenute dal lisato cellulare di ogni well della piastra sono state dosate mediante il metodo BCA (BCA Protein Assay Kit – Pierce).

4.3 Statistica

Le curve di internalizzazione sono state modellate con l'equazione di primo ordine di Michaelis-Menten con l'aggiunta di una costante aspecifica, che tiene conto dell'interazione con le componenti non recettoriali del sistema in vitro, usando il software SAAM II (RFKA, Seattle, USA).

Con l'equazione di Michaelis-Menten è stata valutata la Bmax, espressa come capacità massima di legame del sistema recettore-cellulare, la costante di dissociazione (Kd) il cui valore esprime in maniera inversa l'affinità del ligando per il recettore e la costante lineare non-specifica del binding.

Le differenze tra i parametri stimati sono stati valutati tenendo conto della deviazione standard con il test del T student.

Risultati

1. Risultati e Discussione

1.1 Sintesi del cDNA full-length di PCSK9 e clonaggio nel vettore pCMV-3Tag-8

L'RNA totale estratto da cellule epatiche HepG2 è stato retrotrascritto attraverso RT-PCR (Reverse Transcriptase), mediante l'impiego di primers oligo-dT complementari all'estremità 3' dell'mRNA poliadenilato di PCSK9.

Il cDNA, ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione, è stato amplificato attraverso una Long-PCR, impiegando una coppia di primers 5' e 3' specifici, disegnati in modo da introdurre due diversi siti di restrizione rispettivamente Hind III e Xho I, al fine di ottenere un clonaggio dell'inserto orientato nel vettore di espressione.



L'inserto PCSK9 full-length (2076 bp), ottenuto dall'amplificazione del cDNA è stato controllato su gel di agarosio all'1% (Fig. 11).

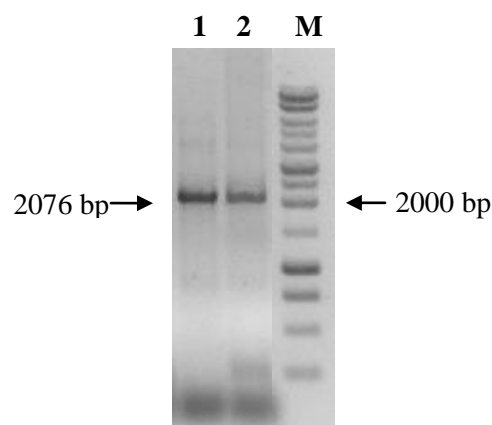
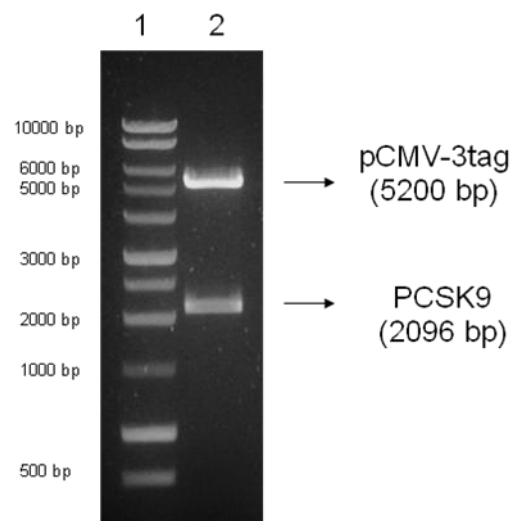


Fig.11: Lines 1-2: Long PCR del cDNA di PCSK9
M: marker 1Kb

Sia il frammento amplificato che il vettore plasmidico sono stati digeriti con gli enzimi Hind III e Xho I e purificati direttamente su colonna (PCR preps DNA purification kit - Promega). Dopo la reazione di ligation, cellule di E. Coli JM109 sono state trasformate e le colonie ricombinanti sono state selezionate per la loro resistenza all'antibiotico ampicillina. Per verificare la positività delle colonie, il DNA plasmidico è stato analizzato per digestione con gli enzimi Hind III e Xho I e visualizzato attraverso elettroforesi su gel di agarosio all'1% (Fig. 12).



**Fig.12: Line 1: marker 1Kb,
Line2: vettore pCMV-3Tag-8 PCSK9 wt digerito con HindIII e Xho I**

L'analisi mediante sequenziamento del cDNA clonato ha confermato sia il corretto orientamento che l'integrità della sequenza (Fig. 13).

