



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

***Le ipertrigliceridemie severe primitive:
studio biochimico e genetico-molecolare***

Dottorando

Dott.ssa Rossella Spina

Coordinatore

Ch.mo Prof. M. Averna

Tutor

Ch.mo Prof. C.M. Barbagallo

**SSD MED/09
A.A. 2010/2011**

*...lo scoprire consiste nel vedere ciò che tutti hanno visto
e nel pensare ciò che nessuno ha pensato...*

Albert Szent-Györgyi

INTRODUZIONE

LE DISLIPIDEMIE

Le dislipidemie sono spesso considerate disturbi metabolici dovuti a disordini alimentari e/o comportamentali in grado di causare un aumento del rischio cardiovascolare. Tuttavia, sebbene questo sia vero, bisogna essere consapevoli che le diverse forme di dislipidemie riconoscono tutte, per quanto in modo variabile, cause genetiche. Oggi si è a conoscenza di un quadro sufficientemente dettagliato dei fattori genetici alla base delle diverse forme dislipidemiche, che ha permesso di superare l'antica classificazione di Fredrickson di queste patologie. Quest'ultima era infatti basata esclusivamente sulle manifestazioni fenotipiche delle dislipidemie. Le nuove informazioni acquisite sull'aspetto genetico hanno permesso di realizzare una più completa classificazione delle alterazioni del metabolismo lipidico, che integra sia gli aspetti metabolici che i determinanti genetici. Un problema che però questo approccio si trova ad affrontare è la grande eterogeneità delle basi molecolari di queste alterazioni metaboliche. Infatti, accanto a forme che riconoscono la loro causa in difetti localizzati in un unico gene e che possono essere trasmessi con modalità autosomica dominante o recessiva (dislipidemie monogeniche), ne sono state descritte altre che mostrano difetti genetici complessi, probabilmente legati alla combinazione di più geni, la cui trasmissione è influenzata da un elevato livello di variabilità nella penetranza (dislipidemie a genetica complessa). Queste rappresentano un gruppo di dislipidemie che, sebbene si manifestino con elevata frequenza nella popolazione, offrono difficoltà nella descrizione a causa di conoscenze ancora incomplete sulle loro basi molecolari. Esiste infine un terzo gruppo di dislipidemie causate dall'interazione tra difetti genetici in numerosi geni, funzionalmente modesti, e fattori ambientali, prevalentemente dietetici. Queste vengono definite dislipidemie multigeniche, e costituiscono ancora oggi un gruppo mal definito di sindromi, ma di grande interesse

perché potrebbero rappresentare degli utili modelli per la comprensione e lo studio delle dislipidemie a genetica complessa.

Le modalità diagnostiche a disposizione sono di tre tipologie: clinica, di laboratorio e genetica. La modalità clinica include un'accurata anamnesi personale e familiare, l'eventuale osservazione del plasma ad occhio nudo, e l'esame obiettivo completo, comprensivo della ricerca dei segni caratteristici (xantomi, xantelasmi, arco corneale, lipemia retinalis, ecc.). In questa fase è di fondamentale importanza la valutazione diretta del maggior numero possibile di esami di laboratorio del paziente e dei suoi familiari, con particolare riferimento ai congiunti di I e II grado (padre, madre, figli, fratelli, sorelle, nonni, zii), nonché degli eventi cardiovascolari della famiglia, con particolare attenzione anche all'età di insorgenza. È così possibile costruire degli alberi genealogici, in grado di fornire informazioni insostituibili. In questo modo, la diagnosi della maggior parte delle principali dislipidemie genetiche può essere posta nella quasi totalità dei casi. Restano escluse dalla modalità clinica solo alcune rare patologie, nelle quali la diagnosi diventa talora superflua, per la mancanza di strumenti terapeutici specifici e di sicure indicazioni epidemiologiche, o riservata a pochi centri ad alta specializzazione in grado di proseguire l'iter diagnostico con le modalità di laboratorio (attraverso analisi complesse come il dosaggio delle LPL nella sindrome chilomicronemica o della LCAT nella malattia degli occhi di pesce), o con modalità genetica (in grado di diagnosticare le mutazioni candidate a spiegare il fenotipo lipidico). L'indirizzo diagnostico deve anche in questi casi essere supportato da un suggerimento clinico, dovendo essere motivato da quesiti documentati e in casi selezionati. Le modalità di laboratorio e genetica sono infatti di relativo supporto nei casi più comuni, o per l'abbondanza di mutazioni candidate, o per l'assenza di mutazioni note. In tali situazioni si ottengono migliori risultati amplificando gli sforzi per la valutazione clinica.

Un aspetto particolare ma di fondamentale importanza della diagnostica delle dislipidemie è quello che riguarda le forme secondarie. La presenza di queste ultime deve essere infatti indagata (ed esclusa o confermata) già in sede di prima valutazione, per le enormi ripercussioni sui successivi comportamenti diagnostici e terapeutici. In generale, le malattie renali, il diabete mellito e le malattie della tiroide rappresentano le principali condizioni patologiche causa di dislipidemie secondarie. In particolare, le condizioni più frequenti sono la sindrome nefrosica, l'ipotiroidismo e il diabete mellito con scarso compenso. Inoltre, tutte le condizioni di paraproteinemia, specialmente quelle legate a disordini dell'autoimmunità, sono cause, anche se rare, di alterazioni secondarie del metabolismo lipidico.

LA SINDROME CHILOMICRONEMICA

La sindrome chilomicronemica è una rara patologia caratterizzata da una massiva ipertrigliceridemia con presenza di chilomicroni a digiuno. La prevalenza nella popolazione è stimata intorno a 1:1.000.000. Due forme genetiche differenti, il deficit di LPL e il deficit di ApoCII, sono le condizioni patologiche storicamente responsabili della malattia, ma di recente si sono individuate mutazioni a carico di altri geni collegati al metabolismo delle lipoproteine, tra cui quelli codificanti per ApoAV ed LMF1, che sembrano ricoprire un ruolo importante nella genesi della sindrome chilomicronemica.

Quale ne sia la causa, la malattia è caratterizzata da livelli molto elevati di trigliceridi (di regola superiori a 1000 mg/dl, ma che possono raggiungere valori anche di 7000 – 8000 mg/dl). Il colesterolo totale è spesso aumentato, ma questo non indica una dislipidemia a carattere misto, in quanto questo aumento è dovuto alla quota di colesterolo contenuta nelle lipoproteine ricche in trigliceridi (quota che è marginale nelle situazioni di normolipidemia ma che in questi casi diventa significativa). Al contrario, i livelli di colesterolo HDL e colesterolo LDL sono particolarmente bassi.

La sindrome chilomicronemica è una patologia grave perché comporta un elevato rischio di pancreatite acuta. Viene solitamente diagnosticata in età pediatrica (anche se è possibile l'evoluzione asintomatica fino all'età giovane adulta) per la comparsa di dolore addominale ricorrente. Altri sintomi tipici sono la xantomatosi eruttiva, la lipemia retinalis, l'epatosplenomegalia e l'infiltrazione del midollo osseo da parte di cellule schiumose, e coesistono non di rado alterazioni dell'attenzione e cefalea probabilmente da attribuire all'iperviscosità ematica causata dall'eccesso di chilomicroni. Il sospetto clinico, posto sulla base dell'esame obiettivo completo e dei dati ematochimici di routine, deve ricevere una prima conferma attraverso la valutazione dell'aspetto del plasma incubato per 24 ore a 4° C, che si mostra con il tipico aspetto dell'orletto cremoso su un infranatante limpido. La conferma definitiva si ottiene, nel caso del deficit familiare di LPL, con la dimostrazione che i livelli di LPL nel plasma non aumentano dopo la somministrazione di eparina (che normalmente sgancia la LPL dalle superfici endoteliali), e nel caso del deficit familiare di ApoCII con la dimostrazione dell'assenza dell'ApoCII all'elettroforesi su gel e con la dimostrazione che la trasfusione di plasma (contenente abbondanti quantità di ApoCII) determina una repentina caduta dei trigliceridi plasmatici. Sono inoltre possibili le documentazioni delle mutazioni negli altri geni noti e cioè ApoAIV ed LMF1.

È da sottolineare che anche per questa patologia, come per tutte le altre alterazioni del metabolismo delle lipoproteine, vanno inizialmente escluse in sede diagnostica le forme secondarie.

ENZIMI COINVOLTI NEL METABOLISMO DELLE LIPOPROTEINE RICCHE IN TRIGLICERIDI

La lipasi lipoproteica (LPL) è l'enzima chiave del metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni e VLDL. È espressa in diversi tessuti (adiposo, muscolare, cardiaco e ghiandola mammaria) e la sua regolazione è specifica per ognuno di essi, tanto che

l'espressione della LPL correla con la richiesta e la captazione dei lipidi da parte dei tessuti. Una più dettagliata descrizione delle funzioni e delle caratteristiche biochimiche di questo enzima saranno esposti più avanti.

La lipasi epatica dei trigliceridi (HTGL o HL), è sintetizzata nel fegato e interagisce con le lipoproteine nei sinusoidi epatici. La sua azione consiste nel rimuovere i trigliceridi dai remnants delle VLDL, quindi promuove la conversione delle VLDL in LDL, e può anche avere un ruolo nell'eliminazione dei remnants dei chilomicroni e nella conversione delle HDL₂ in HDL₃. La grave ipertrigliceridemia che si manifesta nei soggetti con deficit genetico della HTGL è dovuta all'accumulo dei remnants dei chilomicroni e delle VLDL nel plasma.

La LCAT è sintetizzata dal fegato e secreta nel plasma dove si lega alle HDL. Questo enzima media il trasferimento dell'acido linoleico, proveniente dalla lecitina, al colesterolo libero sulla superficie delle HDL per formare gli esteri del colesterolo che sono poi trasferiti alle VLDL e alle LDL. L'ApoAI è un cofattore per l'esterificazione mediata da LCAT. Il deficit di questa attività enzimatica può essere dovuto a mutazioni del gene dell'enzima o di ApoAI, e causa una diminuzione dei livelli di esteri del colesterolo e delle HDL determinando opacità corneale e insufficienza renale.

La proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CEPT) è sintetizzata nel fegato e circola nel plasma in associazione con le HDL. La CEPT media lo scambio degli esteri del colesterolo provenienti dalle HDL con i trigliceridi provenienti dai chilomicroni e dalle VLDL.

La proteina di trasporto dei fosfolipidi (PLTP) è sintetizzata nel fegato e nel polmone. La produzione di HDL mature dipende dalla presenza di questo enzima.

TRASPORTO DEI LIPIDI ESOGENI

Nelle popolazioni dei paesi industrializzati, dove generalmente gli individui assumono da 50 a 100 g di grasso e 0,5 g di colesterolo in tre

o quattro pasti, il trasporto dei grassi provenienti dall'alimentazione è praticamente continuo. I soggetti normolipidemicici eliminano la maggior parte dei grassi alimentari dal circolo ematico entro otto ore dall'ultimo pasto, ma alcuni soggetti con dislipidemie, in particolare quelli con elevati livelli di trigliceridi VLDL a digiuno, hanno livelli misurabili di lipoproteine di derivazione intestinale in circolo per più di 24 ore dopo l'ultimo pasto.

Nella mucosa intestinale i trigliceridi e il colesterolo della dieta sono incorporati nel 'core' dei chilomicroni nascenti. La superficie esterna dei chilomicroni è costituita da fosfolipidi, da colesterolo libero, dall'ApoB48, dall'ApoAI, dall'ApoAII e dall'ApoAIV. Il chilomicrone, schematicamente è una goccia di grasso contenente trigliceridi per l'80-95%, è secreto nei vasi chiliferi e trasportato nella circolazione ematica tramite il dotto toracico. Nel plasma le ApoC sono trasferite sui chilomicroni dalle HDL. L'ApoCII catalizza l'idrolisi dei trigliceridi attivando la LPL delle cellule endoteliali capillari nel tessuto adiposo e muscolare. Completata l'idrolisi del core di trigliceridi, l'ApoCII e l'ApoCIII ritornano alle HDL. La presenza dell'ApoE fa sì che i remnants dei chilomicroni si leghino prima al proteoglicano eparansolfato all'interno dello spazio di Disse e successivamente al recettore epatico delle LDL o alla LRP. In definitiva, i trigliceridi della dieta sono distribuiti alle cellule adipose e muscolari come acidi grassi, mentre il colesterolo della dieta è captato dal fegato, dove può essere utilizzato per la formazione degli acidi biliari, può essere incorporato nelle membrane, riscreto come colesterolo delle lipoproteine ritornando in circolo, o escreto come colesterolo nella bile. Il colesterolo della dieta regola inoltre la sintesi epatica del colesterolo endogeno (fig.1).

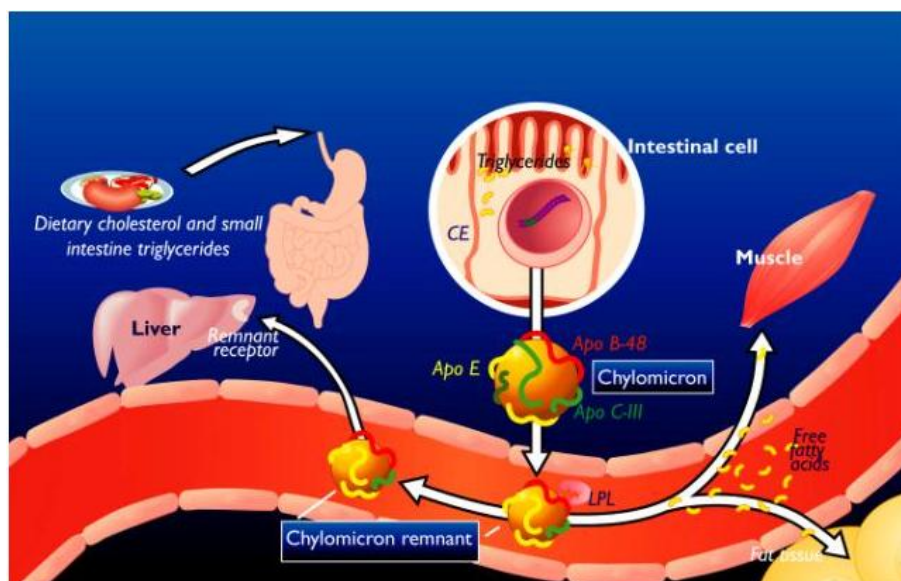


Fig.1- Produzione e metabolismo dei chilomicroni

Le alterazioni del trasporto e del metabolismo dei chilomicroni possono predisporre all'aterosclerosi e l'iperlipidemia postprandiale può essere un fattore di rischio associato a malattia cardiovascolare. I chilomicroni e i loro remnants possono essere captati dalle cellule delle pareti vasali, compresi i macrofagi, che dal plasma si spostano nel contesto di questa struttura. L'accumulo di esteri del colesterolo da parte di queste cellule le trasforma in cellule schiumose, la più precoce lesione cellulare della placca aterosclerotica. Se i livelli postprandiali dei chilomicroni o dei loro remnants sono elevati, o se la loro rimozione dal plasma è prolungata o ritardata, la cessione di colesterolo alle pareti vasali può essere aumentata.

TRASPORTO DEI LIPIDI ENDOGENI

Il sistema di trasporto dei lipidi endogeni può essere suddiviso in due sottosistemi: il sistema delle lipoproteine ApoB100 (VLDL, IDL e LDL) e il sistema delle lipoproteine ApoA1 (HDL).

SISTEMA DELLE LIPOPROTEINE APOB100

Nel fegato, i trigliceridi e il colesterolo, sia alimentari che di sintesi, sono inglobati, insieme alle ApoB100 e ai fosfolipidi nelle VLDL e secreti nel plasma, dove le ApoC1, CII, CIII ed E si aggiungono alle VLDL. I trigliceridi rendono conto di circa il 50-85% del peso di queste ultime. VLDL di dimensioni molto grandi e ad elevato contenuto in trigliceridi sono secrete in situazioni in cui vi è un'eccessiva sintesi di trigliceridi, come negli stati di eccesso calorico, diabete mellito, consumo di alcol in elevate quantità. I trigliceridi vengono idrolizzati nel plasma ad opera della LPL e le VLDL vengono convertite nei loro 'remnants' (IDL). Al contrario dei remnants dei chilomicroni, le IDL possono entrare nel fegato o dare origine alle LDL. L'ApoE e la HL svolgono un ruolo chiave nella captazione epatica delle IDL; nei soggetti con deficit di ApoE2 o di HL si accumulano IDL nel plasma. L'ApoB100 è l'unica proteina che rimane sulla superficie delle LDL.

L'emivita delle LDL nel plasma è determinata principalmente dalla disponibilità (o attività) del recettore per queste ultime. La maggior parte delle LDL plasmatiche è captata dal fegato, mentre la quota rimanente è ceduta ai tessuti periferici che utilizzano il colesterolo come precursore per la sintesi di ormoni steroidei. Il recettore per le LDL è presente su quasi tutte le cellule dell'organismo. È noto da tempo che il colesterolo ceduto dalle LDL regola la sintesi del colesterolo stesso e l'espressione dei recettori per le LDL sulla superficie degli epatociti. L'aumento dei livelli plasmatici di colesterolo LDL e di ApoB100 rappresenta un fattore di rischio per l'aterosclerosi. Le LDL normali non causano la formazione di cellule schiumose, mentre quando vanno incontro alla perossidazione dei lipidi diventano un ligando ad alta affinità per la via alternativa dei recettori spazzini, presenti sulle cellule endoteliali e sui macrofagi. Inoltre, le LDL ossidate agiscono sulla parete vasale stimolando la secrezione di citochine e fattori di crescita. La conseguenza è il reclutamento di più monociti a livello della lesione

e la proliferazione delle cellule muscolari lisce che sintetizzano e secernono grandi quantità di matrice extracellulare.

Mentre il ruolo aterogeno delle LDL è stato ampiamente chiarito, lo stesso tipo di azione non è ancora così certo per le VLDL. È possibile che l'ipertrigliceridemia non sia direttamente aterogena, ma che rappresenti il risultato di altre alterazioni a carico delle lipoproteine. Quindi, se l'iperlipidemia postprandiale è un fattore di rischio associato a patologia cardiovascolare, i soggetti con normali livelli plasmatici di trigliceridi a digiuno che dopo l'assunzione di un carico di grassi sviluppano un'ipertrigliceridemia, potrebbero essere classificati in modo errato come normali negli studi in cui si analizzano solo i campioni di sangue a digiuno. È probabile che il rischio aterogeno dell'ipertrigliceridemia sia attribuibile maggiormente ai remnants delle VLDL ricchi in esteri del colesterolo.

SISTEMA DELLE LIPOPROTEINE APOAI

Al contrario delle lipoproteine ApoB, le HDL che contengono ApoAI hanno un ruolo antiaterogeno ormai ben documentato, sebbene non siano ancora del tutto chiari i meccanismi con i quali esercitano questa azione protettiva.

Le HDL si formano nel plasma per coalescenza di singoli complessi fosfolipidi-apolipoproteine. Le apoAI sono le apoproteine strutturali cruciali per le HDL, e i complessi ApoAI-fosfolipidi si fondono con altre vescicole di fosfolipidi che contengono ApoAII e ApoAIV per formare i vari tipi di HDL. Le apoproteine C si possono aggiungere alle HDL dopo la loro secrezione come complessi di fosfolipidi o mediante il trasferimento da lipoproteine ricche in trigliceridi. Queste piccole HDL, povere in colesterolo, sono chiamate HDL₃. Il colesterolo libero viene trasferito dalla membrana cellulare alle HDL₃ ad opera di una proteina trasportatrice del colesterolo chiamata ABC1. All'interno delle HDL₃ il colesterolo viene convertito in colesterolo esterificato dalla LCAT, e come estere giunge al core delle HDL. La formazione degli esteri del

colesterolo aumenta la capacità delle HDL₃ di accettare colesterolo libero e di ingrandirsi per formare le HDL₂. queste possono essere metabolizzate attraverso due vie: 1) gli esteri del colesterolo possono essere trasferiti dalle HDL₂ alle lipoproteine ApoB o alle cellule; 2) l'intera particella HDL₂ può essere rimossa dal plasma. Il passaggio degli esteri del colesterolo dalle HDL alle lipoproteine ApoB ricche di trigliceridi (rispettivamente chilomicroni o VLDL negli stati di nutrizione o di digiuno) è mediato dalla CEPT. I trigliceridi sono trasferiti alle HDL in questo processo e sono il substrato per la lipolisi da parte della LPL o della HL. Infine le HDL₂ sono convertite nuovamente in HDL₃. Si ritiene che il trasporto inverso del colesterolo mediato dalle HDL dai tessuti periferici al fegato, sia il principale meccanismo mediante cui le HDL proteggono dall'aterosclerosi.

In casi rari, bassi livelli plasmatici di HDL sono dovuti a un deficit genetico di uno dei componenti strutturali di queste particelle, come l'ApoA1, ma i bassi livelli di HDL-colesterolo sono solitamente la conseguenza dell'aumento dei livelli plasmatici delle VLDL e delle IDL o dei chilomicroni e dei loro remnants.

SISTEMA LIPOLITICO

Il sistema lipolitico rappresenta il momento catabolico delle lipoproteine ricche in trigliceridi sia di sintesi epatica (VLDL), che intestinale (chilomicroni). La funzione della lipolisi è quella di dirigere gli acidi grassi generati dall'attività idrolitica dell'enzima sulla componente trigliceridica delle lipoproteine. A livello del tessuto adiposo questo meccanismo agisce nell'esterificazione e nell'immagazzinamento, in un momento di surplus energetico quale è la fase che segue l'introito alimentare, oppure a livello del tessuto muscolare e/o cardiaco, dove gli acidi grassi vengono ossidati a scopo energetico durante il digiuno. Un ruolo fondamentale in questo processo è svolto dalla LPL, ma esistono diversi fattori di regolazione che possono anche essere alla base di alterazioni patologiche dell'intero sistema.

La lipoproteinlipasi (LPL) è sintetizzata nelle cellule adipose e muscolari, è secreta nello spazio interstiziale, viene trasportata attraverso le cellule endoteliali e si lega ai proteoglicani sulla superficie luminale nell'adiacente letto capillare. La LPL media l'idrolisi dei trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL producendo acidi grassi liberi e glicerolo. Gli acidi grassi liberi raggiungono i tessuti adiacenti, dove vengono utilizzati per la produzione di energia o immagazzinati come forme di riserva. La maggior parte della LPL circolante è associata alle LDL.

LPL: STRUTTURA BIOCHIMICA, SINTESI E FUNZIONE

La proteina LPL, insieme alla lipasi pancreatica e alla lipasi epatica, appartiene alla superfamiglia delle lipasi. Il gene che codifica per la proteina LPL è situato sulla banda 22 del braccio corto del cromosoma 8 (8p22). Si estende per 30 kb e codifica per un peptide segnale di 27 aminoacidi e per una proteina matura di 448 aminoacidi. È una glicoproteina composta da due subunità identiche, ciascuna del peso di 51 kD. Ogni subunità è organizzata in due regioni strutturalmente distinte, consistenti in un dominio più grande N-terminale (residui 1 – 312) e in uno più piccolo C-terminale (residui 313 – 448). Il dominio N-terminale comprende la triade catalitica (Ser¹³², Asp¹⁵⁶ e His²⁴¹), aminoacidi carichi positivamente, che potrebbero essere siti di legame per l'eparina e per le catene di eparansolfato delle superfici cellulari, e il sito di legame per il cofattore ApoCII. Il dominio C-terminale include un ulteriore sito di legame per l'eparina e per l'eparansolfato dei proteoglicani, e un sito di legame per i substrati lipidici, il quale conferisce specificità alla lipasi. L'enzima presenta un'altra regione funzionalmente molto importante, che include dieci residui di cisteina, implicati nella formazione di cinque ponti disolfuro, e aminoacidi essenziali per la dimerizzazione e la stabilità del dimero.

La forma attiva della LPL è un omodimero non covalente, la cui dissociazione porta a una inattivazione irreversibile dell'enzima. Studi in

vitro hanno mostrato che il dimero tende reversibilmente all'equilibrio con un monomero, il quale è orientato verso un cambiamento conformazionale che inattiva il monomero stesso. I monomeri inattivi possono riassociarsi dando origine ad aggregati pesanti. La forma dimerica della LPL ha un'affinità seimila volte più alta per l'eparina, e quindi per l'eparansolfato dei proteoglicani, rispetto alla forma monometrica.

La LPL è sintetizzata prevalentemente nel tessuto adiposo, nel tessuto cardiaco, in quello muscolare e nella ghiandola mammaria. Viene anche prodotta in minor misura nelle ghiandole ovariche e surrenaliche, in alcune cellule neurali, nell'aorta toracica, nella milza, nel polmone e nel rene. Sebbene il sito fisiologico per l'azione della LPL sia la superficie luminale dei vasi sanguigni dove può interagire con le lipoproteine circolanti, le cellule dell'endotelio vascolare non sintetizzano LPL. La LPL endoteliale viene sintetizzata dalle cellule parenchimali dei tessuti e poi traslocata al suo sito d'azione.

La LPL viene sintetizzata come precursore inattivo nel reticolo endoplasmatico rugoso delle cellule parenchimali, e dopo una serie di trasformazioni post-trascrizionali, è attivata, mediante progressive N-glicosilazioni, nell'apparato del Golgi, da dove è secreta in vescicole e avviata, o ai lisosomi, o alla superficie cellulare, dove va a legarsi all'eparansolfato dei proteoglicani. Infine, in presenza di fattori stimolanti, come l'eparina, la LPL viene trasportata sulla superficie dell'endotelio vasale, dove si lega alla parte terminale dei proteoglicani. Nel lume vasale la LPL agisce sulla componente trigliceridica delle lipoproteine in circolo, soprattutto quelle ricche in trigliceridi (chilomicroni e VLDL), generando di- e monogliceridi, acidi grassi liberi e IDL. Dopo l'idrolisi, i chilomicroni, resi remnants, sono trasportati nel fegato, dove uno specifico recettore riconosce la propria ApoE, rendendone possibile la metabolizzazione a livello degli epatociti. In genere, tutti i chilomicroni scompaiono dal circolo ematico 12–14 ore

dopo un pasto ricco in grassi. Le VLDL, in seguito all'azione idrolitica della LPL, vengono trasformate in IDL, per poi dare origine alle LDL.

La LPL richiede, per la sua ottimale attività, sia in vitro sia in vivo, la presenza dell'ApoCII, parte integrante delle lipoproteine ricche in trigliceridi. In vitro la LPL può idrolizzare i suoi substrati anche in assenza di ApoCII, ma l'enzima esibisce una velocità di catalisi molto ridotta. Diversi studi hanno evidenziato che la formazione del complesso lipasi-attivatore determina una riorganizzazione conformazionale dell'enzima, in modo che il substrato diventa maggiormente disponibile per l'idrolisi, rendendo così più efficiente l'azione della LPL. L'attivazione della LPL da parte del suo cofattore è inibita da elevate forze ioniche, indicando l'esistenza di interazioni di natura elettrostatica tra queste proteine. Grazie alla combinazione di tecniche morfologiche, chimiche e biochimiche, è stato possibile dimostrare che il legame dei chilomicroni e delle VLDL alle molecole di LPL endoteliale è mediato da una specifica interazione tra ApoCII ed enzima. Questa reazione implica l'interazione tra i residui di carica negativa presenti sul dominio C-terminale dell'ApoCII e quelli di carica positiva della LPL. Più molecole di LPL possono agire simultaneamente sulle particelle lipoproteiche, aumentando così la velocità di idrolisi dei trigliceridi.

L'espressione e l'attività della LPL sono correlate allo stato metabolico e nutrizionale dei tessuti. A tal proposito, si parla di regolazione tessuto-specifica della LPL. Per esempio, durante il periodo di allattamento si assiste ad un marcato aumento dell'attività della LPL nella ghiandola mammaria e a una sua corrispondente diminuzione nel tessuto adiposo. In fase post-prandiale, la LPL è attiva nel tessuto adiposo, mentre è inattiva nei tessuti muscolare e cardiaco. A digiuno la situazione è inversa, aumentando l'attività della LPL in questi tessuti e diminuendo quella nel tessuto adiposo.

L'aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo cui si assiste nel periodo post-prandiale è da associarsi all'aumentata secrezione di

insulina che si ha in seguito ad un apporto di alimenti. In particolare, la somministrazione di un pasto ad alto contenuto di carboidrati determina un rapido incremento dell'attività della LPL del tessuto adiposo. Nell'uomo, l'effetto acuto di un carico di glucosio sull'attività della LPL del tessuto adiposo induce un rapido aumento dell'attività dell'enzima, mentre la somministrazione di olio di mais non determina nessuna variazione significativa dell'attività enzimatica della LPL. Secondo alcuni autori, l'ingestione di grassi potrebbe attutire notevolmente la risposta insulino- e glucosio-dipendente della LPL del tessuto adiposo. Inoltre, anche la quantità, il grado di insaturazione e la lunghezza della catena degli acidi grassi della dieta potrebbero influenzare l'attività della LPL.

L'insulina è uno dei più potenti regolatori noti della LPL. L'ormone stimola l'enzima tramite diversi meccanismi e, se solo uno di questi risulta alterato, ne consegue una ridotta clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi. L'insulina può influenzare, in maniera diversa, ciascuna delle fasi implicate nell'espressione dell'attività dell'enzima, quali la trascrizione del gene, la sintesi dell'mRNA, le fasi di trasporto e traduzione, così come può indurre modifiche post-trascrizionali (glicosilazione, attivazione o inattivazione) e influenzare anche la fase di secrezione dell'enzima.

Studi in vitro, effettuati su adipociti isolati di ratto, trattati con insulina, hanno dimostrato che l'ormone può stimolare anche la produzione di mRNA della LPL e incrementarne la velocità di sintesi, suggerendo che l'attività della LPL sia controllata quasi esclusivamente a livello trascrizionale. Diversamente, esperimenti eseguiti su tessuto adiposo intatto e su adipociti isolati di ratto hanno evidenziato che l'insulina stimola l'attività della LPL anche in presenza di inibitori della sintesi di RNA (α -amanitina) e della sintesi proteica (cordicepina), implicando così un meccanismo di regolazione dell'attività della LPL da parte dell'insulina esclusivamente a livello post-trascrizionale e post-traduzionale.

Oltre all'insulina, anche l'adrenalina e la noradrenalina influenzano l'attività della LPL nel tessuto adiposo. Questi ormoni sembrano essere responsabili di una diminuzione dell'attività della LPL, inattivando l'enzima prima del suo rilascio dall'adipocita. Un effetto simile sembra sia esercitato dagli ormoni estrogeni, i quali, in studi condotti su animali, si sono dimostrati responsabili di una diminuzione dell'attività della LPL e dei livelli di mRNA della LPL del tessuto adiposo. Anche nell'uomo gli estrogeni sembrano ridurre in maniera significativa l'attività della LPL sia nel plasma sia nel tessuto adiposo. Diversamente, l'iniezione in vivo di glucocorticoidi determina un aumento dell'attività della LPL nel tessuto adiposo. Inoltre, in studi effettuati su adipociti isolati di ratto, questi ormoni sembrano potenziare l'effetto dell'insulina sulla sintesi dell'enzima, in particolare a livello della sintesi dell'mRNA. Il GH sembra determinare un aumento sia dell'espressione dell'mRNA sia dell'attività della LPL del tessuto adiposo.

I metodi finora valicati per la valutazione della LPL nell'uomo sono piuttosto complessi, e pertanto non possono essere proposti per la routine clinica, dovendo essere riservati a casi selezionati in cui il sospetto diagnostico sia tale da giustificare questo tipo di indagini.

Innanzitutto, è possibile misurare sia la massa che l'attività della LPL. La misurazione della massa ha il grosso svantaggio di non fornire indicazioni circa l'attività dell'enzima, che è l'informazione che più interessa dal punto di vista fisiopatologico. Per il dosaggio della massa della LPL nel plasma si usano metodi immunologici, i quali, utilizzando l'enzima purificato e anticorpi monoclonali, sfruttano la reazione antigene-anticorpo. I metodi immunologici includono soprattutto quelli radioimmunoenzimatici (EIA o ELISA) e quelli immunofluorescenti (DELFA).

L'attività della LPL può essere misurata in diversi campioni biologici, come plasma, tessuto adiposo e tessuto muscolare. Una delle fonti più utilizzate, per la sua minore invasività, è senza dubbio il plasma post-eparinico. La somministrazione endovenosa di eparina promuove il

rapido rilascio della LPL in circolo come complesso enzima-eparina altamente stabile. L'attività della LPL può essere misurata nel plasma anche senza stimolo di eparina (plasma pre-eparinico) ma la scarsa sensibilità del metodo fa sì che i dati ottenuti non siano molto attendibili. Inoltre, non è ancora ben chiaro il significato funzionale della quota di LPL fisiologicamente presente libera in circolo.

Poiché l'attività della LPL dei diversi organi e tessuti è regolata in maniera diversa, gli studi di regolazione enzimatica richiedono a volte misurazioni dirette dell'attività dell'enzima in campioni di tessuto (adiposo, muscolare). Per questo scopo si può ricorrere a campioni agobiottici di tessuto, i quali vengono sottoposti a un processo di omogeneizzazione o essiccati e ridotti in polvere con acetone/etere e poi risolubilizzati in buffer a pH 8. Gli estratti così ottenuti sono poi utilizzati per valutare l'attività totale della LPL. Inoltre, i campioni agobiottici di tessuto possono essere incubati in buffer contenenti eparina per la determinazione dell'attività della LPL rilasciata dall'eparina, che è una stima della capacità del tessuto di rilasciare l'enzima sotto stimolo di eparina.

La misurazione dell'attività della LPL tiene conto del fatto che l'enzima agisce sulla componente trigliceridica delle lipoproteine plasmatiche. Attualmente, la valutazione dell'attività catalitica della LPL viene effettuata valutando il rilascio dei prodotti della reazione di idrolisi e, in particolare, degli acidi grassi che si liberano dai trigliceridi per azione dell'enzima. Le tecniche più comunemente utilizzate a tal fine includono metodi titolometrici, radioisotopici, fotometrici, fluorometrici ed enzimatici. Tuttavia, tali metodiche non sempre garantiscono una buona riproducibilità dei risultati e una buona sensibilità di analisi. Quelli maggiormente utilizzati in assoluto, in quanto offrono una maggiore sensibilità, prevedono l'uso di un substrato radioattivo, in genere di una miscela emulsionata di trioleina marcata radioisotopicamente e non marcata, che rende possibile isolare e quantizzare gli acidi grassi liberati per azione idrolitica dell'enzima.

Nell'uomo sono state identificate oltre cento mutazioni naturalmente presenti nel gene della LPL. Una sola variante, identificata come Ser447X, è associata ad un aumento dell'attività della LPL, ed è riscontrata in oltre il 20% della popolazione generale. Sono note altre mutazioni che riducono l'attività delle LPL; tra queste, la variante Asn291Ser in eterozigosi (presente nel 2-5% della popolazione caucasica) determina un incremento della concentrazione dei trigliceridi nel plasma di circa il 31% e una severa diminuzione del colesterolo HDL. Un marcato deficit di attività della LPL, risultante da mutazioni omozigoti o eterozigoti composte, determina l'insorgere del fenotipo tipico della sindrome chilomicronemica.

LPL, INSULINORESISTENZA E DIABETE

Essendo la LPL un enzima la cui attività è regolata principalmente dall'insulina, è facile dedurre che alterazioni della sua attività possano essere presenti in tutte le condizioni caratterizzate o da un deficit più o meno assoluto dell'ormone (diabete mellito tipo 1 all'esordio) o da insulinoresistenza (obesità, diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica). In tutte queste condizioni, la ridotta attività della LPL si associa ad un aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi. Alcuni studi hanno dimostrato che, in pazienti con diabete tipo 1 all'esordio o di tipo 2, l'attività catalitica della LPL è ridotta sia nel plasma post-eparinico sia nel tessuto adiposo. Inoltre, successivi trattamenti di questi pazienti con insulina e, più in generale, farmaci capaci di migliorare il controllo glicemico, inducono un aumento dell'attività della LPL coincidente con una riduzione dei trigliceridi plasmatici. Alcuni studi suggerirebbero inoltre che anche l'iperglicemia può avere una certa influenza, sebbene sicuramente di secondaria importanza, nella regolazione dell'attività dell'enzima.

APOCII ED ALTRI MEDIATORI DELL'ATTIVITA' DELLA LPL

Sebbene il substrato principale della LPL siano i trigliceridi, associati ai chilomicroni e alle VLDL, anche i fosfolipidi sono idrolizzati da questo enzima. La LPL, per la sua normale funzione, è dipendente dall'attivazione dell'ApoCII, sia in vivo che in vitro. Le interazioni tra enzima e ApoCII sono state dimostrate con tecniche monolayer e con l'uso di frammenti addensati di ApoCII. Approfondite analisi con frammenti peptidici sintetici e nativi di ApoCII hanno permesso di rilevare regioni distinte nella sequenza di 78 aminoacidi dell'attivatore. Per questi studi sono state utilizzate vescicole contenenti trigliceridi miscelati in un monolayer di fosfatidilcolina, andando ad analizzare l'attivazione della LPL da parte dell'ApoCII e di alcuni suoi frammenti sintetici. Si è inoltre potuto determinare la minima sequenza di ApoCII richiesta per la sua azione e identificare le sue regioni funzionalmente basilari.

L'importanza dei fosfolipidi nella attivazione della LPL da parte dell'ApoCII è nota da diverso tempo, così come il fatto che la LPL idrolizzi i fosfolipidi in presenza di diversi tipi di lipoproteine, ma pochi sono gli studi pubblicati riguardo i frammenti lipoproteici. In uno studio pubblicato nel 2000 un gruppo di ricerca ha determinato gli effetti dell'ApoCII e di altre apoproteine sull'idrolisi dei fosfolipidi mediata dalla LPL. Questa reazione è stata valutata in un modello vescicolare, utilizzando frammenti nativi e sintetici delle apoproteine in studio.

INIBIZIONE DELLA PROTEINA LPL APOCIII-MEDIATA

L'ApoCIII è una proteina di 79 aminoacidi sintetizzata a livello epatico e intestinale, e rappresenta una componente strutturale di chilomicroni, VLDL e HDL. La concentrazione plasmatica di ApoCIII correla positivamente con i livelli plasmatici di trigliceridi, e studi di perfusione epatica hanno dimostrato che questa apoproteina inibisce la captazione epatica delle TRL e dei loro remnants, mentre esperimenti in vitro hanno mostrato che l'ApoCIII inibisce l'attività della LPL e dell'HL.

L'ApoCIII è composta da due frammenti, A e B. Solo il frammento B lega i lipidi e possiede un'azione inibitoria sull'attività della LPL pari all'intera ApoCIII0 o ApoCIII1, mentre il frammento A non lega i lipidi e non possiede effetti inibitori sull'enzima. Il ruolo dell'ApoCIII nel metabolismo plasmatico delle TRL è stato meglio definito dai risultati ottenuti su animali transgenici. In particolare, l'accumulo plasmatico di TRL in topi che overesprimono hAPOCIII si è dimostrato essere associato con una ridotta clearance plasmatica di VLDL e chilomicroni remnants, apparentemente da attribuire alla riduzione del legame delle TRL al recettore LDL e ai proteoglicani eparansolfato.

EFFETTI DI ALTRE APOPROTEINE SULL'ATTIVITA' DI LPL

L'ApoAI, l'ApoAII e l'ApoCI inibiscono l'idrolisi dei substrati fosfolipidici da parte della LPL. L'ApoAII ha una potenza inibitoria superiore a quella dell'ApoAI. Non si sono rilevati incrementi della potenza inibitoria a concentrazioni maggiori. Tuttavia il più potente inibitore dell'attività di idrolisi dei fosfolipidi della LPL è l'ApoCI.

CORRELAZIONE TRA APOCII, APOCIII E CHD

Le lipoproteine ricche in trigliceridi (TRL) comprendono diversi gruppi di particelle nascenti e metabolicamente modificate, che differiscono per dimensioni, densità, contenuto in lipidi e in apoproteine. Elevati livelli plasmatici di trigliceridi si sono dimostrati un fattore di rischio per malattia coronarica (CHD). Gli indici ApoC-correlati (che comprendono i livelli di ApoCII, il rapporto ApoCII/TG, il rapporto ApoCII/ApoCIII, i livelli di ApoCIII in VLDL + LDL, i livelli di ApoCIII in HDL), sono stati proposti per riflettere il metabolismo dei trigliceridi, e quindi per stimare la loro associazione con l'aterosclerosi e le sue manifestazioni cliniche. Questa correlazione è supportata da un notevole numero di evidenze. In particolare si è dimostrato che l'ApoCII e l'ApoCIII sono coinvolte nella conversione metabolica delle differenti classi di lipoproteine. Si è già ricordato il ruolo fondamentale dell'ApoCII come attivatore della LPL

ed il ruolo di questo enzima nel metabolismo delle TRL. Stranamente, però, elevati livelli ematici di ApoCII correlano inversamente con l'attività della LPL. D'altro canto, l'ApoCIII previene la rimozione precoce delle TRL dal circolo ematico ostacolandone l'interazione con i recettori epatici. Come risultato, le concentrazioni di ApoCII e ApoCIII risultano strettamente legate al normale trasporto e metabolismo lipidico e molto probabilmente loro alterazioni rappresentano uno dei meccanismi delle patologie di questi processi.

Diverse misure e indici correlate alle ApoCII e ApoCIII sono state avvalorate per la loro correlazione con CHD. Ad esempio, l'ApoCIII in VLDL + LDL è associata con la presenza di CHD in studi caso-controllo, ed è stato attribuito ad essa un valore predittivo di progressione di patologia coronarica. Di contro, l'ApoCIII in HDL è inversamente correlata con la progressione della patologia aterosclerotica e delle sue complicanze. Anche l'ApoCII è associata alla presenza di CHD in studi caso-controllo, e in più si è riscontrata un'associazione tra rapporto ApoCII/TG e CHD, e rapporto ApoCII/ApoCIII e arteriopatie periferiche. In uno studio caso-controllo, alcuni autori hanno stimato un rischio di 2,30 di ricorrenza di eventi coronarici nei più alti contro i più bassi quintili di ApoCIII in VLDL + LDL. Questi autori concludono che le concentrazioni di particelle VLDL e ApoCIII in VLDL + LDL, diversamente dai livelli di TG, sono un migliore indice di predittività di CHD.

La distribuzione di ApoCIII tra HDL e VLDL + LDL è un marcatore del metabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi. Un elevato livello di ApoCIII in HDL indica una recente clearance di chilomicroni e VLDL, laddove un'alta concentrazione di ApoCIII in VLDL + LDL potrebbe inibire l'attività della lipasi lipoproteica e prolungare il tempo di permanenza di chilomicroni, VLDL e loro remnants, incrementando di conseguenza l'esposizione della parete arteriosa alle particelle aterogene.

In conclusione, si può affermare che l'ApoCII è un attivatore della LPL anche su substrati non trigliceridici (fosfolipidi). Comunque, l'incremento di attività enzimatica dovuto all'ApoCII è maggiore quando il substrato dell'enzima è un trigliceride. Si è inoltre visto che i frammenti peptidici 30-78, 43-78, 50-78 e 55-78 hanno una potenza di attivazione enzimatica comparabile a quella dell'ApoCII nativa. Tutto ciò suggerisce che l'iniziale interazione dell'ApoCII mediata dal tetrapeptide C-terminale promuove un corretto allineamento dell'ApoCII con la LPL, seguito da una debole interazione tra il dominio attivatore dell'ApoCII con il sito attivatore della LPL, inducendo il processo di lipolisi.