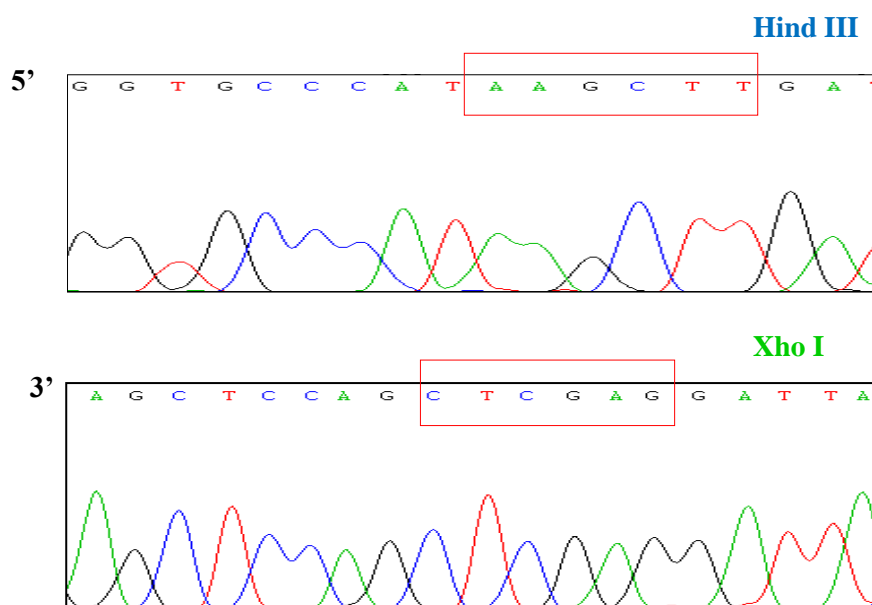


Fig.13: Sequenze dirette dei siti di restrizione Hind III e Xho I del vettore pCMV-3Tag-8 PCSK9 WT

1.2 Mutagenesi in situ per la costruzione del vettore di espressione pCMV-3Tag-8 PCSK9 con mutazione D374Y

Dopo aver verificato il corretto orientamento dell'inserto clonato nel vettore e l'assenza di varianti inesatte nella sequenza, si è proceduto con l'esperimento di mutagenesi del vettore, al fine di studiare in vitro la variazione dei livelli della componente proteica di LDL-R in funzione dell'effetto del mutante PCSK9-D374Y dopo trattamento con differenti concentrazioni di peptide sintetico EGF-A. La mutagenesi in situ, per l'introduzione della variante D374Y nel vettore pCMV-3Tag-8 PCSK9 WT, è stata effettuata seguendo il protocollo suggerito dal Quick Change Site Directed Mutagenesis.

Il vettore pCMV-3tag-8 contenente l'inserto PCSK9 WT è stato amplificato mediante l'impiego di una specifica coppia di primers che presentano in posizione centrale il cambio nucleotidico da introdurre (c.1364G/T).

Le colonie ottenute sono state sottoposte ad analisi di sequenza per verificare l'esattezza del cambio nucleotidico introdotto (Fig. 14).

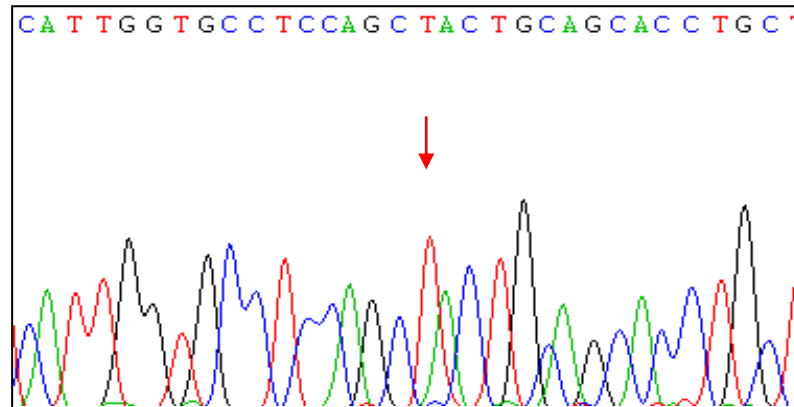


Fig14: Sequenza diretta della regione mutagenizzata per la variante D374Y

1.3 Trasfezioni transienti di pCMV-3tag-8PCSK9-D374Y in HepG2 e HuH7

Su linee cellulari di HepG2 e HuH7 sono stati effettuati esperimenti di trasfezione con il vettore ingegnerizzato pCMV-3tag-8PCSK9-D374Y. Sono state impiegate entrambe le linee cellulari provenienti da epatoma umano, al fine di poter valutare e comparare la variazione dei livelli della proteina LDL-R in funzione dell'effetto del mutante PCSK9-D374Y dopo trattamento con il peptide sintetico EGF-A.

Dopo trasfezione col vettore ricombinante PCSK9-D374Y, le cellule in coltura sono state trattate con concentrazioni crescenti (12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M) di peptide EGF-A. I lisati proteici ottenuti sono stati analizzati mediante saggi di Western-Blot (Fig. 15).

Dall'analisi dei dati ottenuti dai Western-Blot effettuati su lisati proteici di cellule HepG2 trasfettate con il vettore pCMV-3Tag-8PCSK9-D374Y è stata evidenziata una riduzione dei livelli della componente proteica dell'LDL-R di circa l'80% rispetto a cellule controllo trasfettate con empty vector (espressione 100%) (Fig. 16).

L'analisi condotta su lisati ottenuti da cellule HepG2 trasfettate con il vettore pCMV-3Tag8 PCSK9-D374Y e trattate con concentrazioni crescenti (12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M) di peptide EGF-A evidenzia, invece, un parziale aumento dei livelli della proteina LDL-R. In particolare, il trattamento con 50 μ M di peptide EGF-A ha mostrato un ripristino della quota di LDL-R pari al 60% rispetto alle cellule controllo trasfettate con empty vector (Fig. 16).