I risultati dello studio dimostrano che gli aminoacidi di attivazione non sono inclusi nel frammento 60-68. Il frammento 30-78 possiede la stessa potenza di attivazione dell'intera ApoCII nativa. Questo in accordo con studi precedenti che hanno mostrato la capacità di attivazione della LPL da parte del terzo C-terminale della molecola, e che cinque residui in questa porzione dell'ApoCII umana sono essenziali per l'attivazione dell'enzima.

L'ApoCIII0 e l'ApoCIII1 possiedono lo stesso effetto inibitore sulla LPL. Solo il frammento B è in grado di legare i lipidi e inibire l'enzima. La metà saccaridica dell'ApoCIII è legata al residuo aminoacidico 74 e sembra consistere in 1 mole di galattosio, 1 mole di N-acetilgalattosamina e 2, 1 o 0 moli di acido sialico (rispettivamente ApoCIII2, ApoCIII1 e ApoCIII0). Lo stesso effetto inibitore è ottenuto con l'ApoCIII1, ApoCIII0 e con il frammento B 41-79 di ApoCIII1. Ciò implica che l'intera metà saccaridica e i primi 40 aminoacidi non sono necessari per l'inibizione dell'attività enzimatica della LPL.

Anche le molecole ApoAI, ApoAII e ApoCI hanno un effetto inibitore sulla LPL, e questo effetto si presenta anche con substrati non trigliceridici, sebbene con i trigliceridi, in comparazione con i fosfolipidi, l'inibizione risulta 5 e 2 volte maggiore rispettivamente per ApoAI e ApoAII alle concentrazioni di 0,5 $\mu\text{mol/l}^{-1}$.

Diversi studi hanno confermato che la LPL possiede una sequenza di superficie che ricopre il sito catalitico, che potrebbe modulare l'accesso del substrato al sito attivo dell'enzima. È stato dimostrato che questa sequenza di rivestimento è essenziale per l'idrolisi dei substrati della LPL contenenti acidi grassi a catena lunga, e che l'interazione tra i substrati lipoproteici e le molecole anfipatiche all'interno di questa sequenza potrebbe in parte determinare la specificità di substrato delle lipasi.

APOAV

Un locus genetico fondamentale per il metabolismo delle lipoproteine, denominato apolipoprotein gene cluster, è identificato sul cromosoma 11, in posizione 11q23, in un intervallo genomico di circa 60 kb. In questo intervallo sono localizzati i geni che codificano per le apoproteine ApoAI, ApoCIII, ApoAIV. Nella specie umana, l'analisi delle varianti nelle sequenze genomiche intorno ai primi tre di questi geni ha dimostrato, in numerosi studi, la loro stretta correlazione con le variazioni dei livelli dei lipidi ematici. Del ruolo dell'ApoCIII si è già detto in precedenza, ma merita di essere sottolineato il fatto che variazioni nel gene ApoCIII sono primariamente associate con alterate concentrazioni plasmatiche di trigliceridi. In questo gene, due rari alleli nella regione promoter (-482C→T e -455 T→C) e un allele minore nel 3'UTR (polimorfismo SstI, 3238G→C) sono stati ripetutamente associati con elevati livelli trigliceridemicici.

Recentemente, è stato identificato un quarto membro genetico di questa regione, l'ApoAV dell'apolipoprotein gene cluster localizzato sul cromosoma 11, approssimativamente 27 kb distalmente all'ApoAIV e a 37 kb dall'ApoCIII. Il prodotto di questo gene, l'apoproteina ApoAV, è una proteina di 366 aminoacidi sintetizzata a livello epatico e secreta nel plasma dove, nei soggetti normolipidemicici, è associata con VLDL e HDL. Un significativo numero di studi su soggetti umani e in modelli murini ha dimostrato che l'ApoAV influenza i livelli plasmatici dei

trigliceridi. Più specificamente, topi transgenici che overesprimono il gene ApoAV hanno livelli plasmatici di trigliceridi ridotti rispetto a quelli dei topi controllo di circa il 66%, mentre topi con deficit genetico di ApoAV sviluppano ipertrigliceridemia. Inoltre, la overespressione adenovirale di ApoAV nei topi riduce drasticamente i livelli di trigliceridi e colesterolo. Nell'uomo, questa determinante connessione tra ApoAV e trigliceridi è ulteriormente confermata dalle numerose associazioni genetiche tra polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP) dell'ApoAV e livelli plasmatici di trigliceridi. Inoltre, recenti studi hanno stabilito ulteriori correlazioni tra varianti genetiche di ApoAV e lipidi, apoproteine, e subfrazioni lipidiche. Vi sono anche dati preliminari che lasciano supporre che le variazioni nel gene ApoAV possano anche influenzare il rischio di infarto miocardico e altre patologie cardiovascolari. Infine, gli agonisti del PPAR α hanno un noto effetto ipotrigliceridemizzante, e recenti studi hanno mostrato che il gene ApoAV è altamente up-regolato da PPAR α e FXR.

Indagando i meccanismi con cui l'ApoAV agisce o sul metabolismo dei lipidi, accelerando il catabolismo delle VLDL tramite l'attivazione della lipolisi e promuovendo la rimozione delle VLDL dal plasma, o sul sistema epatocita/enterocita modulando l'assemblaggio e la secrezione delle TRL, o su entrambi questi compartimenti. In aggiunta, l'ApoAV attiva direttamente la LPL attraverso un'interazione fisica. In una condizione di iperlipidemia, l'ApoAV influisce inoltre sui livelli di colesterolo delle lipoproteine contenenti ApoB, e in fase postprandiale previene l'elevazione dei livelli di trigliceridemia in risposta a un carico di grassi. Nel plasma di soggetti umani, di ratti e di topi, l'ApoAV si trova principalmente come componente delle HDL, anche se la sua concentrazione è molto più bassa rispetto alle altre apoproteine (ApoAI e ApoAIV), e rispetto a quella del principale attivatore della LPL, l'ApoCII. Nei modelli animali si è dimostrato che la soverespressione del gene ApoAV incrementa l'attività della LPL nel plasma posteparinico e accelera il turnover dei trigliceridi VLDL. Queste osservazioni

suggeriscono che l'ApoAV agisce come modulatore stimolante l'idrolisi dei trigliceridi LPL mediata indotta dall'ApoCII. Se le piccole quantità di ApoAV contenute nel plasma umano in condizioni fisiologiche siano capaci da sole di promuovere l'attivazione della LPL rimane comunque ancora da stabilire.

L'APOAV ACCELERA IL TURNOVER DEI TRIGLICERIDI DELLE VLDL

Il marcato decremento dei trigliceridi nei topi transgenici con hApoA5 precedentemente descritto suggerisce che l'ApoAV possa influenzare sia la secrezione che la clearance delle VLDL. Per chiarire questo meccanismo, sono stati misurati i trigliceridi VLDL utilizzando il metodo Triton WR1339 in topi wild type e in topi transgenici con hApoAV. Si è riscontrato che la velocità di secrezione dei trigliceridi nel plasma da parte del fegato era equivalente in entrambe le linee murine. Successivamente si è studiata la clearance dei trigliceridi VLDL attraverso l'iniezione di trigliceridi VLDL marcati con ^3H nei ceppi wild type e in quelli transgenici e si è riscontrata una rimozione più rapida dei trigliceridi marcati dalla circolazione del ceppo transgenico rispetto a quella dei controlli.

L'APOAV STIMOLA L'ATTIVITA' DELLA LPL

Per chiarire se la stimolazione della clearance dei trigliceridi fosse da attribuire ad un incremento della lipolisi, si è determinata l'attività lipasica nel plasma post-eparinico dei topi transgenici con hApoAV confrontandola con quella dei controlli. Usando substrati con trioleina marcata, si è riscontrato un aumento del 20% di attività della LPL nel plasma post-eparinico negli animali transgenici rispetto ai controlli.

Si è inoltre determinato l'effetto dell'ApoAV sull'attività della LPL in vitro tramite l'arricchimento di particelle VLDL con proteina ApoAV ricombinante, e si è riscontrato un aumento del 50% di attività della LPL

nelle particelle arricchite con l'apoproteina ricombinate rispetto alle non arricchite.

Per verificare in che modo l'ApoAV ricombinante possa stimolare l'attività della LPL, si è successivamente analizzata l'interazione dell'ApoAV con la LPL e i proteoglicani eparansolfato (HSPG) attraverso la tecnologia Biorad 3000. Non è stata riscontrata nessuna interazione con gli HSPG, mentre si è riscontrata una interazione fisica ad elevata affinità sia con LPL ricombinante che con LPL bovina purificata. Questi dati sono poi stati confermati con metodica ELISA. Questa interazione potrebbe rappresentare una spiegazione plausibile di come l'ApoAV ricombinante eserciti il suo effetto di stimolazione dell'attività della LPL.

L'APOAV RIDUCE I LIVELLI DI APOCIII E APOB

Per accertare che l'attivazione dell'idrolisi delle TRL effettuata dalla LPL si accompagni ad un incremento della rimozione delle particelle VLDL, si sono studiati i livelli di ApoCIII e ApoB nei topi transgenici con hApoAV e nei controlli wild type, riscontrando un decremento di entrambe queste apoproteine nei ceppi transgenici rispetto ai livelli misurati nei controlli, fatto questo che suggerisce come la overespressione di hApoAV induca anche un decremento numerico delle VLDL.

La overespressione di hApoAV in topi transgenici con hApoCIII migliora l'iperlipidemia. Per approfondire lo studio degli effetti dell'ApoAV sui lipidi, si sono incrociati modelli murini iperlipidemici con hApoCIII con topi transgenici con hApoAV. Si è riscontrato un decremento del 55% dei livelli plasmatici di trigliceridi nei topi che esprimono entrambi i geni rispetto ai controlli con il solo hApoCIII, così come risultano ridotti anche i livelli di colesterolo totale, un effetto prima non riportato con i topi transgenici con il solo hApoAV.

In seguito, campioni di plasma sono stati frazionati tramite FPLC rivelando che questo decremento dei livelli di trigliceridi era di

pertinenza delle VLDL, e che quello dei livelli di colesterolo era da attribuire alla componente delle sole lipoproteine ApoB.

Andando a valutare le sole frazioni proteiche, si è visto che i topi doppiamente transgenici (che esprimevano entrambi i geni hApoCIII e hApoAV) avevano un marcato decremento del 60% dei livelli di ApoCIII e del 65% dei livelli di ApoB, rispetto ai controlli con il solo gene hApoCIII.

Una ulteriore conferma si è ottenuta dosando i livelli di trigliceridi dopo iniezione di eparina nei topi transgenici con il doppio gene e in quelli con il solo gene hApoCIII. Nei primi, a 5 minuti dall'iniezione di eparina, i livelli plasmatici dei trigliceridi erano ridotti del 72%, contro un decremento del solo 46% riscontrato nei secondi.

Questi dati confermano gli effetti di riduzione dell'ApoAV sui trigliceridi in modelli aggiuntivi, e supportano l'ipotesi che l'ApoAV possa anche ridurre i livelli di colesterolo durante fasi di iperlipidemia nei topi attivando sia la lipolisi che la rimozione delle VLDL.

RISPOSTA POST-PRANDIALE DEI TRIGLICERIDI

Per determinare se l'ApoAV influenzi l'incremento dei valori di trigliceridi plasmatici nel periodo post-prandiale, topi wild type e transgenici con hApoAV hanno ricevuto un singolo bolo di olio di semi di girasole. Trascorso un periodo di 6 ore, i livelli plasmatici di trigliceridi nel ceppo wild type mostravano un incremento post-prandiale con un picco a 3 ore dalla somministrazione dell'olio, mentre si osserva una risposta post-prandiale dei livelli di trigliceridi plasmatici più modesta nei topi transgenici con hApoAV.

Per approfondire il meccanismo con cui l'ApoAV influisce sulla risposta post-prandiale, si è valutato questo parametro nei topi transgenici con hApoAV e hApoCIII, determinando la distribuzione dei trigliceridi, l'ApoAV e l'ApoCIII nelle frazioni lipoproteiche al tempo 0 ed al picco della terza ora. Per fare ciò, due campioni di plasma prelevati al tempo 0 e a 3 ore sono stati frazionati tramite FPLC e si sono dosati i

parametri sopra detti in tutte le frazioni. Con questo modello si è visto che, a 3 ore dal carico di grassi, l'incremento dei trigliceridi nei topi transgenici per entrambi i geni era molto ridotto rispetto a quello riscontrato nei topi con il solo gene hApoCIII. L'ApoAV non sembrava avere variazioni di concentrazione nelle due popolazioni tra il tempo zero e la terza ora. Tuttavia, mentre al tempo zero l'ApoAV era presente prevalentemente nelle frazioni HDL, alla terza ora veniva ridistribuita e riscontrata principalmente nelle frazioni VLDL. Queste variazioni di concentrazione non si sono invece riscontrate per l'ApoCIII, che si incrementa nelle TRL come atteso in risposta a un carico di grassi. Questi dati forniscono evidenze di uno shift dell'ApoAV dalle HDL alle TRL in seguito a un bolo di grassi.

Da questa serie di dati si può concludere che l'ApoAV gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo lipoproteico, in particolare delle TRL, come dimostrato dal fatto che in topi transgenici con hApoAV la clearance di VLDL marcate con ^3H è significativamente aumentata. Inoltre questa azione è da attribuire alla stimolazione dell'attività idrolitica della LPL da parte dell'ApoAV, come dimostrano i dati sui campioni di plasma post-eparinico. Dai dati ottenuti dallo sviluppo di una LPL e un'ApoAV ricombinanti si è visto che l'attività lipasica su VLDL arricchite con ApoAV è molto aumentata e che questo aumento dipende da una interazione fisica tra enzima e apoproteina.

L'azione dell'ApoAV non sembra però limitarsi alle sole TRL e quindi alla semplice stimolazione della LPL, come dimostra il fatto che anche i livelli di colesterolo totale, ApoB e ApoCIII sono significativamente ridotti nei topi transgenici con hApoAV. Inoltre, sembra che l'azione dell'ApoAV possa consistere anche in una inibizione dell'ApoCIII, come dimostrato dal fatto che i livelli dei parametri lipidici in topi transgenici con hApoCIII risultano molto ridotti nei topi doppiamente transgenici con hApoCIII e hApoAV.

Infine, l'ApoAV ha dimostrato un significativo effetto sull'iperlipidemia post-prandiale indotta dalla dieta, come dimostrato dalla drastica

riduzione del picco di concentrazione lipidica nel plasma dopo un bolo di grassi nei topi transgenici con hApoAV. Inoltre questi dati orientano verso l'ipotesi che questo effetto sia dovuto ad una stimolazione di un più rapido catabolismo dei trigliceridi derivati dalla dieta da parte dell'ApoAV, piuttosto che da un suo effetto inibitore sull'assorbimento, ipotesi supportata anche dal fatto che l'ApoAV non è espressa nell'intestino. Inoltre si è visto che nei topi doppiamente transgenici con hApoCIII e hApoAV si assiste ad uno shift dell'ApoAV, ma non dell'ApoCIII, dalle HDL alle TRL, e questo induce a pensare che l'ApoAV contrasti l'iperlipidemia ApoCIII indotta rendendo i chilomicroni e le VLDL dei migliori substrati per l'azione enzimatica della LPL e/o stimolando la loro clearance.

LPL E SINDROME CHILOMICRONEMICA

Questa malattia autosomica recessiva è dovuta a una grave alterazione o all'assenza di LPL, in conseguenza della quale i chilomicroni si accumulano ad un livello molto elevato nel plasma. La LPL è l'enzima deputato al catabolismo e alla rimozione dei trigliceridi e delle lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL e chilomicroni). I livelli di LPL sono nell'ambito della norma nella maggior parte dei pazienti con ipertrigliceridemia modesta (250 – 500 mg/dl). Mutazioni eterozigoti del gene della LPL sono presenti nel 5 – 10% dei soggetti con ipertrigliceridemia e l'attività della LPL può essere ridotta del 20 – 50% in questi individui. In caso di diabete mellito scarsamente controllato, obesità, eccessivo consumo di alcolici, terapia estrogenica e gravidanza, anche un difetto eterozigote della LPL si può manifestare con ipertrigliceridemia grave.

APOCII E IPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA

Questa rara malattia autosomica recessiva causa un deficit funzionale della LPL e le manifestazioni cliniche sono simili a quelle del deficit familiare di LPL. Il deficit di ApoCII impedisce l'idrolisi dei chilomicroni e

delle VLDL, cosicché entrambe queste lipoproteine si accumulano nel sangue. Gli eterozigoti presentano livelli dimezzati rispetto alla norma di ApoCII, possono avere una modesta elevazione dei trigliceridi e sono asintomatici. E' significativo segnalare che tale patologia, seppur particolarmente rara, sembra avere un cluster di aggregazione nelle popolazioni dell'Italia meridionale ed in Sicilia in particolare, in quanto più casi segnalati in letteratura avevano una tale origine o discendenza.

APOAV E IPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA

Molto di recente è stato confermato nell'uomo il ruolo che i precedenti studi su modelli animali avevano attribuito all'ApoAV nella regolazione della attività della LPL. È stato descritto un soggetto in cui si riscontravano le classiche caratteristiche della sindrome chilomicronemica familiare, in cui il determinante della malattia è una mutazione patogenetica nel gene ApoAV. Il soggetto era portatore di una proteina ApoAV troncata di 144 aminoacidi (circa il 40% della proteina normale). Tale proteina, se sintetizzata e secreta, è verosimilmente priva di alcuna funzione biologica, perché mancante della regione compresa tra i residui 171 e 245, che contiene tre regioni anfipatiche ad α -elica, altamente idrofobiche, le quali sono responsabili, nella proteina normale, della interazione con le molecole lipidiche, e perciò ricoprono un ruolo chiave nella funzione dell'ApoAV. Estendendo l'analisi genetica a tutti i membri della famiglia del soggetto, si sono riscontrati dieci soggetti portatori del difetto genetico, ma solo cinque di questi avevano livelli plasmatici di trigliceridi superiori a 1,17 mmol/l. Questi risultati suggeriscono che altri determinanti genetici e/o fattori non genetici sconosciuti contribuiscono all'aumento dei trigliceridi plasmatici nei soggetti eterozigoti per l'ApoAV mutata, così come avviene nei soggetti eterozigoti per mutazioni della LPL in cui i livelli plasmatici di trigliceridi a digiuno possono essere compresi nell'intervallo normale o solo modestamente aumentati. La variabilità dei trigliceridi plasmatici nei portatori di ApoAV mutata non può essere

spiegata dall'influenza dei comuni polimorfismi dei geni candidati (ApoAV, ApoCIII, LPL e ApoE) sui livelli di trigliceridi. In ogni caso, l'attività LPL posteparinica riscontrata nei genitori del probando, che avevano una modesta ipertrigliceridemia, era nell'intervallo normale, così come quella riscontrata nel fratello, che aveva normali livelli trigliceridemicici.

NUOVI GENI CANDIDATI RESPONSABILI DI IPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA

Da quanto detto fin ora sembra abbastanza semplice riuscire a definire geneticamente una sindrome chilomicronemica familiare. I geni LPL, ApoCII e ApoAV sono direttamente coinvolti nella modulazione dei livelli di trigliceridi e nel metabolismo lipidico per cui eventuali forme mutate di questi geni si associano a patologie quali ipertrigliceridemia o chilomicronemia. Uno studio recente condotto da Hegele e collaboratori ha permesso di chiarire le frequenze delle mutazioni a carico di questi tre geni candidati per la diagnosi delle chilomicronemie. Sono stati reclutati 110 pazienti affetti da severa chilomicronemia e confrontati con altrettanti soggetti controllo. L'analisi di sequenza eseguita sui tre geni candidati sopra elencati ha permesso di fare diagnosi genetica soltanto su una piccola percentuale di questi pazienti. Molti soggetti risultavano portatori di varianti polimorfiche soprattutto a carico dei geni LPL e ApoAV che da sole non riuscivano a spiegare la severità della chilomicronemia. L'insieme di questi dati ha permesso di giungere alla conclusione che soltanto una modesta percentuale dei pazienti screenati (circa il 41%) presentava delle caratteristiche genetiche a carico dei geni LPL, ApoAV, ApoCII tali da giustificare l'ipertrigliceridemia. Il restante 59% circa rimaneva senza una diagnosi genetica. Da questi dati emerge chiaramente che le conoscenze in nostro possesso sui meccanismi del metabolismo dei trigliceridi e in generale delle lipoproteine ricche in trigliceridi sono ad oggi limitate. Evidentemente altri geni candidati ancora poco noti e studiati hanno un

ruolo altrettanto importante nel metabolismo dei trigliceridi e quindi nelle chilomicronemie. Attualmente l'attenzione della comunità scientifica si è posta su due nuovi geni candidati ancora non totalmente noti che potrebbero essere coinvolti nello studio delle chilomicronemie, il gene LMF-1 e il gene GPIHBP-1.

LMF-1

Come già visto, la lipoprotein lipasi (LPL) e la lipasi epatica dei trigliceridi (HL) sono enzimi altamente omologhi che svolgono un ruolo chiave nel metabolismo delle lipoproteine circolanti. La LPL è sintetizzata nei tessuti extraepatici e idrolizza il core di trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL circolanti. La HL è sintetizzata dalle cellule parenchimali epatiche e media la conversione dei remnants delle VLDL in LDL e delle HDL₂ in HDL₃. Inoltre, sia la LPL che la HL partecipano direttamente alla captazione delle particelle lipoproteiche da parte del fegato. La variabilità interindividuale nella attività di LPL e HL contribuisce alle variazioni del profilo lipidico dei diversi individui e potrebbe essere una componente del rischio cardiovascolare globale.

Il deficit combinato di lipasi (cld) è un disordine genetico recessivo identificato nei topi, che causa una severa e specifica carenza di attività di LPL e HL. I topi cld/cld sviluppano una severa iperchilomicronemia all'allattamento e muoiono entro 72 ore dalla nascita. Il cld rappresenta un prezioso strumento con il quale analizzare gli specifici fattori che regolano i livelli di attività di LPL e HL.

L'assenza di attività della LPL e della HL nel deficit cld è da attribuire ad un difetto nella maturazione post-traduzionale di questi enzimi. La massa plasmatica di LPL è marcatamente ridotta negli animali con mutazione cld (Jennifer C. Baedeker, 2007). La LPL appare normalmente tradotta nei tessuti adiposo, cardiaco, muscolare ed epatico degli animali con mutazione cld, ma non possiede attività biologica. I dati di immunofluorescenza sulla LPL di cellule cld suggeriscono una ritenzione dell'enzima nel reticolo endoplasmatico. Il

frazionamento in gradiente di sucrosio dimostra l'incorporazione della LPL in aggregati ad alto peso molecolare, suggerendo che la LPL non è correttamente ripiegata nelle cellule cld. Una possibilità è che una proteina chaperon necessaria per l'appropriato ripiegamento della LPL neosintetizzata sia assente o deficitaria nel topo cld/cld, determinando una ritenzione della LPL nel reticolo endoplasmatico a seguito del suo normale processo di controllo di qualità. Un potenziale candidato per questo ruolo di chaperon è la calnexina, i livelli della quale risultano ridotti nei microsomi delle cellule cld/cld. Accanto a questo meccanismo, è stato proposto uno specifico difetto del trasporto della LPL dal reticolo endoplasmatico al complesso di Golgi per spiegare la carenza di secrezione della LPL.

L'effetto della mutazione cld sulla HL è meno chiaro. Come la LPL, la HL sembra essere sintetizzata ad una normale velocità nelle cellule epatiche cld/cld. I dati di immunofluorescenza dimostrano una secrezione di HL dal fegato e dal surrene dei topi cld/cld, anche se presumibilmente la HL secreta è inattiva o rapidamente rimossa dalla circolazione, dato che in questi animali non è stata riscontrata alcuna significativa attività della HL a livello plasmatico.

Per chiarire il ruolo della calnexina nella mutazione cld, in un recente studio si sono esaminati gli effetti della catanospermina (CST), un inibitore della glucosidasi del reticolo endoplasmatico, sulla secrezione della LPL e della HL umane (hLPL e hHL) in cellule cld/cld e in cellule eterozigoti +/-cld. Nelle cellule normali, la CST determina una riduzione virtualmente identica nella secrezione di hLPL e hHL pari al $28\pm 7\%$ e al $30\pm 22\%$ dei valori normali, rispettivamente, suggerendo una identica necessità di attività glucosidasi nel reticolo endoplasmatico per la secrezione dei due enzimi. Nelle cellule cld/cld, gli effetti della CST sono simili per la hLPL e la hHL, ma sono significativamente minori rispetto a quelli riscontrati nelle cellule normali, essendo la secrezione ridotta al $57\pm 17\%$ per la hLPL e al $56\pm 23\%$ per la hHL rispetto ai valori normali. Questi risultati sono significativi per un effetto della mutazione

cld sulla funzione della calnexina, ma suggeriscono anche che altri processi glucosidasi-dipendenti potrebbero essere importanti per la secrezione delle lipasi.

Come già ricordato, a breve distanza dall'ingestione di latte alimentare, topi neonati cld/cld sviluppano una severa ipertrigliceridemia dovuta ad un accumulo di chilomicroni che gradualmente si ammassano nel lume dei capillari e dei sinusoidi. I topi mutati mostrano un aumento progressivo dei trigliceridi, da circa 1.000 mg/dl poche ore dopo la nascita a oltre 20.000 mg/dl dopo 48-72 ore. I topi eterozigoti per la mutazione (+/cld) hanno concentrazioni normali di trigliceridi e nessuna anomalia nota.

L'ipertrigliceridemia nei mutati cld/cld è caratterizzata da una severa chilomicronemia che è causata da una LPL deficitaria e ulteriormente esacerbata da un parziale difetto di HL. La mutazione, comunque, non riguarda né i geni strutturali di LPL e HL, né i livelli dei rispettivi mRNA e proteina sintetizzata. Piuttosto si interrompe la maturazione post-traduzionale dei polipeptidi delle lipasi nascenti che dovrebbe portare alle forme funzionalmente attive prodotte nel reticolo endoplasmatico. Ad esempio, gli adipociti del tessuto adiposo bruno isolati dai topi mutati cld/cld esprimono una normale quantità di LPL, ma mostrano meno del 10% di attività lipasica rispetto alle cellule eterozigoti per la mutazione. Similmente, per quanto la LPL sia in concentrazioni abbondanti in linee cellulari cld/cld immortalizzate in cui è stato inserito un costrutto sintetico di LPL umana, l'attività enzimatica risulta comunque assente, riflettendo un difetto nella maturazione della lipasi.

La mutazione cld è stata localizzata in una regione di 2,3 Mb del cromosoma 17 del genoma dei topi, regione contenente più di 150 geni. Tra questi, in un recente studio, sono stati selezionati i possibili geni candidati per il ruolo di cld, sulla base di annotazioni funzionali e di differenze di espressione nell'mRNA tra cellule cld/cld e cellule +/cld. Uno di questi candidati, il gene Tmem112, recupera completamente il fenotipo cld/cld ripristinando l'attività della LPL al livello delle cellule

eterozigoti +/cld. Tutti gli altri geni candidati non hanno mostrato questa capacità di recupero del fenotipo con carenza di attività lipasica, ma al contrario mostrano una bassa attività della LPL, sovrapponibile a quella delle cellule mutate omozigoti. L'espressione di Tmem112 determina un marcato incremento nella attività LPL specifica, così come un recupero della attività della HTGL, anch'essa deficitaria nelle cellule omozigoti per la mutazione cld/cld. In contrasto a questi dati, il Tmem112 ha uno scarso effetto sull'attività della lipasi pancreatica, un enzima della superfamiglia delle lipasi la cui attività è notoriamente normale anche nelle cellule cld/cld. Sulla base di questo ruolo nella maturazione della lipasi, questo gene è stato rinominato Lipase maturation factor 1 (LMF1) (Peterfly, 2007).

Il gene LMF1 presenta 11 esoni e copre 84 kb del cromosoma 17 del genoma dei topi. Per chiarire la natura della mutazione cld, è stata esaminata l'integrità del cDNA LMF1 delle linee cellulari cld/cld utilizzando la metodica RT-PCR (fig.3).

Sebbene l'amplificazione di porzioni interne del gene è andata a buon fine, i tentativi di amplificazione della regione 3' del cDNA LMF1 delle cellule cld/cld sono falliti. Utilizzando la metodica RACE si è inoltre esaminata l'estremità 3' del cDNA LMF1, e questa analisi ha indicato che la forma mutata presenta circa 400 bp in più. L'analisi della sequenza ha mostrato che, sebbene l'mRNA mutato codificato dagli esoni 1 – 7 era normale, la sequenza dei rimanenti esoni a valle (esoni 8 – 11) era assente. Il sostituto della sequenza mancante era una porzione dell'introne 7, seguito da una sequenza terminale lunga ripetuta (long terminal repeat, LTR) di un retrovirus murino endogeno (MuERV) contenente un sito di poliadenilazione. La presenza di un MuERV integrale nell'introne 7 dell'allele cld è stata confermata dal sequenziamento genomico.

Come indicato dai risultati RACE, l'immissione di un sito di poliadenilazione dovuto alla LTR inserita determina una interruzione precoce del trascritto LMF1. Come risultato, l'informazione genetica

mutata determina la produzione di un prodotto proteico troncato, mancante di 214 aminoacidi dalla porzione C-terminale. Di conseguenza, l'inserzione di un MuERV nell'introne 7 del gene ha ripercussioni strutturali e funzionali rilevanti sul prodotto proteico (fig.2).

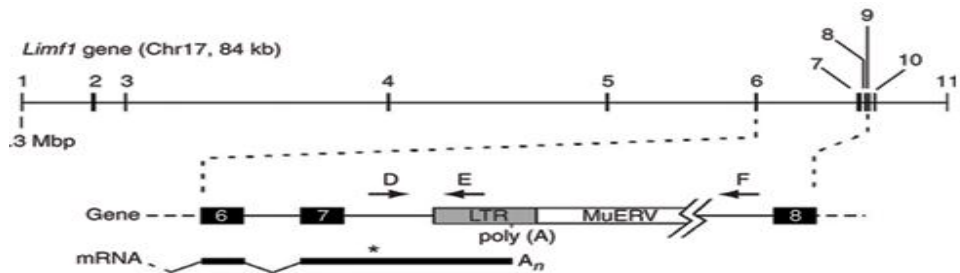


Fig.2- Rappresentazione schematica del gene LMF-1 e della mutazione cld

La proteina LMF1 contiene cinque domini transmembrana e un dominio evolutivamente conservato che comprende la maggior parte della porzione C-terminale, denominato come dominio dalla funzione sconosciuta 1222 (domain unknown function, DUF1222), che si ritrova in oltre 50 proteine che coprono un'ampia porzione della tassonomia, dai batteri alla specie umana.

Nessuna delle proteine contenenti questo dominio è stata caratterizzata dal punto di vista funzionale. L'mRNA cld aberrante codifica una proteina che manca della metà C-terminale del dominio DUF1222 e che presenta un'aggiunta di 14 aminoacidi dovuta all'inclusione di una porzione dell'introne 7 (fig.3).

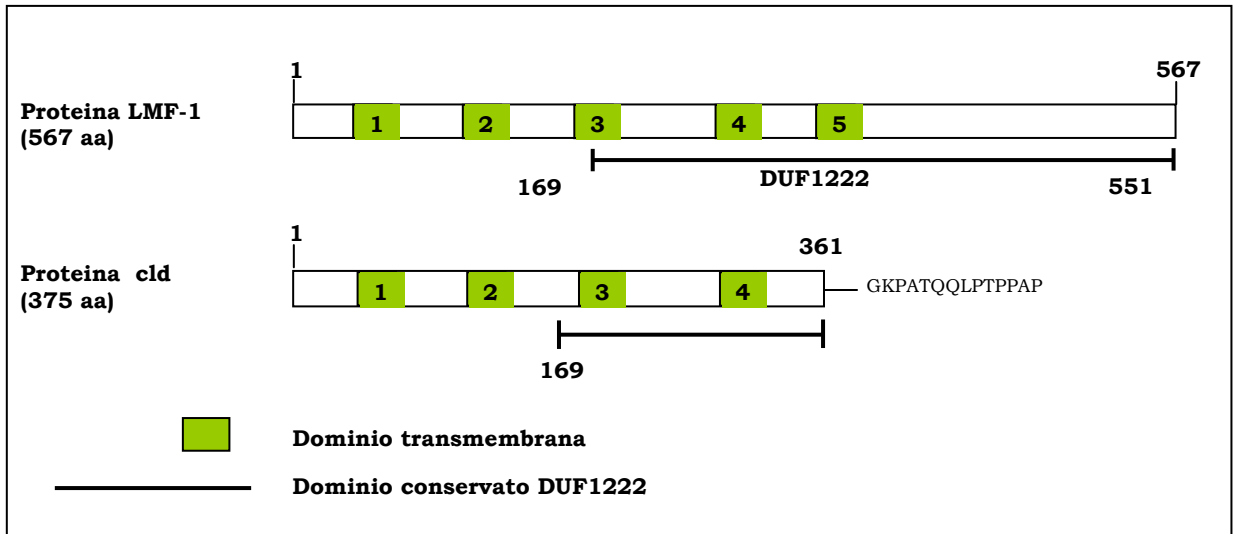


Fig.3- Rappresentazione schematica della proteina Lmf-1 e della proteina cld

La proteina LMF1 è localizzata nel reticolo endoplasmatico, come dimostrato dalla colocalizzazione con la calnexina, una proteina legata alla membrana di questa struttura. Questa localizzazione è coerente con il sito di maturazione della lipasi a livello del reticolo endoplasmatico, una funzione sovvertita dal cld. L'analisi RT-PCR in realtime indica che l'mRNA di LMF1 è espresso in tutti i tessuti che sintetizzano la LPL e la HTGL, compresi i principali tessuti che esprimono le lipasi, come tessuto adiposo, muscolo scheletrico, miocardio e fegato. L'abbondanza di mRNA di LMF1 in questi tessuti non è comunque la più alta tra quelli esaminati, suggerendo che LMF1 possa avere altre funzioni nei tessuti che non esprimono o esprimono in maniera minima un'attività lipasica.

Le ricerche BLAST hanno identificato alcuni orthologi di LMF1 in diversi vertebrati che mappano su regioni cromosomiche omologhe al cromosoma 17 dei topi, e che, comunque, le regioni omologhe LMF1 non sono state ritrovate in alcuni organismi invertebrati il cui genoma è stato interamente sequenziato, come il moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), un nematode (*Caenorhabditis pombe*) e un batterio (*Escherichia coli*). Questi organismi mancano anche di regioni

omologhe della LPL e della HTGL, indicando la possibilità che l'emergenza di una lipasi dimerica secreta richieda la presenza di un fattore (precisamente, LMF1) in grado di supportare il corretto ripiegamento di questo unico enzima nel reticolo endoplasmatico. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che l'espressione ectopica di LPL umana in cellule SC-2 provenienti da *D. melanogaster* o nel lievito *S. cerevisiae* mostra caratteristiche pressappoco identiche a quelle del deficit combinato di lipasi (cld): aggregati inattivi di LPL che vengono trattenuti nel reticolo endoplasmatico.

È stato inoltre identificato un paralogo di LMF1, che è stato chiamato LMF2 (formalmente noto come Tmem153) in tutte le specie invertebrate analizzate. LMF2 mostra una sovrapposibilità di sequenza aminoacidica con LMF1 del 42%, e contiene il dominio DUF1222 nella sua porzione C-terminale. Il fatto che LMF2, localizzato sul cromosoma 15, sia incapace di completare la maturazione lipasica difettiva nei topi mutanti cld/cld, suggerisce che possa essere coinvolto nella maturazione di proteine diverse dalle lipasi.

GPIHBP1

GPIHBP1 è una glicoproteina localizzata nel lume dell'endotelio vascolare e che interagisce con la proteina LPL. È costituita da 184 amminoacidi e contiene un peptide segnale e una regione carbossi terminale idrofobica che viene glicosilata nelle tappe finali della maturazione della proteina. La glicosilazione N-terminale risulta indispensabile per il trafficking alla superficie cellulare, dove la proteina svolge la sua funzione anche se ancora non risulta totalmente chiarita. La proteina GPIHBP1 matura presenta due domini strutturalmente e funzionalmente importanti: un dominio acido ricco in glutammina e acido aspartico (amminoacidi 25-50), ed un dominio ricco in cisteine-lisine (amminoacidi 65-136). Il dominio acido è localizzato nella porzione N-terminale della proteina; nell'uomo 21 dei 26 amminoacidi di questa regione sono costituiti da aspartato o glutammato. Mutazioni nel dominio acido aboliscono l'abilità che ha la

proteina nel legare LPL. Inoltre, esperimenti di delezione completa del dominio acido eseguiti su cellule rivelano una notevole riduzione dei livelli della proteina GPIHBP1 indicando l'importanza di questo dominio per il trafficking sulla superficie endoteliale o per la stabilità della proteina (Fig.4).

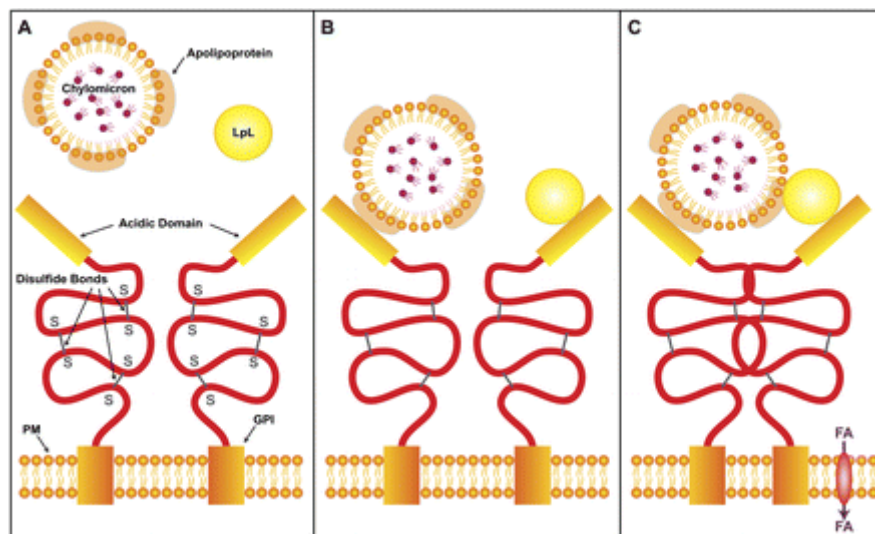


Fig.4- Rappresentazione schematica della proteina GPIHBP1

Il meccanismo molecolare che regola l'espressione di GPIHBP1 non è completamente noto; è noto che nel topo il gene GPIHBP1 è un target per PPAR γ , che agisce sia a livello del tessuto adiposo che a livello dei corpi embrionali. Davies e coll, inoltre, hanno dimostrato un livello di espressione notevolmente basso di GPIHBP1 nel tessuto adiposo bianco, bruno, nel cuore e nelle cellule endoteliali di topi knockout per PPAR γ . Davies e collaboratori hanno identificato diversi siti potenziali di legame a PPAR (PPREs) a monte della sequenza codificante di GPIHBP1. Alcuni di questi siti putativi legano l'eterodimero PPAR α /PPAR γ ; uno di questi siti si localizza immediatamente a monte dell'esone 1 del gene GPIHBP1. Nonostante queste informazioni, ad oggi non si può dire con sicurezza che GPIHBP1 sia regolato direttamente da PPAR γ , per cui necessitano ulteriori studi in vitro per comprendere il meccanismo di regolazione di

GPIHBP1. Recentemente questa proteina è stata studiata in pazienti affetti da severa chilomicronemia dato che risulta essere coinvolta nel meccanismo di lipolisi delle lipoproteine ricche in trigliceridi. GPIHBP1, infatti, ancora la proteina LPL attraverso un legame non covalente, e ne permette la presentazione della proteina nel lume dei capillari. L'inattivazione della proteina GPIHBP1 nei topi è associata con una condizione di chilomicronemia severa, con plasma dall'aspetto particolarmente lattescente. Topi knockout per GPIHBP1 presentano livelli di trigliceridi che vanno dai 2500 ai 5000 mg/dl. Questa proteina è espressa preferenzialmente in quei tessuti dove si osserva una iperespressione della proteina LPL come il muscolo scheletrico, cuore, tessuto adiposo. E' anche richiesta nell'endotelio dei capillari, dove la proteina LPL è necessaria per l'idrolisi dei trigliceridi. Questa osservazione evidenzia la stretta correlazione tra LPL e GPIHBP1, supportata da dati di letteratura in cui esperimenti di trasfezione su cellule dimostrano che GPIHBP1 lega la proteina LPL con alta affinità. Questo insieme di elementi porta alla formulazione dell'idea che GPIHBP1 lega LPL sulla superficie luminare dei capillari e che si adatta a formare una piattaforma per la lipolisi. Oltre a legare la proteina LPL, GPIHBP1 è responsabile della stabilità della stessa. Gli studi effettuati su topi knockout hanno permesso di rivelare importanti informazioni riguardanti la funzione e la struttura di GPIHBP1. E' emerso che la chilomicronemia è riscontrata solo nei topi omozigoti (*Gpihbp1*^{-/-}) indicando che l'effetto ipertrigliceridemico è una condizione recessiva e quindi, affinché si possa manifestare, occorre che il difetto sia presente in omozigosi. Un altro dato importante è che in topi *Gpihbp1*^{-/-} si osserva in circolo la presenza della proteina LPL enzimaticamente attiva dopo iniezione di eparina, indicando che la proteina GPIHBP1 non ha un effetto sull'attivazione della LPL ma piuttosto un ruolo strutturale. Ancora, dopo l'iniezione di eparina, la proteina LPL nei topi *Gpihbp1*^{-/-} si attiva in ritardo rispetto ai controlli. In contrasto, però, i livelli di LPL incrementano lentamente dopo 15 min dall'iniezione di eparina e i livelli di trigliceridi si riducono drasticamente.