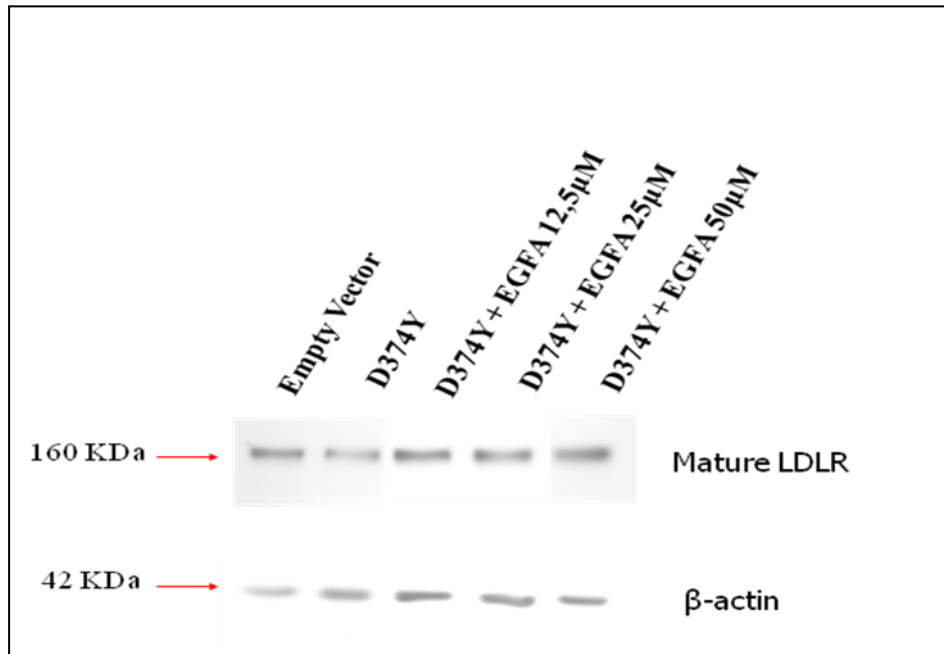
Esperimento su lisati di cellule HepG2

Fig.15: Western-Blot su lisati cellulari di HepG2

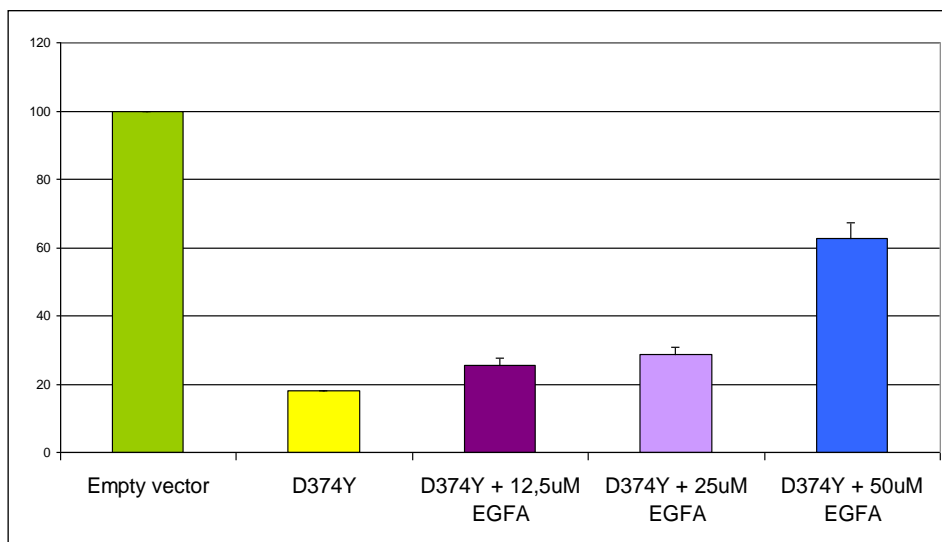


Fig.16: Istogramma relativo alla variazione in percentuale dei livelli proteici di LDL-R in cellule HepG2

Anche dall'analisi dei risultati sperimentali ottenuti dai Western-Blot su lisati proteici di cellule di HuH7 trasfettate con il vettore pCMV-3Tag-8PCSK9-D374Y è stata evidenziata una riduzione dei livelli totali della proteina LDL-R, circa il 92%, rispetto alle cellule controllo trasfettate con empty vector (espressione 100%) (Fig.17-18).

I risultati ottenuti dai lisati di HuH7 in seguito a trasfezione con il vettore pCMV-3Tag8 PCSK9-D374Y e il trattamento con concentrazioni crescenti (12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M) di peptide EGF-A hanno mostrato, come nel caso delle cellule HepG2, un parziale ripristino dei livelli di proteina LDL-R. Anche in questo caso l'effetto più rilevante è stato osservato dopo l'aggiunta nel mezzo di coltura del peptide EGF-A alla concentrazione di 50 μ M (Fig. 17-18).

In definitiva, a differenza delle cellule HepG2 dove il trattamento con la concentrazione di 50 μ M di peptide EGF-A ha evidenziato un ripristino dei livelli di LDL-R pari al 60% rispetto alle cellule controllo trasfettate con empty vector, nelle cellule HuH7 dal trattamento con uguali concentrazioni di peptide è stato ottenuto un maggiore recupero, circa il 75%, dei livelli proteici di LDL-R totale non degradato dal mutante PCSK9-D374Y.