Inoltre, le scorte della proteina LPL nei tessuti dei topi *Gpihbp1*^{-/-} risultano normali. Tutte queste evidenze portano a concludere che la chilomicronemia riscontrata nei topi *Gpihbp1*^{-/-} non è causata da una disfunzione della proteina LPL ma piuttosto da una mancata localizzazione della stessa all'interno dei tessuti. Queste deduzioni derivano dall'interpretazioni dei risultati derivati dalla somministrazione di eparina nei topi controllo e nei knockout. Si suppone che nei primi il rilascio di LPL derivi da un pool intravascolare dal quale l'eparina viene rilasciata velocemente, e da un pool extravascolare dal quale il rilascio di LPL risulta più lento. Si suppone che nei topi *Gpihbp1*^{-/-} sia presente solo il pool extravascolare che spiegherebbe il ritardato rilascio di LPL dopo iniezione con eparina e la conseguente chilomicronemia. A supporto di questa teoria è stato osservato che l'iniezione di una emulsione lipidica in topi *Gpihbp1*^{-/-} non determina il rilascio di LPL che si osserva invece nei topi controllo. Tutte queste evidenze hanno contribuito notevolmente a puntare alla scoperta di nuove mutazioni nell'uomo nel gene GPIHBP1 che potessero spiegare quei casi di chilomicronemia negativi per mutazioni nei geni candidati. Wang and Hegele hanno identificato una sostituzione amminoacidica G56R in una famiglia canadese. Entrambi i membri affetti da chilomicronemia severa presentavano la sostituzione in omozigosi e questo ha portato all'ipotesi che la variante identificata potesse essere causa della chilomicronemia. Successivamente sono sorti dei dubbi sulla veridicità di questa affermazione perché l'amminoacido in posizione 56 non sembra avere un ruolo sul legame tra GPIHBP1 ed LPL. Inoltre, è stata riscontrata una modesta ipertrigliceridemia nei soggetti portatori della variante in eterozigosi. Recenti studi dimostrano che individui eterozigoti per un difetto funzionale di GPIHBP1 risultano normolipidemicici come i topi knockout eterozigoti. Recentemente è stata identificata una mutazione nel gene GPIHBP1 in un uomo di 33 anni con severa chilomicronemia nell'amminoacido in posizione 115 (Q115P). Studi funzionali in vitro hanno dimostrato che la proteina GPIHBP1 con mutazione Q115P viene espressa sulla superficie dell'endotelio vascolare

normalmente ma riesce a legare meno del 5% della quantità normale di LPL se paragonata all'attività della proteina GPIHBP1 wild- type. Gli studi funzionali in vitro eseguiti per le altre varianti identificate nel gene GPIHBP1 (C65S e C68G) hanno dimostrato un difetto di legame delle proteine mutate con la proteina LPL. Inoltre queste mutazioni non sono state individuate in soggetti normolipidemicici come atteso.

LMF-1 E IPERTRIGLICERIDEMIA SEVERA

Per indagare il potenziale ruolo di LMF1 nella patologia umana, sono stati esaminati tutti gli 11 esoni di LMF1 in 11 individui affetti da ipertrigliceridemia e riduzione dell'attività lipasica. E' stato così documentato un soggetto omozigote per una mutazione C → G (nucleotide 1319 in NM_022773) nell'esone 9 del gene LMF1, che determina un prematuro codone di arresto. Ne risulta un LMF1 troncato, Y439X, mancante di 127 residui dalla porzione C-terminale, comparabile con la mutazione cld che rimuove 212 residui della stessa porzione della proteina (Peterfly et al, 2007) (fig.5).

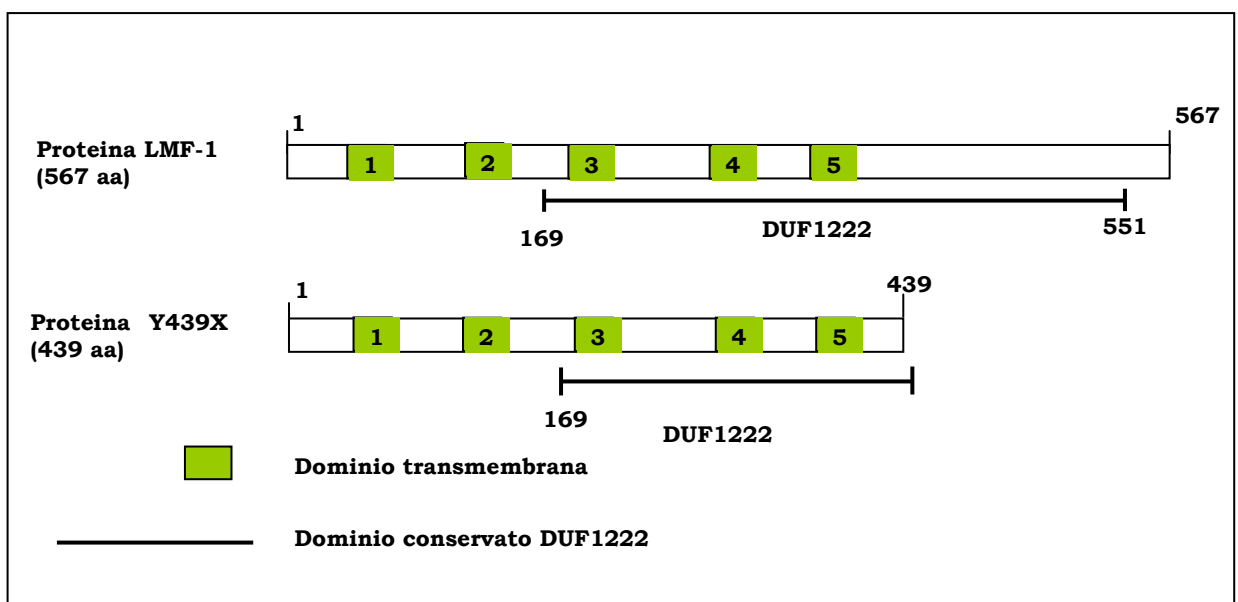


Fig.5- Schematizzazione della proteina Lmf-1 wt e della proteina mutata Y439X

Questo soggetto con Y439X ha mostrato livelli plasmatici di trigliceridi marcatamente aumentati rispetto ai soggetti di controllo, ed è andato incontro a ripetuti episodi di pancreatite acuta (fig.6). Anche nel rispetto di una dieta che prevede una severa restrizione del contenuto in grassi, i livelli di trigliceridi di questo soggetto erano superiori di circa sette volte, nelle misurazioni migliori, rispetto ai livelli di 31 soggetti di controllo, e hanno superato i valori di controllo di oltre 70 volte quando la dieta non è stata controllata.

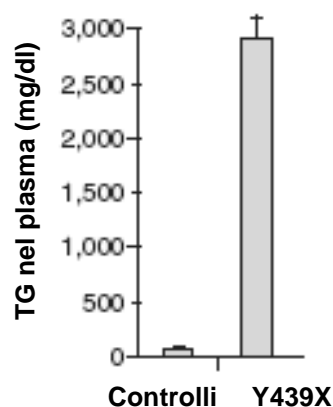


Fig. 6- Livelli di trigliceridi in soggetti normali e con mutazione Y439X

La severa ipertrigliceridemia è da attribuire al deficit di LPL, come dimostrato dalla riduzione di circa il 93% dell'attività della LPL nel plasma del soggetto affetto (fig.7a). In aggiunta, l'attività della HL risulta diminuita di circa il 50%, confermando lo stato di deficit combinato di lipasi (fig.7a). Il soggetto ha sviluppato xantomi tuberosi, che si sono anche riscontrati in soggetti ipertrigliceridemici con deficit combinato di lipasi dovuto ad autoanticorpi anti lipasi, ed è affetto, inoltre, da lipodistrofia, che può essere in parte dovuta al deficit di lipasi.

Per verificare se la proteina troncata Y439X sia funzionale nel processo di maturazione delle lipasi, si è introdotta la mutazione in un costrutto contenente il cDNA di LMF1. Mentre il costrutto contenente il cDNA di

LMF1 wt ripristina l'attività della LPL nelle cellule cld/cld, il costrutto contenente la mutazione Y439X impedisce il recupero della funzione dell'LPL anche se presente in abbondanza, (fig.7b).

In conclusione sembrerebbe che LMF1 sia un importante gene candidato come causa della ipertrigliceridemia umana, un disordine molto spesso non spiegato dalle comuni mutazioni di altri geni del metabolismo delle TRL, come i geni strutturali delle lipasi.

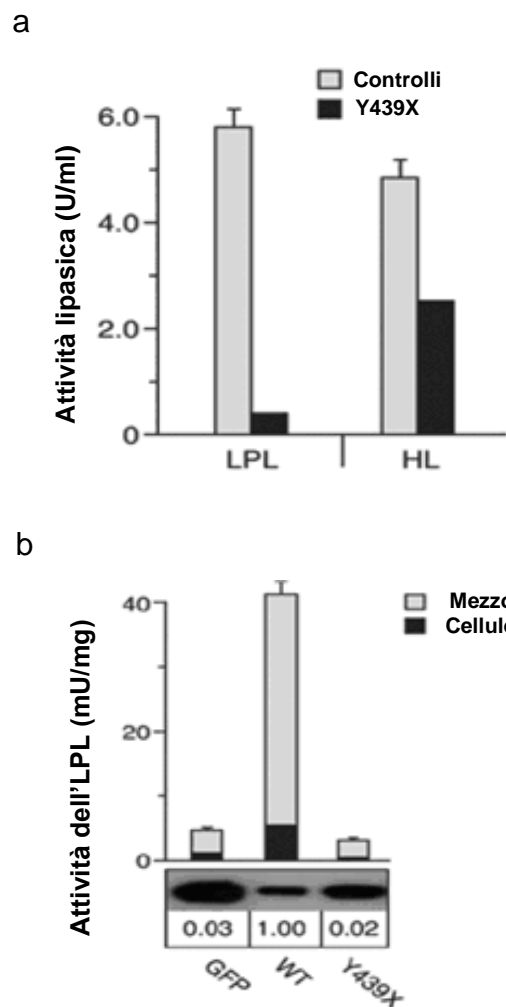


Fig. 7a/b-. a:Attività dell'LPL ed HL in sogg. normali e con mutazione Y439X. b:Attività di LPL in cellule cld/cld, trasfettate con Lmf-1 wt e con Lmf-1 Y439X

OBIETTIVO DELLO STUDIO

In assenza di cause secondarie, la ipertrigliceridemia severa è, come detto, una patologia generalmente legata ad alterazioni genetiche ben documentabili, che viene controllata esclusivamente mediante uno stretto controllo alimentare dell'assunzione dei lipidi. Per tale motivo, è stato condotto uno studio di analisi genetica dei geni candidati LPL, ApoAV e ApoCII su un gruppo di 24 pazienti affetti da ipertrigliceridemia severa (con valori di trigliceridi superiori a 1000 mg/dl) afferenti presso il centro di riferimento regionale delle dislipidemie genetiche dell'Università di Palermo. Tra i pazienti studiati e negativi per mutazioni nei geni candidati è stata condotta l'analisi genetica del gene LMF-1 e GPIHBP1, due nuovi geni candidati come causa di ipertrigliceridemia severa.

Obiettivo successivo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare dal punto di vista biochimico e genetico-molecolare due nuove mutazioni identificate in due differenti soggetti affetti da ipertrigliceridemia severa. In particolare è stata studiata una nuova mutazione nel gene LPL e una mutazione nel gene LMF-1.

MATERIALI E METODI

SCELTA DEI PROBANDI

Tra i pazienti affetti da ipertrigliceridemia afferenti presso il Centro di Riferimento Regionale per lo Studio delle Dislipidemie Genetiche del Policlinico di Palermo sono stati selezionati i soggetti affetti da ipertrigliceridemia severa con livelli di trigliceridi a digiuno superiori o uguali a 1000 mg/dl nei quali sono state escluse le forme secondarie (abuso di alcool, diabete, sindrome nefrosica). Sono stati scelti 24 pazienti con sospetto di ipertrigliceridemia primitiva severa.

ANALISI BIOCHIMICHE DI PRIMO LIVELLO

I livelli di colesterolo totale (CT), trigliceridi (TG) e lipoproteine ad alta densità (HDL-C) sono stati determinati con tecniche enzimatiche-colorimetriche standard (Roche Diagnostics, Basel Switzerland) su un autoanalizzatore COBAS MIRA plus auto-analyzer (Roche Diagnostics, Basel Switzerland). I livelli di colesterolo LDL sono stati calcolati utilizzando la formula di Friedewald: $LDL-C \text{ (mg/dl)} = TC \text{ (mg/dl)} - TG \text{ (mg/dl)}/5 - HDL-C \text{ (mg/dl)}$.

ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA SANGUE INTERO

Il DNA genomico è stato estratto mediante procedure standard di purificazione da leucociti circolanti usando un kit commerciale (Wizard genomic DNA purification kit, Promega).

AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO

Sono stati amplificati gli esoni, il promotore e le regioni di splicing attraverso PCR usando primer specifici. Per i geni LPL, ApoAV e ApoCII sono stati utilizzati primer appropriati secondo procedura già pubblicata (Priore et al, 2005). Per il gene LMF-1 GPIIIBPI sono stati utilizzati i primers già descritti (Peterfy, 2007 e Beigneux, 2009) Il profilo di amplificazione per gli esoni di tutti i geni sequenziali è 95°C per 3 min

(hot start), 95°C per 60 sec, la temperatura di annealing specifica per ogni esone per 60 sec, 72°C per 60 sec per 35 cicli, e una estensione finale di 7 min a 72°C.

La reazione polimerasica a catena (PCR), effettuata per l'amplificazione degli esoni, del promotore e delle regioni di splicing che compongono il gene di nostro interesse (LMF-1), è stata effettuata in un volume totale di 100 µl contenente dNTPs (ognuno 200 µM finale), 10 µl di buffer 10X, 1.5 mM di MgCl₂, 20 pmoli di ogni primer, 2U di Taq polimerasi (Euro Taq, Euro Clone) e 150 ng di DNA genomico. Ogni amplificato è stato valutato in un gel di agarosio al 1,5%.

PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

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

SEQUENZIAMENTO DIRETTO

Per il sequenziamento del DNA è stato utilizzato il metodo dei dideossi sviluppato da Sanger nel 1977 in una sua forma modificata: il metodo isotermico viene infatti sostituito dal sequenziamento ciclico in cui successivi step di denaturazione, annealing ed allungamento fanno sì che si ottenga un mix di prodotti di estensione lineare. L'enzima responsabile dell'allungamento è la Taq polimerasi, un enzima in grado di aggiungere deossinucleotidi al 3'-OH della catena nascente di DNA permettendo così che lo stampo di DNA sia copiato fedelmente. La Taq polimerasi è in grado di incorporare anche analoghi delle basi nucleotidiche. Il sequenziamento ciclico sfrutta questa capacità della polimerasi, infatti usa come substrati sia i deossinucleotidi che i 2',3'-

dideossinucleotidi. Quando un dideossinucleotide è incorporato al 3' di una catena nascente l'allungamento della catena è interrotto a causa della perdita del 3'-OH necessario all'aggiunta di ulteriori nucleotidi. La Taq usata per promuovere la reazione di sequenza è una forma che presenta una mutazione nel sito attivo che le permette di inserire in modo casuale sia i dideossinucleotidi che i deossinucleotidi. Questo enzima porta anche un'altra mutazione che elimina l'attività nucleasica 5'-3'.

Nel sequenziamento ciclico è possibile usare come DNA stampo sia DNA plasmidico sia direttamente i prodotti di amplificazione, in ogni caso la reazione ciclica permette anche di ottenere una miscela di prodotti di sequenziamento intermedi che terminano specificamente nel punto in cui viene incorporato il dideossinucleotide.

I quattro dideossinucleotidi presenti nella reazione sono marcati ognuno con un cromoforo fluorescente diverso cosicché la catena nascente è contemporaneamente terminata precocemente e marcata con un colore che corrisponde all'ultima base del frammento (fig.8).

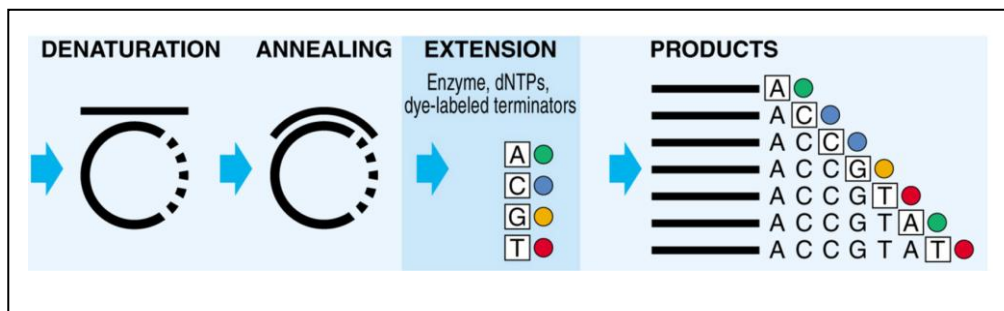


Fig.8- Meccanismo molecolare che illustra le fasi del sequenziamento ciclico diretto.

Lo strumento che analizza i frammenti di DNA fluorescenti utilizzato per questo studio è un sequenziatore automatico a capillare (elettroforesi capillare) ABI Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems). Il capillare è provvisto di una finestra che viene attraversata da un raggio laser che eccita i fluorocromi. La fluorescenza emessa dalle molecole

eccitate è raccolta come una banda di una particolare lunghezza d'onda e conservata come segnale digitale. Per analizzare i dati grezzi (fig.9a) è stato utilizzato un programma dedicato che è in grado di determinare quale base corrisponde ad una data intensità di fluorescenza (Sequencing Analysis 3.4.1) e che mostra i dati come uno spettro in cui ogni picco colorato corrisponde ad una determinata base (fig.9b).

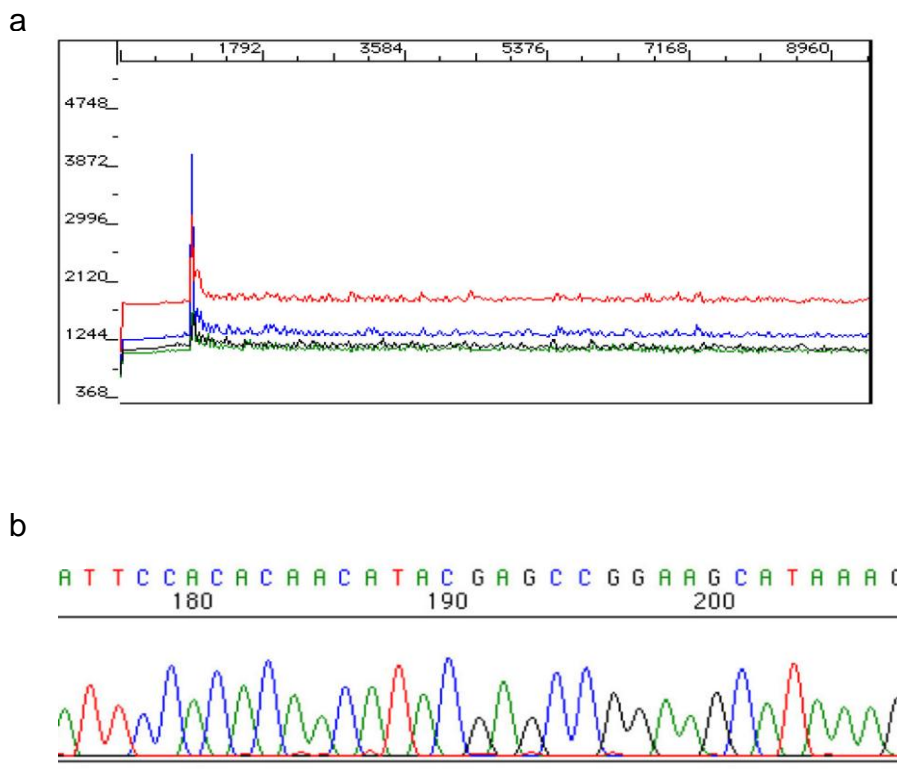


Fig.9- Esempio dello spettro dato dai dati grezzi della reazione di sequenza (a) e dello spettro dopo elaborazione dei dati mediante l'utilizzo del programma Sequencing Analysis 3.4.1 (b)

SEQUENZIAMENTO

I prodotti amplificati e purificati sono stati usati come stampo per la reazione di sequenziamento diretto (la quantità del DNA stampo varia in dipendenza delle dimensioni del frammento da sequenziare: necessitano, infatti, 10 ng di DNA stampo ogni 100 bp da sequenziare) in presenza di 3,2 pM di uno dei primer specifici dell'esone in analisi

(solitamente il primer senso) e di 8 μ l di Big Dye Terminator v 1.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystem) che contiene i deossinucleotidi, i dideossinucleotidi marcati, il buffer e la taq specifica in un volume finale di 20 μ l. Il profilo della reazione di sequenza è 96°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi, 60°C per 4 minuti, ripetuto per 25 cicli e con un innalzamento della temperatura di 1°C al secondo. Tali reazioni sono state quindi purificate su una colonna di Sefadex G50 (Pharmacia). 5 μ l della reazione purificata diluita in 20 μ l di volume finale sono stati 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 Seqed 4.0.

ATTIVITA' POST-EPARINICA DI LPL E HL

L'attività enzimatica LPL e HL è stata misurata su plasma post-eparinico di 69 soggetti controllo normolipemici, il probando con ipertrigliceridemia severa portatore della mutazione del gene LPL e il probando portatore della mutazione del gene LMF-1 (vedi sotto). 10 μ l di plasma post-eparinico di ciascun soggetto sopra elencato sono stati dispensati in un tubo di vetro di 16X125 mm; per l'attività della LPL sono stati aggiunti 500 μ l del substrato A (0.2 M NaCl, 0.2 M TRIS pH 8.6, Bsa/Tris al 10% pH 8.4, emulsione di gomma arabica contenente 5 μ Ci ¹⁴C Trioleina, 100 mg di trioleina fredda e 7,5 ml di soluzione gomma arabica al 5%) in ciascun tubo ad un intervallo di 30 sec. Per l'attività dell'HL è stato utilizzato il substrato B (2 M NaCl, 0.2 M TRIS pH 8.6, Bsa/Tris al 10% pH 8.4, emulsione di gomma arabica contenente 5 μ Ci ¹⁴C Trioleina, 100 mg di trioleina fredda e 7,5 ml di soluzione gomma arabica al 5%). È stata effettuata una incubazione a t=28°C per 90 minuti e successivamente la reazione è stata bloccata con 3.5 ml di metanolo-cloroformio-eptano (1.41:1.25:1.00 V/V) mescolando per 20 sec con il

vortex. Sono stati aggiunti 750 µl di buffer Borato-Carbonato 0.14 M pH 10.5 e agitati per 5 min. Successivamente i tubi sono stati centrifugati per 15 minuti a 2000 rpm; 1 ml del supernatante è stato utilizzato per la lettura dell'attività enzimatica, tramite scintillatore.