Esperimento su lisati di cellule HuH7

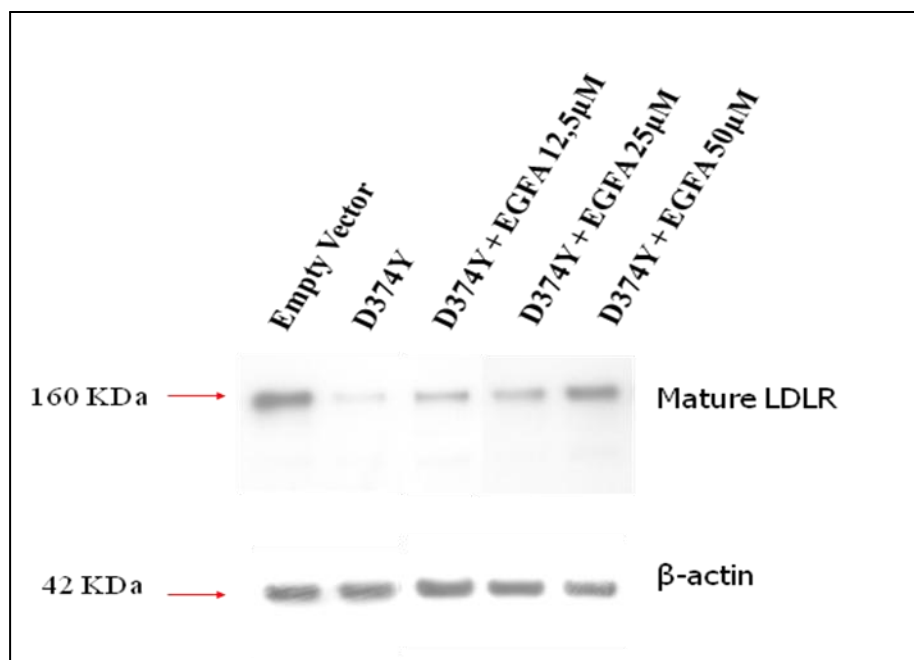


Fig.17: Western-Blot su lisati cellulari di HepG2

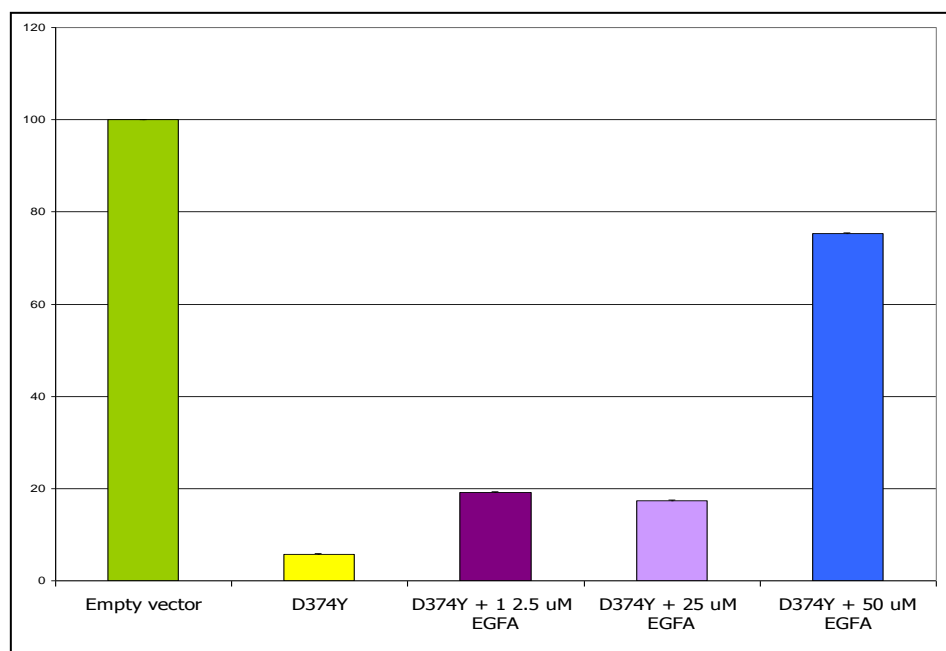


Fig.18: Istogramma relativo alla variazione in percentuale dei livelli proteici di LDL-R in cellule HuH7

1.4 Valutazione dell' internalizzazione delle LDL-Dil in HepG2 e HuH7

Dopo i saggi di Western-Blot, con i quali sono state valutate le variazioni dei livelli totali di proteina LDL-R, è stato condotto il test di internalizzazione delle LDL marcate con il fluoroforo Dil, al fine di valutare la variazione della cinetica di internalizzazione delle LDL-Dil dopo trattamento col peptide EGF-A.

Entrambe le linee cellulari HepG2 e HuH7 sono state prima trasfettate in modo transiente con il vettore ingegnerizzato pCMV-3Tag-8PCSK9-D374Y e successivamente trattate con 50 μ M di EGF-A sintetico; tale concentrazione di EGF-A sintetico è in grado di inibire la degradazione di LDL-R mediata da PCSK9- D374Y (vedi figura 16-18).

A 14h dal trattamento con l'EGF-A è stata effettuata l'incubazione con concentrazioni crescenti di LDL-Dil (10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml ,80 μ g/ml) .

I risultati di fluorescenza ottenuti dalla lettura mediante VICTOR™ (PerkinElmer Life Sciences) sono stati normalizzati ed espressi come ng di Dil-LDL incorporati / mg di proteine cellulari.

I parametri cinetici delle curve di internalizzazione sono stati calcolati mediante l'utilizzo di un modello matematico (SAAM II) basato sull'equazione di Michaelis-Menten con l'aggiunta di una componente lineare che modella il binding aspecifico delle LDL nel sistema in vitro.

La quantità dell'uptake specifico delle LDL è dato, quindi, dalla differenza tra la quantità totale misurata (in assenza di LDL non marcate) e la quantità misurata in presenza di un eccesso di LDL non marcate (background aspecifico).

Dall' interpolazione dei dati sperimentali ottenuti dai saggi di internalizzazione delle LDL-Dil in cellule HepG2 e HuH7 emerge che, in seguito ad esperimenti di trasfezione con il vettore pCMV-3Tag-8PCSK9-D374Y e trattamento con 50 μ M di peptide EGF-A, alle varie concentrazioni di Dil-LDL (μ g/ml) utilizzate, si osserva un recupero dell' uptake totale di LDL-Dil rispetto a cellule trasfettate con pCMV-3Tag-8PCSK9-D374Y non trattate con EGF-A (Fig.19-20).

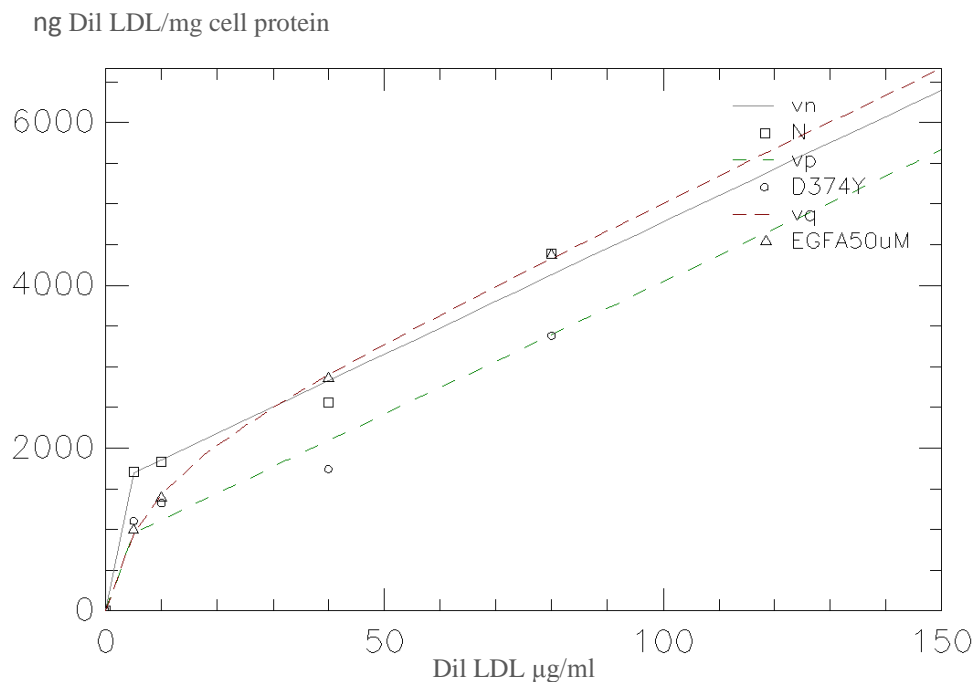


Fig.19: Esperimento di internalizzazione di LDL-Dil in cellule HepG2

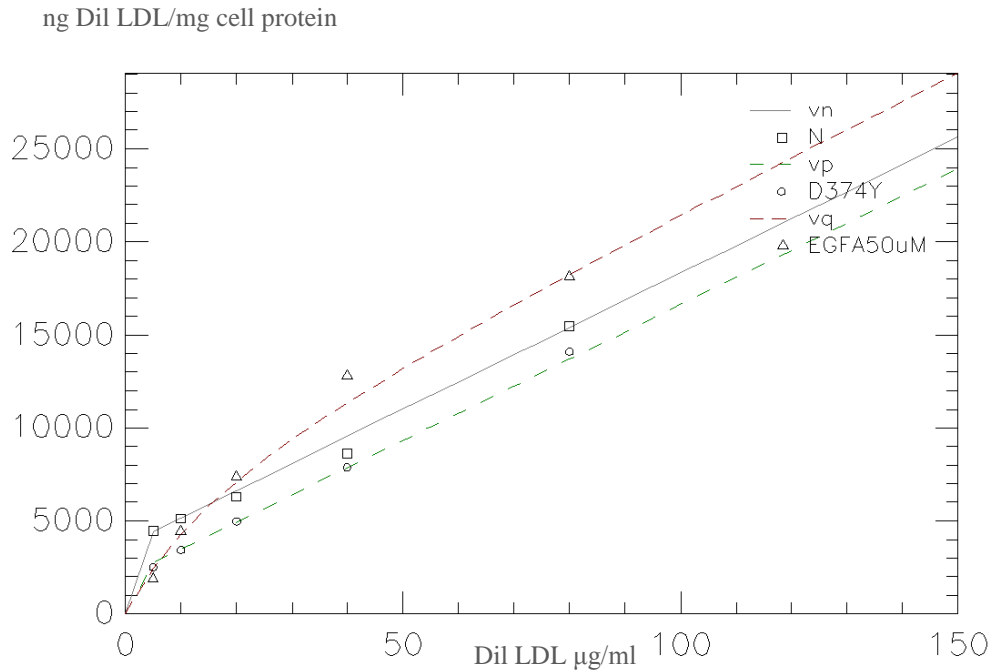


Fig.20: Esperimento di internalizzazione di LDL-Dil in cellule HuH7

In particolare, valutando l'efficienza di internalizzazione delle LDL-Dil in funzione di B_{max} (capacità massima di legame del sistema recettore-cellulare) in cellule HepG2 e HuH7, trasfettate con il vettore pCMV-3Tag-8PCSK9-D374Y, è stata osservata una riduzione, di circa il 50%, della densità dei siti recettoriali disponibili al legame (B_{max}) con conseguente decremento della internalizzazione di LDL-Dil, rispetto a cellule controllo (cellule trasfettate con empty-vector).