COSTRUZIONE DI UN MINIGENE DEL GENE LPL

AMPLIFICAZIONE DELL'INSERTO

E' stata amplificata una porzione del gene dell'LPL comprendente la mutazione identificata (esone2-introne2-esone3), utilizzando la seguente coppia di primer:

Primer 2F_AGAAGAGATTTTATCGACATCGAA

Primer 3R_CTCCATCCAGTTGATAAACCG

e come stampo il DNA del probando.

L'amplificazione è stata effettuata seguendo il seguente profilo termico: un ciclo a 95 °C per 1min; 35 cicli a 95 °C per 1min, 60 °C per 1min, 72 °C per 1 min, un ciclo a 72 °C per 10 min. La lunghezza attesa dell'amplicone (3767 bp) è stata confermata su gel d'agarosio all'1%(Fig.10).

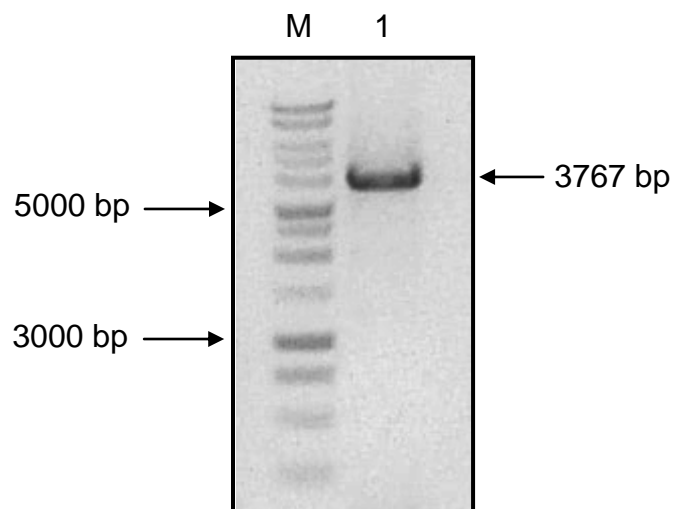


Fig.10- Gel d'agarosio all'1%;M: marker 1Kb; Linea1: Amplicone LPL esone2-introne2-esone3

CLONAGGIO E COSTRUZIONE DEL VETTORE DI ESPRESSIONE

REAZIONE DI LEGAME E TRASFORMAZIONE

Il plasmide pTarget Vector e l'inserto amplificato sono stati incubati nel rapporto molare di 1:3 in 1X buffer di legame (promega) in presenza di 1 unità dell'enzima T4 DNA ligasi (promega) O.N a 4°C. Il costrutto così ottenuto è stato amplificato mediante trasformazione batterica in cellule supercompetenti di E.Coli JM109.

Per la trasformazione la miscela di legame è stata incubata con la sospensione di cellule di E. Coli JM109 (Promega) supercompetenti per 20' in ghiaccio, poi per 45-50'' a 42° C e nuovamente in ghiaccio per 2'; quindi sono stati aggiunti 4 volumi di terreno LB e incubato a 37°C per 1h in agitazione alla velocità di 150 rpm. La sospensione ottenuta è stata piastrata su LB-agar supplementato con ampicillina all'1%, X-GAL e IPTG. Le piastre sono state incubate a 37°C overnight.

ANALISI DEI RICOMBINANTI: MINI-PREPARAZIONI DEI PLASMIDI

Le colonie batteriche sono state amplificate singolarmente in 5 ml di terreno LB contenente ampicillina (50 µg/ml) per una notte a 37°C, in agitazione, a 250 rpm.

Da ogni coltura batterica è stata eseguita una minipreparazione del DNA plasmidico utilizzando un kit commerciale (Minipreps DNA purification kit Promega). 300 ng di DNA plasmidico sono stati digeriti con 5 U dell'enzima di restrizione XhoI (Fermentas), 1X buffer, in un volume totale di 20 µl ed incubati per 2 h a 37°; il prodotto della digestione è stato analizzato su gel di agarosio all'1%.

MAXI-PREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Dopo aver identificato i cloni ricombinanti mediante sequenziamento diretto, è stata fatta una maxipreparazione del DNA plasmidico utilizzando un metodo commerciale (Qiagen Plasmid maxi Kit). Sulle preparazioni così ottenute è stata condotta l'analisi di sequenza per confermare la presenza della mutazione da studiare.

COLTURE CELLULARI

Le cellule COS-1 (cellule renali di scimmia) sono state mantenute in mezzo di coltura DMEM-FCS 10% + glucosio alla concentrazione di 4.5 g/L, penicillina e streptomicina alla concentrazione di 100 U.I/ml, aminoacidi non essenziali all'1%, a 37°C in ambiente saturo al 5% di CO₂.

TRASFEZIONE

Le cellule COS-1 sono state piastrate alla confluenza di 2×10^5 cellule/pozzetto in piastre da 24 well in un volume di 0.5 ml di terreno DMEM-FCS10%. Raggiunta la confluenza dell'80%, le cellule sono state trasfettate utilizzando per ciascun pozzetto 0.8 µg di ciascun vettore (pTargetvector, pTargetvector-LPLwt, pTargetvector-LPLmut) e 2 µl di lipofectamina 2000 (Invitrogen) per pozzetto. Dopo incubazione a 37° al 5% CO₂ per 48 h è stato estratto l'RNA totale mediante l'impiego del kit di estrazione TRI-Reagent (Ambion). L'integrità e la purezza dell'RNA è stata valutata su gel d'agarosio all'1% e mediante lettura spettrofotometrica espressa come rapporto 260/280 nm.

RT-PCR

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato 1 µg dell'RNA totale estratto, 10 µM del primer 3R, 10 mM di dNTPs, H₂O fino a un volume di 5 µl ed incubati a 70°C per 5', 5° per 5', e in ghiaccio per 5'. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti Buffer 1X, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM di dNTPs mix, 20U di Ribonuclease Inibitor, 1U di ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega), H₂O fino a un volume di 15 µl. Segue una incubazione a 25°C per 5', 51°C per 60', 70°C per 15', 4°C ∞.

Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato come stampo per la reazione di PCR insieme a Buffer 1X, 1.5mM MgCl₂, 2mM di dNTPs, 20 µM di Primer 2F, 2.5U di Taq polimerase (fermentas) e H₂O fino al volume di 50 µl. Il profilo termico utilizzato è il seguente: 95°C per 1min (1 ciclo); 95°C per

1min, 64°C per 1min, 72°C per 1 min (35 cicli), 72°C per 10 min (1 ciclo), 4°C ∞.

ANALISI FUNZIONALE DI LMF-1

Il cDNA dell'LPL umana full-length è stato clonato nel vettore di espressione pcDNA6/V5-His (Invitrogen) in modo che la proteina LPL così espressa risulti marcata con l'epitopo V5 nella porzione C-terminale. La sequenza del cDNA della proteina LMF-1 umana WT, con mutazione Y439X e W464X, è stata subclonata nel vettore di espressione pcDNA3.1 (Invitrogen) in modo che la proteina contenesse l'epitopo C-MYC nella porzione N-terminale. Per normalizzare l'efficienza di trasfezione è stato subclonato il gene reporter che codifica per una fosfatasi alcalina umana (SEAP) nel vettore di espressione pM1 (X-extremeGENE, Roche). I plasmidi LPL/SEAP sono stati utilizzati in tutti gli esperimenti di trasfezione alla concentrazione di 0,4 e 0,1 mg/ml. Per l'analisi funzionale di LMF-1 è stata utilizzata una linea cellulare derivata da epatociti di topo cld/cld di 16-18 giorni e immortalizzati attraverso la trasfezione con l'antigene T-SV40. Le cellule sono state mantenute in DMEM 10% FBS per 25-53 passaggi. Sono state piastrate $1,8 \cdot 10^5$ cellule per pozzetto in piastre da 12 well (Falcon) in un volume di 0,8 ml di DMEM 10% FBS per pozzetto. Dopo 24 ore, alla confluenza di circa il 90% è stata effettuata la trasfezione dei plasmidi LPL/SEAP. Tutti i vettori di espressione usati in questo studio sono stati preparati usando un kit commerciale per Maxi prep (EndoFree Maxi Kit, Qiagen). Ciascuna cotrasfezione del vettore contenente la sequenza target di LMF-1 (WT, Y439X e W464X) e l'insieme dei due costrutti reporter (LPL/SEAP MastreMix) è stata effettuata utilizzando il reagente di trasfezione Effectene (Qiagen) con un rapporto DNA:reagente di 1:10. Ciascun pozzetto è stato trasfettato con 5 ng di ciascun costrutto LMF-1-pcDNA3.1 e 0,8 µg e 0,2 µg del mix LPL/SEAP rispettivamente. 24 ore dopo la trasfezione il mezzo di coltura è stato utilizzato per misurare l'attività SEAP; successivamente è stata aggiunta eparina alla concentrazione finale di 10 U/ml. 48 ore dopo la trasfezione è stato

aggiunto mezzo di coltura fresco contenente eparina (t=0) ed è stata effettuata la misurazione dell'attività dell'LPL a vari tempi (da t=30 min a t=8 ore). Successivamente le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X e lisate con un buffer detergente (0,2% sodio deossicolato, 10U/ml di eparina, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5). Dopo sonicazione e centrifugazione il supernatante del lisato cellulare e il mezzo di coltura, sono stati conservati a -80 C fino al successivo utilizzo.

La misurazione dell'attività SEAP è stata effettuata con il kit SEAP Reporter Assay Kit (Invivogen). Per ogni pozzetto è stata misurata l'attività SEAP ogni 30 min per 8 ore, per normalizzare l'attività dell'LPL. Per misurare l'attività dell'LPL è stato utilizzato un substrato lecitin-stabilized radiolabeled triolein [glicerolo tri (9,10(n)-³H) oleato]. Ogni mU dell'attività dell'LPL equivale ad una nmole di acidi grassi liberi rilasciati per minuto. L'attività dell'LPL secreta è stata misurata in mU/ml di mezzo e normalizzata per ml di attività SEAP. Per la detection della proteina LMF-1 è stato utilizzato un anticorpo policlonale biotinilato rabbit anti-c-myc (Gene Tex) diluito 1:2500; per la detection della proteina LPL è stato utilizzato un anticorpo biotinilato rabbit anti-LPL diluito 1:2000. Per la detection degli anticorpi biotinilati è stata utilizzata la perossidasi di rafano coniugata con la streptavidina (Invitrogen) diluita 1:50000 e visualizzata utilizzando un substrato chemiluminescente (ECL, GE Healthcare). La quantizzazione dell'intensità della banda LMF-1 è stata misurata usando il software NIH Image 1.63.

RISULTATI

Tra i pazienti afferenti presso il centro di riferimento regionale per lo studio delle dislipidemie genetiche con livelli di trigliceridi superiori o uguali a 1000 mg/dl, sono stati selezionati 24 probandi in cui erano state escluse cause secondarie di ipertrigliceridemia. Su questi soggetti è stata eseguita l'analisi dei geni LPL, ApoAV, ApoCII che ha permesso di identificare alcune mutazioni che causano ipertrigliceridemia severa. In particolare sono state identificate le mutazioni A34V, R170L, H202R, I225T, R243H, D250N, IVS2-1G>C, nel gene LPL. Tutte queste mutazioni ad eccezione dell'ultima sono già state caratterizzate e associate a ipertrigliceridemia severa. E' stata inoltre identificata una sola mutazione a carico del gene ApoCII (c.176 C>A Y59X) già descritta in letteratura. I restanti 13 probandi sono risultati negativi per mutazioni a carico dei tre geni esaminati (tab 1).

Probando	Mutazione	Gene
M.G.	c.589 G>T R170L	LPL
O.D.	c.589 G>T R170L	LPL
N.V.	c.181 C>T A34V	LPL
B.S.	c.686 A>G H202R; c.829 G>A D250N	LPL
S.F.	c.829 G>A D250N	LPL
L.P.A	c.829 G>A D250N	LPL
T.D.	c.829 G>A D250N	LPL
O.R.	c.754 T>C I225T	LPL
A.C.	c.808 G/A R243H	LPL
F.G.	IVS2-1G>C	LPL
P.N.	c.176 C>A Y59X	APOCII
R.S.	Negativo	
V.R.	Negativo	
M.B.	Negativo	
D.B.G.	Negativo	
C.C.	Negativo	
R.A.	Negativo	
Z.R.	Negativo	
P.R.	Negativo	
T.M.	Negativo	
P.T.	Negativo	
P.G.	Negativo	
M.A.	Negativo	
C.G.	Negativo	

Tab.1- Riassunto delle mutazioni identificate nei 24 soggetti studiati

La tabella 2 riassume tutte le mutazioni identificate nei 24 probandi e che spiegano la chilomicronemia osservata. Come è possibile notare, la maggior parte delle mutazioni ricadono nel gene LPL; è stata identificata solo una mutazione nel gene ApoCII mentre non è stata identificata nessuna mutazione a carico del gene Apo AV.

	N° casi	Percentuale
Mutazioni del gene LPL	10/24	41%
Mutazioni del gene ApoCII	1/24	4%
Mutazioni del gene ApoAV	0/24	0%

Tab.2- Percentuale delle mutazioni identificate riferite al campione studiato

Dai dati della recente letteratura è emerso che le mutazioni a carico dei geni candidati classici (LPL, ApoAV, ApoCII) riescono a spiegare solo una piccola percentuale dell'ipertrigliceridemia primitiva osservata (circa il 40% del totale). Come è possibile osservare dalla tabella riassuntiva anche le frequenze estrapolate dal nostro screening genetico sono in linea con questi dati. Questo fa ipotizzare che esistono meccanismi di base del metabolismo dei trigliceridi non ancora noti che potrebbero essere responsabili di chilomicronemie ancora geneticamente sconosciute. A tal proposito sono stati identificati nuovi geni che possono essere coinvolti nei meccanismi fisiopatologici del metabolismo dei trigliceridi e che vale la pena studiare in quei casi di chilomicronemie non geneticamente definite. L'analisi genetica del gene Lmf-1 eseguita sui probandi negativi per difetti a carico dei geni LPL, ApoAV, ApoCII ha permesso di identificare la seconda mutazione in questo nuovo gene candidato come causa di ipertrigliceridemia severa.

CARATTERIZZAZIONE GENETICO-MOLECOLARE DELLA MUTAZIONE IVS2-1G>C

Il probando F.G. è un uomo di 33 anni, affetto da severa ipertrigliceridemia e pancreatiti ricorrenti. Giunge alla nostra attenzione per un episodio di pancreatite acuta e ipertrigliceridemia severa (CT 414 mg/dl, TG 3658 mg/dl, HDL 40 mg/dl). I dati clinici relativi ai genitori non evidenziano patologie vascolari o disturbi del metabolismo lipidico fatta eccezione per una lieve ipertrigliceridemia riscontrata nel padre del probando.

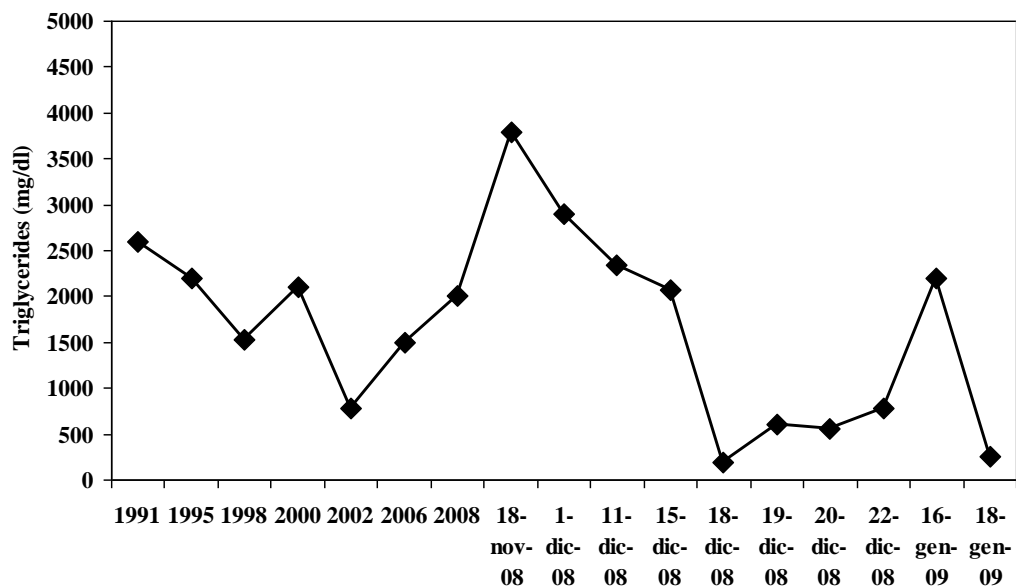


Fig.11- Andamento dei trigliceridi nel probando F.G dal 1991 al 2009

La figura 11 mostra l'andamento dei livelli dei trigliceridi nel corso degli anni nel probando F.G. L'analisi del gene LPL ha permesso di identificare una nuova mutazione nel sito di splicing (IVS2-1G>C), in omozigosi, mai descritta in precedenza. La presenza della mutazione è stata confermata in tre diverse amplificazioni indipendenti e confermata in entrambi i genitori del probando in eterozigosi (Fig. !2 a,b,c).

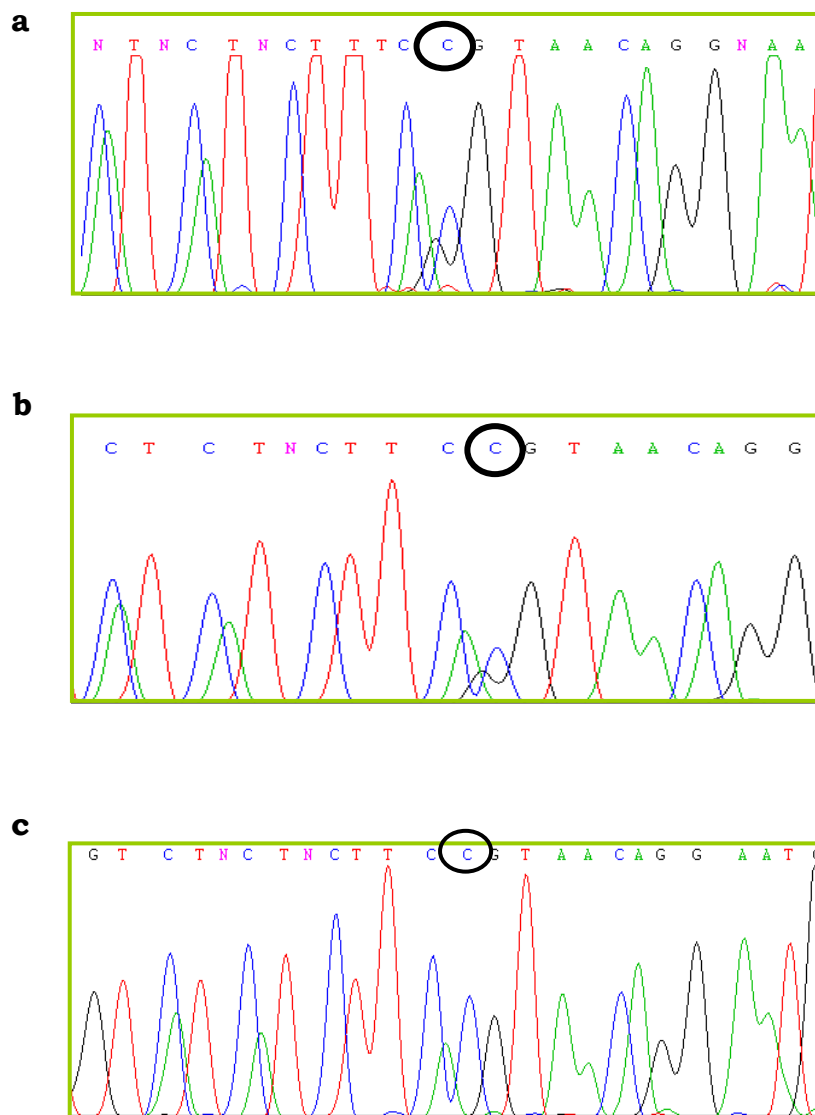
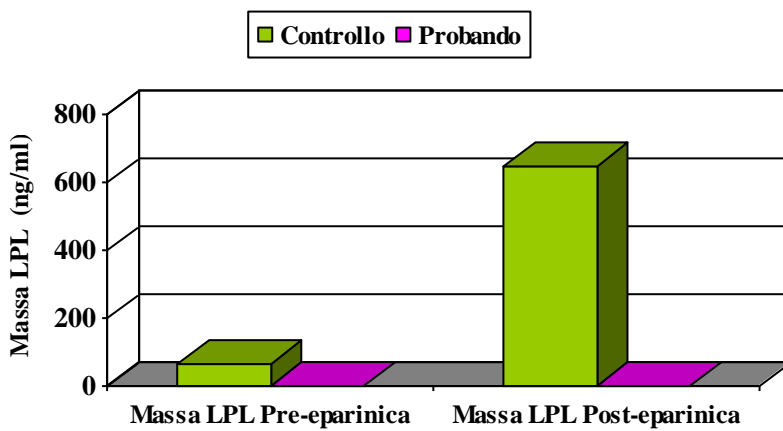
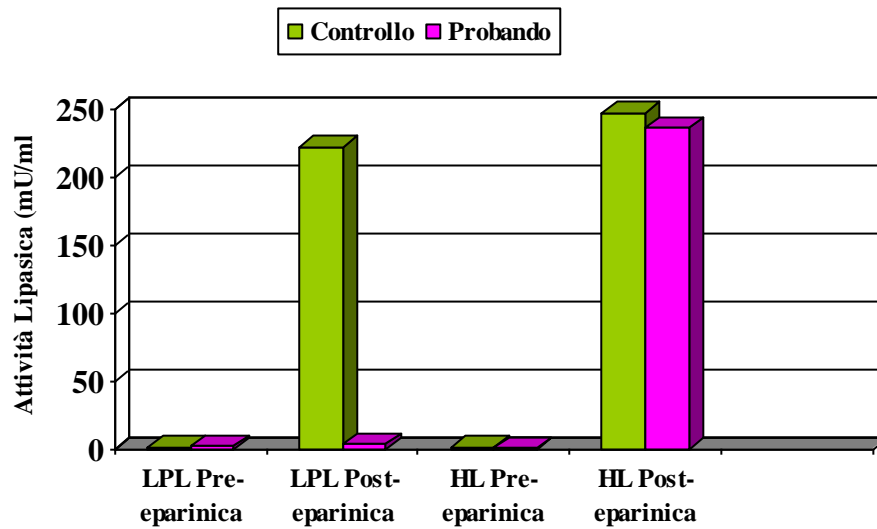


Fig. 12- a: Sequenza LPL esone3 IVS2-1G>C in eterozigoti (Madre),b: IVS2-1G>C in eterozigoti (Padre);c: IVS2-1G>C in omozigoti (Probando)

CARATTERIZZAZIONE DELLA VARIANTE DI SPLICING DEL GENE LPL

La mutazione di splicing identificata nel gene LPL (IVS2-1G>C) in omozigosi nel probando F.G. non è stata mai descritta in letteratura. Lo studio bioinformatico eseguito mediante il programma splice site (<https://splice.uwo.ca>) predice che la mutazione potrebbe determinare una alterazione dello splicing. I dati relativi alla valutazione dell'attività e della massa delle proteine LPL ed HL hanno permesso di evidenziare che, nel

soggetto portatore della mutazione, la proteina LPL non presenta né massa né attività, indicando che l'effetto della variante di splicing causa una abolizione della funzione della proteina (fig.13).