Dall'analisi, invece, dei risultati ottenuti in seguito a trattamento con 50 µM di peptide EGF-A emerge che sia le cellule HepG2 che le HuH7 mostrano un incremento di B_{max} , rispettivamente, del 20% e del 55% rispetto al controllo (cellule trasfettate con empty-vector) e del 60% e 85% rispetto ai valori sperimentali ottenuti su cellule trasfettate con la variante D374Y (Tab.5).

Questi dati, quindi, confermano i precedenti risultati ottenuti dai Western-Blot e cioè che il trattamento col peptide EGF-A, in particolare con 50 µM, ripristina i livelli della componente proteica dell'LDL-R favorendo il recupero dell'efficienza di internalizzazione delle LDL-Dil.

Tuttavia, l'analisi dei dati in funzione di K_d (inverso dell'affinità del ligando per il sistema recettore-cellulare) evidenzia che l'affinità di legame ligando/recettore-

cellulare con cui avviene il processo di internalizzazione, in seguito a trattamento con EGF-A, è significativamente inferiore rispetto ai valori ottenuti sia da cellule controllo che da cellule trasfettate con D374Y. Questo suggerisce che l'EGF-A, sebbene sia in grado di ripristinare la quota di LDL-R presente e di conseguenza l'internalizzazione delle LDL-Dil, altera, probabilmente, attraverso un meccanismo ancora non noto, l'affinità con cui il sistema recettore-cellulare internalizza le LDL (Tab.5).

	HepG2	HuH7
Controllo	1531 (8.9 x 10⁻²)	3707 (8.8 x 10⁻⁵)
D374Y	731 (5.0 x 10⁻²)	2007 (5 x 10⁻³)
+ EGF-A 50µM	1880 (7.04)	8023 (18.2)

Tab.5: Tabella con i parametri di Bmax e (Kd) relativi agli esperimenti di internalizzazione in cellule HepG2 e HuH7

Conclusioni

Conclusioni

Gli studi condotti negli ultimi anni, hanno portato ad un ampliamento delle conoscenze sulle cause genetiche responsabili dell'Ipercolesterolemia. In particolare, l'identificazione del gene PCSK9 e la scoperta di varianti responsabili di alterazioni funzionali della proteina, hanno permesso una maggiore comprensione dei meccanismi di regolazione che stanno alla base del metabolismo lipidico. La proteina PCSK9 svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'uptake del colesterolo prevenendo l'instaurarsi di eventuali condizioni patologiche in seguito all'eccessivo accumulo di LDL-C plasmatico.

Tuttavia, mutazioni genetiche nei domini funzionali della proteina possono alterare il pathway di degradazione dell'LDL-R e condurre conseguentemente alla insorgenza di un fenotipo ipercolesterolemico (mutazioni Gain of function) o ipocolesterolemico (mutazioni Loss of function).

Sebbene alcuni punti sul meccanismo di azione di PCSK9 siano ancora oscuri, tuttavia, le innumerevoli osservazioni sulla stretta associazione esistente fra PCSK9 e ipercolesterolemia, supportano il promettente ruolo che, inibitori farmacologici, anticorpi monoclonali o peptidi sintetici, specifici per l'attività di PCSK9, potrebbero avere per il trattamento dell'ipercolesterolemia in associazione o meno con il convenzionale trattamento con statine.

Gli esperimenti in vitro condotti nel nostro studio hanno riportato significativi risultati riguardo l'impiego di una molecola sintetica, il peptide EGF-A, come nuova strategia ipocolesterolemizzante. In questo studio è stata valutata l'efficacia del peptide EGF-A nell'inibizione del pathway di degradazione dell' LDL-R mediato dal mutante PCSK9-D374Y (variante associata ad un severo fenotipo ipercolesterolemico). La funzione del peptide è stata testata su due differenti linee cellulari di epatoma umano, HepG2 e HuH7, sulle quali sono stati condotti esperimenti di Western-Blot e saggi di internalizzazione che hanno evidenziato un significativo ruolo di inibizione del peptide EGF-A sull'attività catalitica del mutante PCSK9-D374Y. Infatti, in entrambe le linee cellulari trattate con EGF-A sintetico è stato osservato sia un significativo ripristino della componente proteica dell' LDL-R che un totale recupero dell'efficienza di internalizzazione delle LDL mediata dal recettore.

Futuri esperimenti in vivo su topi knockout potrebbero confermare l'effettivo effetto ipocolesterolemizzante del peptide EGF-A e, consentire l'avvio di trials clinici sperimentali sull'uomo al fine di valutare le promettenti potenzialità di questa molecola per lo sviluppo di un mirato trattamento farmacologico dell'ipercolesterolemia.

Bibliografia

1. **Abifadel M.**, Varret M., Rabes J.P., Allard D., Ouguerram K., Devillers M., Cruaud C., Benjannet S., Wickham L., Erlich D., Derre A., Villegier L., Farnier M., Beucler I., Bruckert E., Chambaz J., Chanu B., Lecerf J.M., Luc G., Moulin P., Weissenbach J., Prat A., Krempf M., Junien C., Seidah N.G, Boileau C. **Mutation in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia.** Nature Genetic 2003, 34:154-156.
2. **Allard D.**, Amsellem S., Abidafel M., Trillard M., Devillers M., Luc G., Krempf M., Reznik Y., Girardet J.P., Fredenrich A., Junien C., Varret M., Boileau C., Benlian P., Rabes J.P. **Novel mutation of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia.** Hum. Mutat. 2005, 26:497.
3. **Arca M.**, Zuliani G., Wilund K., Campagna F., Fellin R., Bertolini S., Calandra S., Ricci G., Glorioso N., Maioli M., Pintus P., Carru C., Cossu F., Cohen J., Hobbs H.H. **Autosomal recessive hypercholesterolemia in Sardinia, Italy, and mutation in ARH: a clinical and molecular genetic analysis.** Lancet 2002, 359:841-847.
4. **Benjannet S.**, Rhains D., Essalmani R., Mayne J., Wickham L., Jin W., Asselin M.C., Hamelin J., Varret M., Allard D., Trillard M., Abifadel M., Tebon A., Attie A.D., Rader D.J., Boileau C., Brissette L., Chretien M., Prat A., Seidah N.G. **NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the LDLR and LDL-cholesterol.** J Biol Chem 2004, 279:48865-48875.
5. **Benjannet S.**, Rhains D. Hamelin J., Nassoury N., Seidah N.G. **The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications.** J. Biol. Chem. 2006, 281(41):30561-30572.

6. **Berge K.E., Ose I., Leren T.P. Missense mutation in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy.** *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26:1094-1100.
7. **Boren J., Ekstrom U., Agren B., Nilsson-Ehle P., Innerarity T.L. The molecular mechanism for the genetic disorder Familial Defective Apolipoprotein B100.** *J. Biol. Chem.* 2001, 276:9214-9218.
8. **Boswell E.J., Jeon H., Blacklow S.C., Downing A.K. Global defects in the expression and function of the low density lipoprotein receptor (LDLR) associated with two familial hypercholesterolemia mutations resulting in misfolding of the LDLR epidermal growth factor-AB pair.** *J. Biol. Chem.* 2004, 279(29): 30611-21
9. **Brown M.S., Anderson R.G., J.L. Goldstein J.L. Recycling receptor: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins.** *Cell* 1983, 32:663-667.
10. **Brown M.S. and Goldstein J.L. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis.** *Science* 1986, 232: 34-37.
11. **Cameron J., Holla O.L., Ranheim T., Kulseth M.A., Berge K.E., Leren T.P. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors.** *Hum. Mol. Genet.* 2006, 15:1551-1558.
12. **Cantafora A., Bertolini S., Calandra S. Ipercolesterolemia familiare e mutazioni nel gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità in Italia.** *Ann. Ist. Super. Sanità* 1999, 35:177-184.
13. **Chen W.J., Goldstein J.L., Brown M.S. NPXY, a Sequence Often Found in Cytoplasmic Tails, Is Required for Coated Pit-mediated Internalization of the Low Density Lipoprotein Receptor.** *J. Biol. Chem.* 1990, 265(6):3116-3123.
14. **Cohen J., Pertsemlidis A., Kotowski L.K., Graham R., Garcia C.K., Hobbs H.H. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9.** *Nat. Genet.* 2005, 37:161-165.

15. **Costet P.**, Cariou B., Lambert G., Lalanne F., Lardeux B., Jarnoux A.L., Grefhorst A., Staels B., Krempf M. **Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c.** *J. Biol. Chem.* 2006, 281(10):6211-6218.
16. **Cunningham D.**, Danley D.E, Geoghegan K.F., Griffor M.C., Hawkins J.L., Subashi T.A., Varghese A.H., Ammirati M.J., Culp J.S., Hoth L.R., Mansour M.N., Mc Grath K.M., Seddon A.P., Shenolikar S., Stutzman-Engwall K.J., Warren L.C., Xia D., Qiu X. **Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007, 14:413-419.
17. **Davis C.G.**, Goldstein J.L., Sudhof T.C., Anderson R.G., Russell D.W., Brown M.S. **Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.** *Nature* 1987, 326:760-765.
18. **Dubuc G.**, Chamberland A., Wassef H., Davignon J., Seidah N.G., Bernier L. and Prat A. **Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24:1454–1459.
19. **Fasano T.**, Cefalù A.B., Di Leo E., Noto D., Pollaccia D., Bocchi L., Valenti V., Bonardi R., Guardamagna O., Averna M., Tarugi P. **A novel Loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol.** *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2007, 27:677-681.
20. **Garcia C.K.**, Wilund K., Arca M., Zuliani G., Fellin R., Maioli M., Calandra S., Bertolini S., Cossu F., Grishin N., Barnes R., Cohen J.C., Hobbs H.H. **Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein.** *Science* 2001, 292:1394-1398.
21. **Gent J.**, Braakman I. **Low-density lipoprotein receptor structure and folding.** *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61:2461-2470.

22. **Goldstein J.L.**, Brown M.S. , Anderson R.G.W., Russell D.W., Schneider W.J. **Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985, 1:1-39.
23. **Grefhorst A.**, McNutt M.C., Lagace T.A., Horton J.D **Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice.** *J. Lipid Res.* 2008, 49(6):1303-1311.
24. **Hobbs H.H.**, Brown M.S., Goldstein J.L., Russell D.W. **Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia.** *The Journal of Biological Chemistry* 1986, 261(28):13114-13120.
25. **Hobbs H.H.**, Russell D.W., Brown M.S., Goldstein J.L. **The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein.** *Annu. Rev. Genet.* 1990, 24:133-170.
26. **Horton J.D.**, Shah N.A., Warrington J.A., Anderson N.N., Park S.W., Brown M.S., Goldstein J.L. **Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003, 100:12027–12032.
27. **Horton J.D.**, Cohen J.C., Hobbs H.H. **Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism.** *Trend. Biochem. Sci.* 2007, 32:71-77.
28. **Innerarity T.L.**, Borén J., Yamanaka S., Olofsson S.O. **Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms.** *J Biol Chem.* 1996, 271:2353-2356.
29. **Jeon H.**, Meng W., Takagi J., Eck M.J., Springer T.A., Blacklow S.C. **Implication for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair.** *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8:499-504.