Per comprendere meglio l'effetto che la mutazione ha sulla trascrizione e traduzione dell'mRNA è stato eseguito uno studio funzionale utilizzando la tecnica del minigene. A tale scopo è stata disegnata una coppia di primer complementari ad una porzione dell'esone 2 (primer forward) e a un

porzione dell'esone 3 (primer reverse) del gene LPL con lo scopo di amplificare, su stampo di DNA genomico del probando, la regione comprendente l'esone-2-introne2-esone3 del gene dell'LPL contenente la mutazione IVS2-1G>C. L'amplicone atteso, pari a 3767 bp, è stato clonato nel vettore d'espressione pTarget™ vector (Promega) per ottenere cloni mutati (pTargetVector LPL-mut) e cloni wt (pTargetVector LPL-wt). E' stato utilizzato il pTarget™ Vector, costruito sia per essere usato come T vector per il clonaggio dei prodotti di PCR, sia come vettore per l'espressione in cellule di mammifero (fig.14)

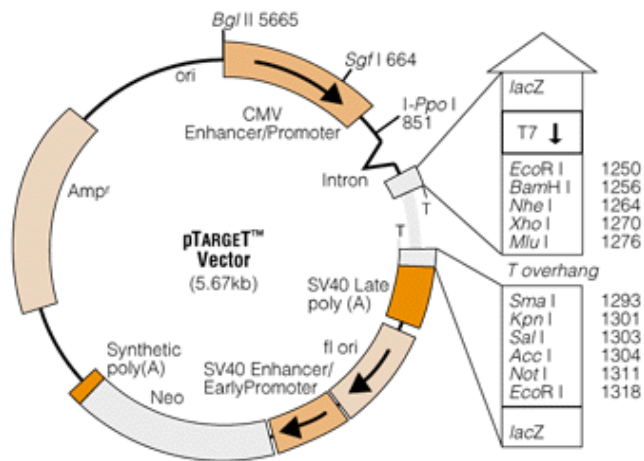


Fig.14-Mappa del vettore d'espressione pTarget™ (Promega)

L'espressione dell'inserito clonato nel vettore è regolata da una regione promoter/enhancer derivata da CMV (citomegalovirus umano). A valle di questa regione è presente un introne chimerico che presenta al 5' il sito donatore del primo introne del gene che codifica per la beta globina umana e al 3' il sito di splicing accettore dell'introne del gene che codifica per la regione variabile della catena pesante dell'immunoglobulina umana; La presenza dell'introne incrementa l'espressione di molti cDNA. A monte del sito di splicing è presente un segnale di poliadenilazione di SV40. Questo segnale è estremamente efficiente nell'indurre la poliadenilazione dei trascritti di RNA, necessaria per un alto livello di espressione. Il vettore

contiene anche il gene che codifica per la neomicina fosfotrasferasi, la cui espressione è regolata dalla regione promoter/enhancer SV40. L'espressione di questo enzima conferisce resistenza all'antibiotico G418. Il pTarget™ oltre a essere un T- vector, contiene una sequenza alfa-peptide della beta-galattosidasi permettendo così di discriminare i cloni ricombinanti (colonie bianche) dai cloni privi di inserto (colonie blu). Il vettore contiene inoltre una regione polylinker con più siti di restrizione. Per valutare la presenza dell'inserto nel vettore, i cloni ricombinanti sono stati digeriti con enzima di restrizione XhoI. Il prodotto della digestione, valutato su gel d'agarosio all'1%, evidenzia la presenza di una banda corrispondente alla somma data dalla lunghezza del vettore (5670 bp) e all'inserto (3767 bp) (fig 15).

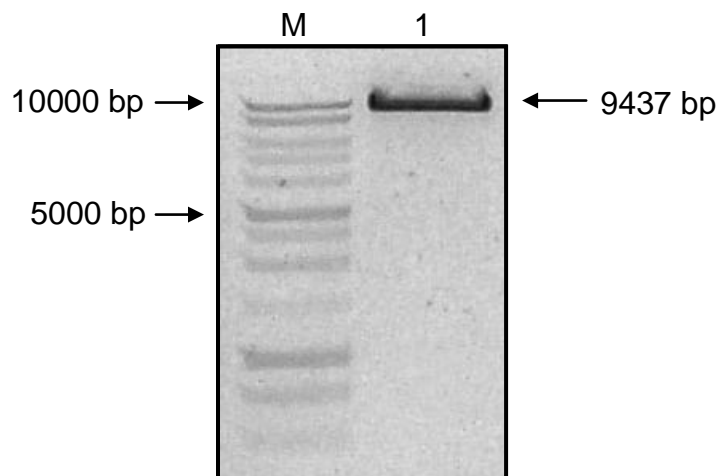


Fig.15-Digestione dei cloni ricombinanti con enzima XhoI;
M: marker 1Kb; 1: vettore (5670 bp)+ inserto (3767 bp)

La sequenza diretta della preparazione plasmidica (maxi prep) dei cloni LPL wt e mut ha confermato la corretta sequenza nucleotidica degli inserti clonati (fig.16 a,b).

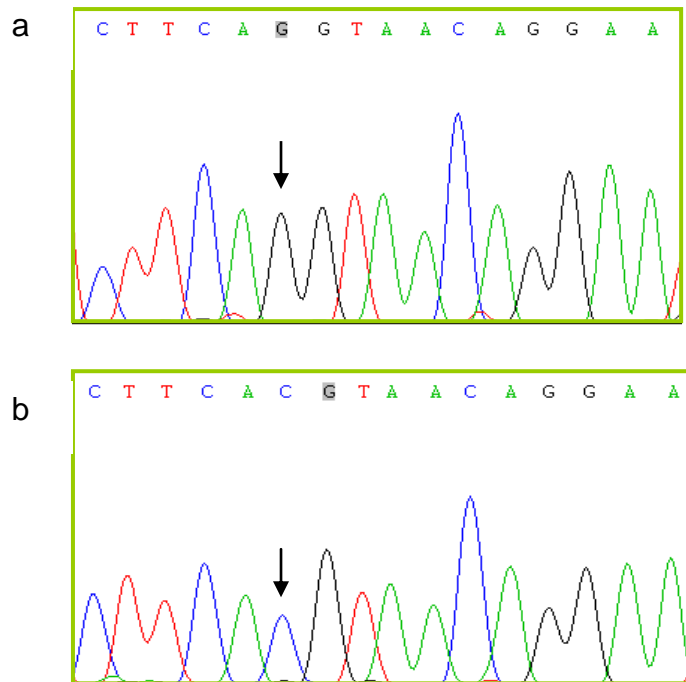


Fig.16-Sequenza mini pTargetvector LPLwt (a); Sequenza mini pTargetvector LPLmut (b)

Dopo aver ottenuto i cloni ricombinanti è stata effettuata la trasfezione sulla linea cellulare COS-1. Questa linea cellulare costituisce un ottimo modello per il nostro studio in quanto, non esprimendo il gene dell'LPL, ci permette di valutare eventuali differenze nei trascritti che sono espressione diretta dei due vettori e non espressione intrinseca delle cellule. 2×10^5 cellule COS-1 sono state piastrate in piastre da 24 well e, raggiunta la confluenza dell'80%, sono state trasfettate con il vettore pTarget vuoto, pTargetvector LPLwt o mut e incubate per 48 h al 5% CO₂ a 37°C. Successivamente è stato estratto l'RNA totale mediante kit commerciale TRI Reagent (Roche) ed è stata valutata l'integrità dell'RNA su gel d'agarosio all'1%. Per valutare l'espressione dei trascritti derivati dalle due forme di LPL clonate nel vettore di espressione (wt e mut) è stata effettuata una reazione di retrotrascrizione e successiva PCR (fig. 17).

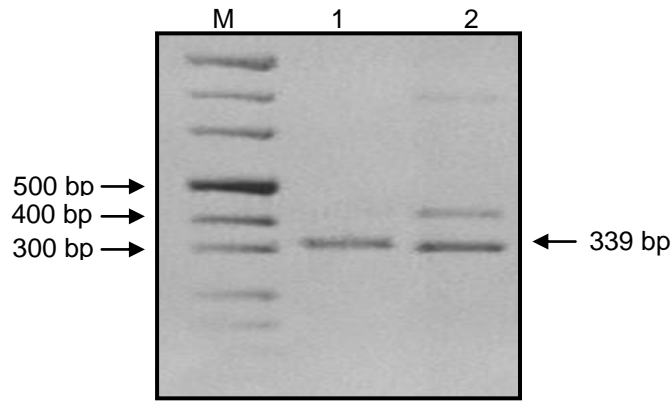
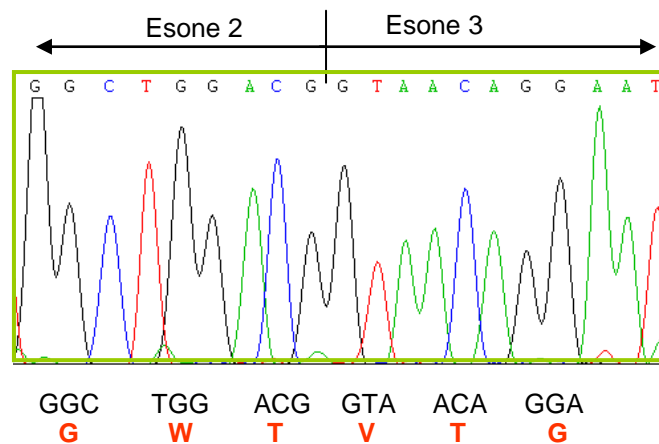


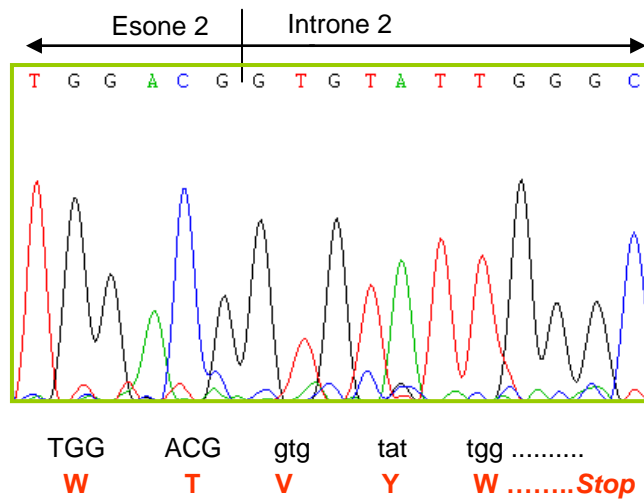
Fig.17- Gel d'agarosio all'1%. Valutazione qualitativa del cDNA. M: marker 100bp; 1: COS-1 trasfettate con pTargetvector-LPLwt; 2: COS-1 trasfettate con pTargetvector-LPLmut

Il diverso pattern di espressione ottenuto dai risultati dell'RT-PCR mostra chiaramente che la mutazione di splicing nel gene LPL (IVS2-1G>C) ha un effetto sulla produzione dell'mRNA. La linea 1 della fig.16 rappresenta l'amplificato derivato da RNA di cellule trasfettate con pTargetvector-LPLwt. Come atteso, la banda corrisponde ad un size di 339 bp pari alla sequenza nucleotidica dell'esone 2 immediatamente seguito dalla sequenza nucleotidica dell'esone 3.

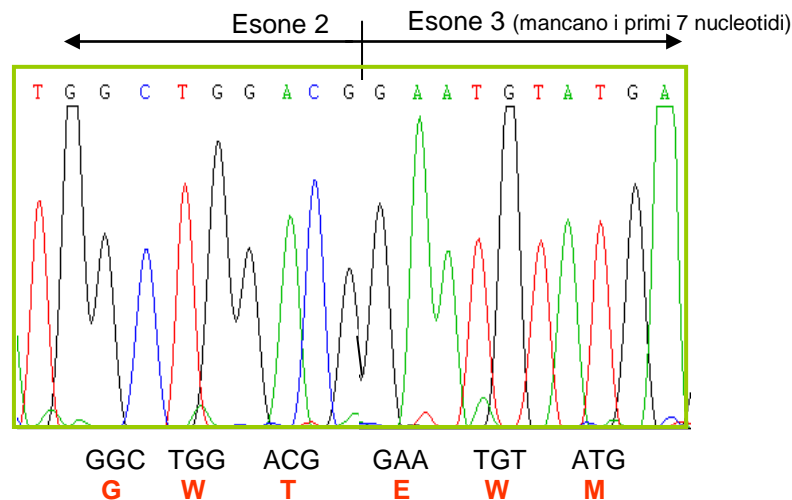


La linea 2 rappresenta l'amplificato ottenuto da RNA estratto da cellule trasfettate con pTargetvector-LPLmut. L'analisi di sequenza eseguita sulle due bande ottenute ha permesso di comprendere il meccanismo di splicing alternativo che si ha in presenza della mutazione. La banda di circa 400 bp

corrisponde all'esone 2, parte dell'introne 2 (precisamente 72 bp), e dall'esone 3.

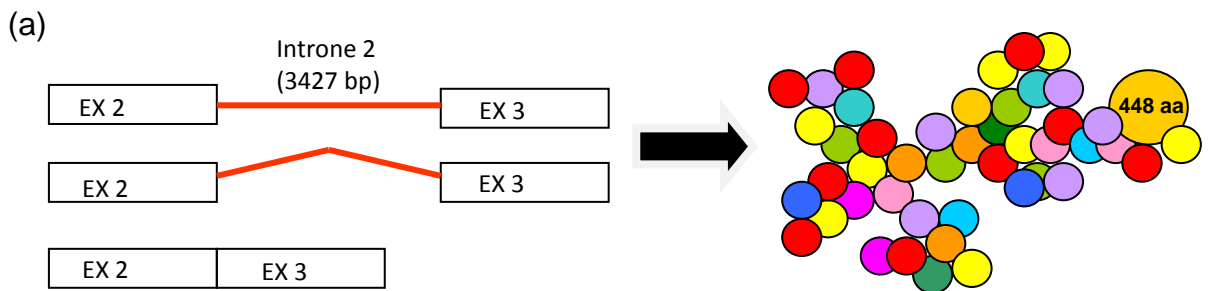


La banda pari ad una lunghezza di 330 bp circa corrisponde all'esone 2 e all'esone 3 privo dei primi 7 nucleotidi al 5'.

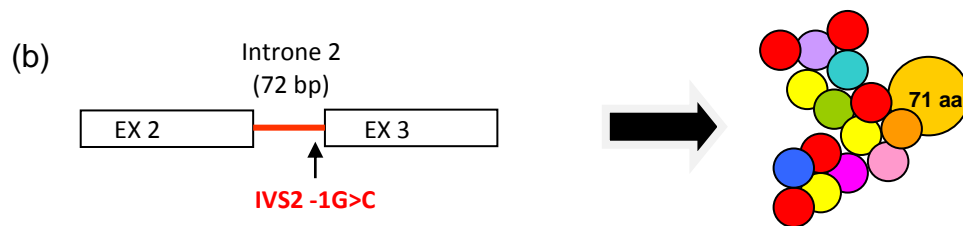


Queste due forme diverse di mRNA che vengono trascritte determinano un'alterazione del frame di lettura delle triplette nucleotidiche con conseguente formazione di due codoni di stop prematuri e produzione di due diverse proteine LPL tronche che vanno incontro a prematura degradazione. Di seguito viene rappresentato schematicamente il meccanismo di splicing alternativo dovuto alla presenza della mutazione. In (a) è rappresentato il corretto splicing che determina la formazione di un

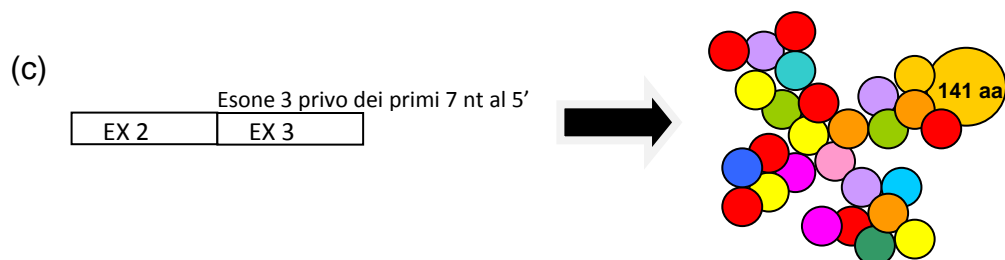
mRNA maturo normale e conseguente produzione di una proteina LPL wt costituita da 448 amminoacidi.



In (b) e (c) sono rappresentati i meccanismi di splicing alternativi osservati nel probando portatore della mutazione IVS2-1G>C. In uno dei due mRNA che vengono trascritti viene incorporato un frammento di 72 bp dell'introne 2 con conseguente formazione di una proteina di 71 amminoacidi, priva della triade catalitica indispensabile all'attività funzionale dell'LPL.



L'altro mRNA alternativo privo dei primi 7 nucleotidi al 5' dell'esone 3, comporta la formazione di una proteina trunca di 141 amminoacidi e priva di attività funzionale.



IDENTIFICAZIONE DELLA MUTAZIONE W464X NEL GENE LMF-1

Il probando M.B. è un uomo di 42 anni, tunisino. I pochi dati clinici familiari noti non evidenziano patologie cardiovascolari o disturbi del metabolismo lipidico in entrambi i genitori. La condizione di ipertrigliceridemia severa è stata riscontrata per la prima volta nel 1999, all'età di 32 anni, in occasione del primo episodio di pancreatite acuta. La terapia dietetica (contenuto di grassi <15%) e con acidi grassi omega-3 non è risultata efficace nel ridurre i livelli di trigliceridi. Un secondo evento di pancreatite si è verificato all'età di 38 anni.

Nel febbraio del 2006 l'assetto lipidico mostrava livelli di trigliceridi pari a 2400 mg/dl, colesterolo totale 374 mg/dl, HDL-col 44 mg/dl e un soprappeso con un BMI pari a 29 Kg/m². La figura 10 mostra i livelli di trigliceridi nel tempo ed in relazione a vari trattamenti farmacologici. Durante questo periodo i livelli di trigliceridi hanno subito fluttuazioni tra 696 e 2400 mg/dl; tali variazioni erano probabilmente dovute a scarsa compliance e/o modesta risposta al trattamento ipolipidemizzante. A causa della scadente risposta al trattamento con fenofibrato si è optato per il trattamento con gemfibrozil (600 mg due volte al dì) supplementato con acidi grassi omega 3.

Il probando si è sottratto alle visite di follow-up per un anno e ed è stato rivalutato dopo il terzo episodio di pancreatite acuta in occasione del quale è stato riscontrato diabete mellito di tipo II. Al trattamento ipolipemizzante è stata associata la somministrazione di insulina Aspart per via sottocutanea.

Il trattamento con insulina, fibrati, omega-3 e dieta povera in grassi ha ridotto i livelli plasmatici di TG a 195 mg/dl. Durante un periodo di digiuno per motivi religiosi (Ramadan) ha sospeso il trattamento con conseguente ripresa della ipertrigliceridemia. Un controllo di follow-up effettuato due settimane dopo la ripresa della terapia ha mostrato un netto calo dei livelli di trigliceridi (fig.18).