30. **Knott T.J.**, Pease R.J., Powell L.M., Wallis S.C., Rall S.C., Innerarity T.L., Blackhart B., Taylor W.H., Marcel Y., Milne R., Johnson D., Fuller M., Lusis A.J., McCarthy B.J., Mahley R.W., Levy-Wilson B., Scott J. **Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B.** *Nature* 1986, 323:734-738.
31. **Kotowski I.K.**, Pertsemlidis A., Luke A., Cooper R.S., Vega G.L., Cohen J.C., Hobbs H.H. **A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol.** *Am. J. Hum. Genet.* 2006, 78(3):410-22.
32. **Kwon H.J.**, Lagace T.A., McNutt M.C., Horton J.D., Deisenhofer J. **Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9.** *PNAS* 2008, 105(6):1820-1825.
33. **Lagace T.A.**, Curtis D.E., Garuti R., McNutt M.C., Wook S., Prather H.B., Anderson N.N., Ho Y.K., Hammer R.E., Horton J.D. **Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in liver of parabiotic mice.** *J. Clin. Invest.* 2006, 116:2995-3005.
34. **Lambert G.** Krempf M., Costet P. **PCSK9: a promising therapeutic target for dyslipidemias?** *Trend. Endocrinol. Metab.* 2006, 17:79-81.
35. **Mahley R.W.** **Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.** *Science* 1988, 240(4852):622-630.
36. **Maxwell K.N.**, Soccio R.E., Duncan E.M., Sehayek E., Breslow J.L. **Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice.** *J. Lipid. Res.* 2003, 44(11):2109-19.
37. **Maxwell K.N.**, Breslow J.L. **Adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2004, 101:7100-7105.
38. **McNutt M.C.**, Lagace T.A., Horton J.D. **Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells.** *J. Biol. Chem.* 2007, 282(29):20799-20803.

39. **Park S.W., Moon Y.A., Horton J.D. Post-transcriptional regulation of LDL receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a (PCSK9) in mouse liver.** *J. Biol. Chem.* 2004, 279:50630-50638.
40. **Pisciotta L., Oliva C.P., Cefalu A.B., Noto D., Bellocchio A., Fresa R., Cantafora A., Patel D., Averna M., Tarugi P. et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2006, 186:433-440.
41. **Qian Y.W., Schmidt R.J., Zhang Y., Chu S., Lin A., Wang H., Wang X., Beyer T.P., Bensch W.R., Li W., Ehsani M.E., Lu D., Konrad R.J., Eacho P.I., Moller D.E., Karathanasis S.K., Cao G. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis.** *J. Lipid Res.* 2007, 48:1488-1498.
42. **Rashid S., Curtis D. E., Garuti R., Anderson N.N, Bashmakov Y., Ho Y.K., Hammer R.E, Moon Y.A., Horton J.D. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005,102:5374-5379.
43. **Rudenko J., Henry L., Henderson K., Ichtchenko K., Brown M.S., Goldstein J.L., Deisenhofer J. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH.** *Science* 2002, 298:2353-2358.
44. **Rudenko G., Deisenhofer J. The low-density lipoprotein receptor: ligands, debates and lore.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003, 13(6):683-689
45. **Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L., Marcinkiewicz J., Jasmin S.B., Stifani S., Basak A., Prat A., Chretien M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100:928-933.
46. **Shan L., Pang L., Zhang R., Murgolo N.J., Lan H., Hedrick J.A. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide.** *Bioch.and Biophy. Res. Com.* 2008, 375:69-73.

47. **Sun X.M.**, Eden E.R., Tosi I., Neuwirth C.K., Wile D., Naoumova R.P. and Soutar A.K. **Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia.** Hum. Mol. Genet. 2005, 14:1161–1169.
48. **Tolleshaug H.**, Goldstein J.L., Schneider W.J., Brown M.S. **Post-translational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia.** Cell 1982, 30: 15-724.
49. **Weber L.W.**, Boll M., Stampfl A. **Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins.** World J. Gastroenterol. 2004, 10(21):3081-3087.
50. **Wilson D.J.**, Gahan M., Haddad L., Heath K., Whittall R.A., Williams R.R., Humphries S.E., Day I.N. **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.
51. **Yamamoto T.**, Davis C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., Russell D.W. **The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.** Cell 1984, 39:27-38.
52. **Zhang D.W.**, Lagace A.T, Garuti R., Zhao Z., McDonald M., Horton J.D., Cohen J.C., Hobbs H.H. **Binding of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation.** J. Biol. Chem. 2007, 282:18602-18612.
53. **Zhao Z.**, Tuakli-Wosornu Y., Lagace T.A., Kinch L., Grishin N.V., Horton J.D., Cohen J.C., Hobbs H.H. **Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote.** Am. J. Hum. Genet. 2006, 79(3):514-523.