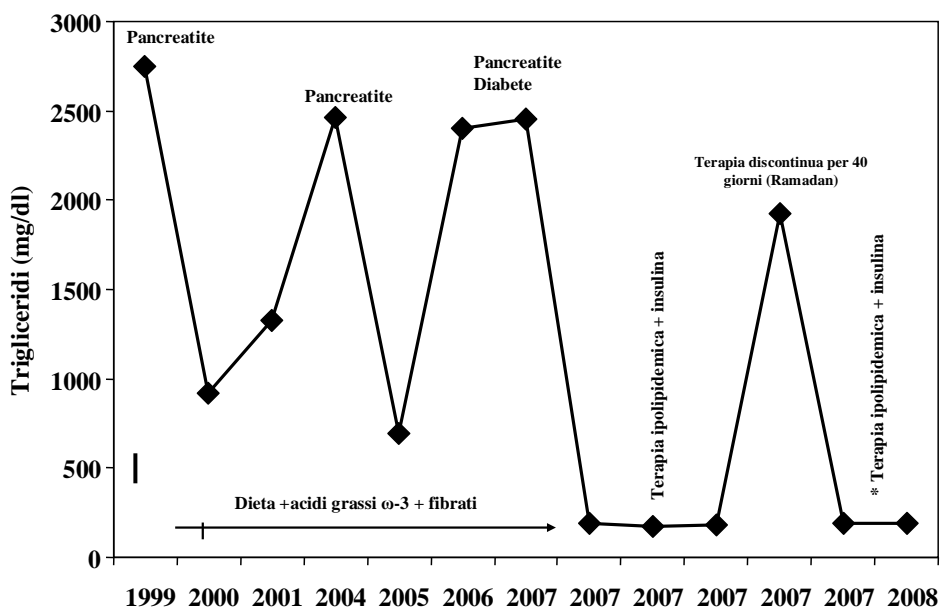


Fig. 18- Rappresentazione schematica dell'andamento dei TG dal 1999 al 2008 del soggetto con mutazione W464X

ANALISI GENETICA

L'analisi genetica non ha evidenziato mutazioni a carico dei tre geni candidati noti (LPL, ApoAV, ApoCII). Il genotipo APOE è risultato E2/E3 per il probando e il figlio. È stata identificata una sostituzione nucleotidica G/A in omozigosi nell'esone 9 del gene LMF-1 che converte un triptofano in un codone di stop (c.1395G>A-W464X). La presenza della mutazione è stata confermata in tre diverse amplificazioni indipendenti. Il figlio del probando è risultato portatore della stessa mutazione in eterozigosi (fig.19 a,b,c).

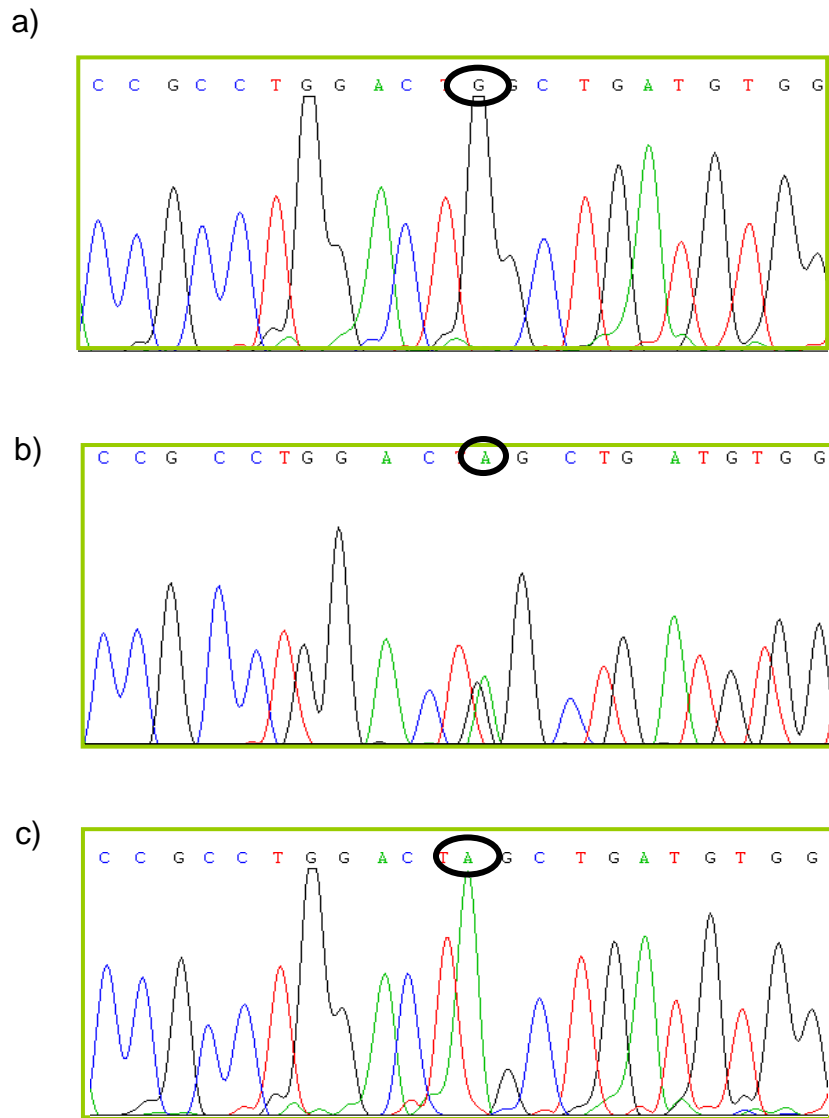


Fig. 19- Sequenza Lmf-1 esone 9 WT (a), W464X in eterozigosi (b) e W464X in omozigosi (c)

La mutazione nel gene LMF-1 identificata nel probando (c.1395G>A-W464X) inserisce un sito di restrizione per l'enzima AluI. Come test di conferma per la presenza della mutazione è stata condotta una analisi di RFLP utilizzando l'enzima AluI (10U/ μ l) (Fermentas). Tale analisi è stata effettuata su amplicone di un soggetto normale, del probando portatore della mutazione in omozigosi e sul figlio portatore in eterozigosi. I prodotti di PCR dell'esone 9 del gene LMF-1 sono stati digeriti con 5 unità di enzima per 2 ore a 37°C. I prodotti di digestione sono stati valutati mediante elettroforesi orizzontale su gel Metaphor (Biospa) al 4%.

L'analisi di restrizione dell'amplicone contenente l'esone 9 (330 bp) mostrava il seguente pattern: 194 bp e 136 bp per l'amplicone wt; 136 bp, 115 bp e 79 bp per l'amplicone mutato in omozigosi; 194 bp, 136 bp, 115 bp e 79 bp per l'amplicone mutato in eterozigosi. La figura 20 mostra il risultato dell'analisi di RFLP che conferma la presenza della mutazione in omozigosi nel probando e in eterozigosi nel figlio.

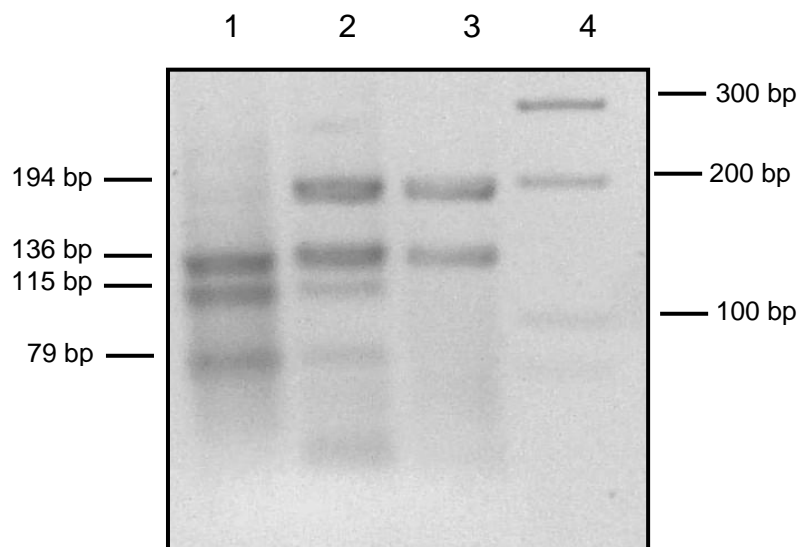


Fig.20: Pattern di restrizione con enzima AluI: linea 1 mutato omozigote; linea 2 mutato eterozigote; linea 3 normale; linea 4 marker 100 bp

Nonostante questa variante sia responsabile della formazione di un codone di stop prematuro e quindi verosimilmente associata al fenotipo, si è deciso di analizzare 300 soggetti italiani non consanguinei; la mutazione non è stata identificata in nessun soggetto.

L'analisi del gene LMF-1 negli altri 10 soggetti affetti da ipertrigliceridemia severa ha rivelato la presenza di alcune varianti aminoacidiche sinonime. Solo in un soggetto è stata individuata una sostituzione nucleotidica G/A in eterozigosi nell'esone 1 del gene LMF-1 che converte una glicina in acido aspartico (c.111 G/A G36D). Tale variante non sinonima è stata ricercata in un gruppo di 100 soggetti normolipidemicici ed è stata

identificata con una frequenza del 10% e considerata quindi una variante polimorfica (tabella 3).

Varianti (cDNA)	Esone	Proteina	Frequenza % in soggetti ipertrigliceridemici	Frequenza % in soggetti normolipidemici (controlli)
c.111G>A	Ex. 1	G36D	0.05	0.01
c.310G>A	Ex. 2	T102T	0.03	Non analizzata
c.544G>A	Ex. 3	T180T	0.05	Non analizzata
c.547G>A	Ex. 3	G181G	0.25	Non analizzata
c.668 -35T>C	Ex. 4		0.01	Non analizzata
c.668 -36T>C	Ex. 4		0.05	Non analizzata
c.733+18C>G	Ex. 5		0.02	Non analizzata

ATTIVITA' DI LPL ED HL

La massa dell'LPL, l'attività dell'LPL e dell'HL su plasma post-eparinico sono state misurate nei due probandi e in 69 soggetti normolipidemici. Il saggio post-eparinico non è stato effettuato sul figlio del probando M.B. per mancato consenso dei genitori. I livelli dell'attività post-eparinica e della massa dell'LPL nel probando portatore della mutazione del gene Lmf-1 risultano ridotti del 76% e 50% rispettivamente, paragonati all'attività e alla massa dei soggetti normolipidemici. Il soggetto affetto da chilomicronemia familiare dovuta a difetto di LPL, come atteso, presenta una attività pari a zero associata a massa zero. L'attività della lipasi epatica nel probando con la mutazione in LMF-1 W464X risulta ridotta del 27% se paragonata ai controlli normolipidemici (fig 21).

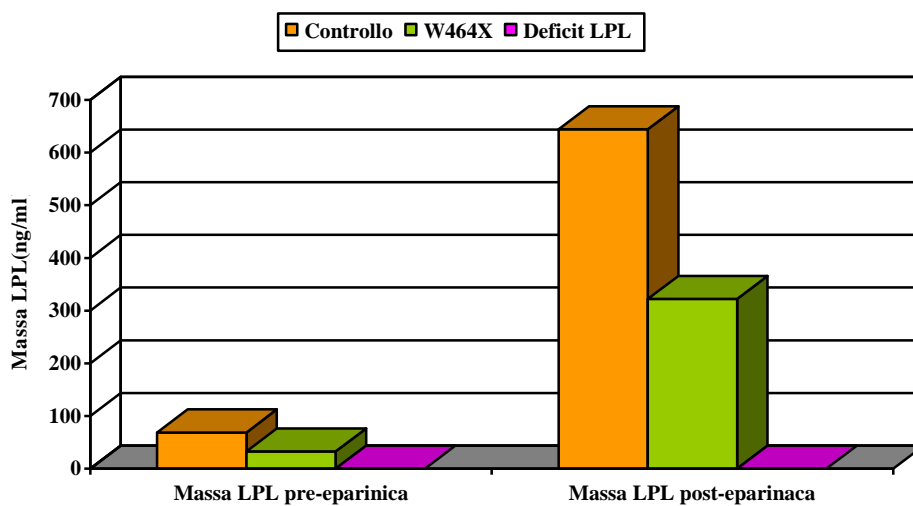
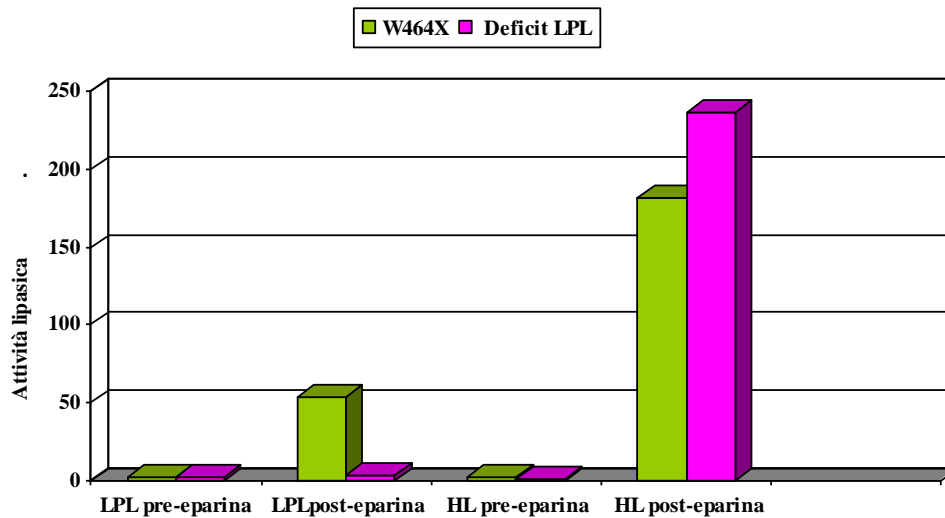


Fig. 21- Grafico rappresentante l'attività e massa dell'LPL pre e post-eparinica nel controllo, nel soggetto con mutazione W464X e nel soggetto con mutazione nel gene LPL (IVS2-1G>C)

ANALISI FUNZIONALE DI LMF-1 (W464X)

La presenza di un codone di stop prematuro è indice della diminuzione dell'espressione di LMF-1 attraverso una instabilità dell'RNA messaggero con conseguente degradazione dello stesso. Per confermare l'idea che la mutazione potesse essere responsabile dell'ipertgliceridemia del probando

è stato testato l'effetto della troncatura W464X sulla maturazione della LPL. Gli studi sono stati condotti in vitro in un sistema che permette di ristabilire la maturazione e secrezione dell' LPL in una linea cellulare LMF -1 deficiente.

In contrasto con la mutazione descritta da Peterfly (Y439X) che non attiva la maturazione dell'LPL, la mutazione W464X è in grado di ripristinare parzialmente l'attività dell'LPL; in ogni caso la quantità di LPL secreta è notevolmente ridotta rispetto alla proteina LMF -1 wt.

Analisi di western blot indicano che l'espressione di LMF-1 W464X è notevolmente ridotta rispetto alla proteina wt (fig. 22a), indicando che la mutazione riduce la sintesi o verosimilmente incrementa il turnover di proteina tronca. A tal proposito è stato valutato l'effetto della troncatura W464X attraverso analisi dell'attività specifica di LMF-1, rivelando che la mutazione riduce notevolmente l'attività di LMF-1 rispetto al wt (fig 22b). In conclusione, la mutazione W464X riduce sia l'espressione che l'attività specifica di LMF-1.

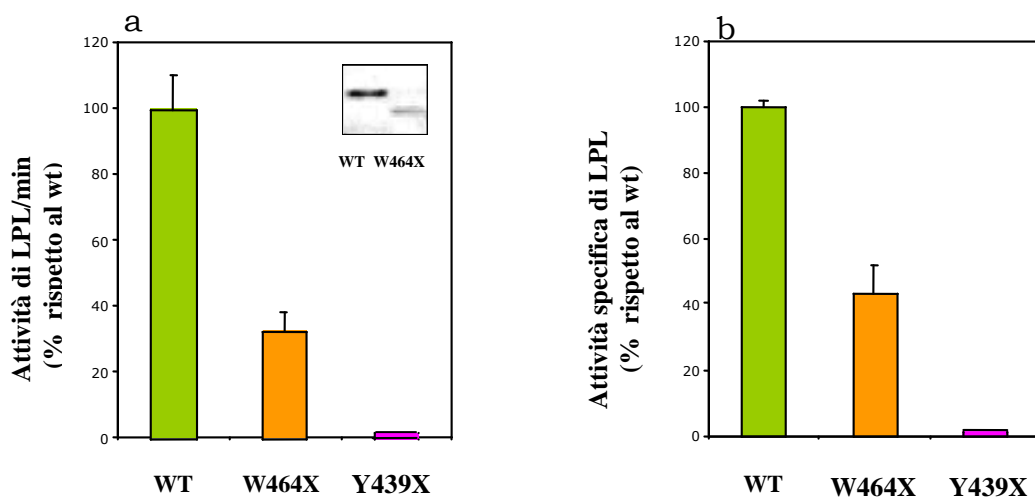


Fig 22- a:Attività della proteina LPL secreta dopo trasfezione su cellule cld/cld con costrutto contenente Lmf-1 wt, Lmf-1 W464X e Lmf-1 Y439X. In alto: analisi di western blot su lisato proteico di cellule cld/cld trasfettate con Lmf-1 wt e W464X.
b. attività specifica dell'LPL aggiustata rispetto al wt

La fig.23 rappresenta le tre proteine Lmf-1 ad oggi note: la proteina Lmf-1 wt di 567 amminoacidi, la proteina Lmf-1 Y439X identificata da Peterfly nel 2007 e la proteina Lmf-1 W464X identificata presso il nostro laboratorio.

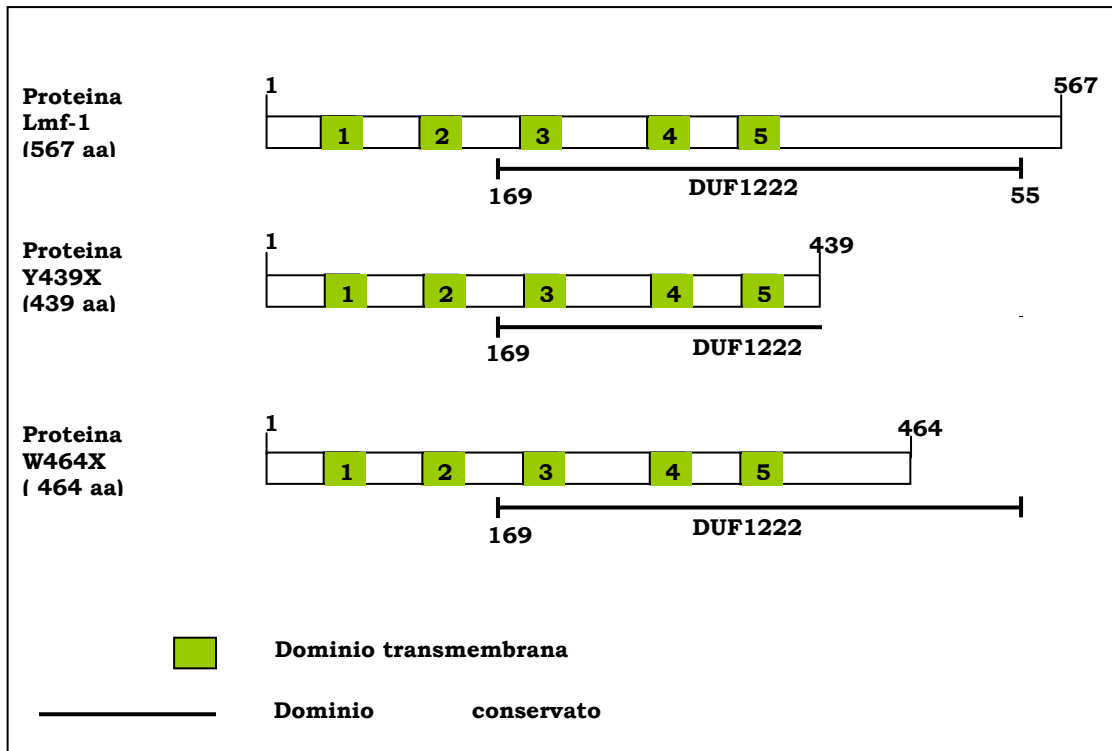


Fig 23- Rappresentazione schematica della proteina Lmf-1 wt, mutata Y439X e mutata W464X

DISCUSSIONE

Gli studi eseguiti da diversi ricercatori nel corso degli ultimi anni hanno permesso di chiarire le cause genetiche delle ipertrigliceridemie severe evidenziando il ruolo chiave dato da tre geni quali LPL, ApoAV, ApoCII, coinvolti nel metabolismo dei trigliceridi. Tra queste proteine un ruolo di spicco è ricoperto dall'LPL, una lipoproteina localizzata sulla superficie dell'endotelio capillare che idrolizza i trigliceridi presenti sui chilomicroni e VLDL. Per poter svolgere correttamente il suo ruolo, la proteina LPL necessita di attivatori e cofattori che cooperino tra loro. La proteina ApoCII, insieme con la proteina ApoAV, è il cofattore necessario per rendere enzimaticamente attiva la proteina LPL. Nel nostro studio abbiamo condotto l'analisi genetica dei tre geni candidati su 24 probandi affetti da severa ipertrigliceridemia. Abbiamo selezionato i probandi in base ai livelli di trigliceridi (superiori a 1000 mg/dl), escludendo le forme secondarie di ipertrigliceridemia. Questo studio ha permesso di evidenziare la presenza di 10 mutazioni a carico del gene LPL, 1 mutazione a carico del gene ApoCII e nessuna mutazione a carico del gene ApoAV.

Tra le mutazioni identificate è stata individuata una nuova variante nel gene LPL mai descritta in precedenza, nel sito accettore di splicing dell'introne 2 (IVS2-1G>C) in omozigosi, in un soggetto affetto da chilomicronemia severa. L'analisi bioinformatica eseguita mediante il programma splice site (<https://splice.uwo.ca>) predice che la mutazione potrebbe determinare una alterazione dello splicing. Lo studio funzionale della variante identificata ha permesso di comprendere i due diversi meccanismi di splicing alternativi che si determinano come conseguenza della presenza della variante. I due mRNA alternativi trascritti presentano uno una porzione di 72 paia di basi dell'introne 2, e l'altro risulta privo dei primi 7 nucleotidi al 5' dell'esone 3. Ciò determina la traduzione di due diverse proteine LPL tronche di 71 e 141 amminoacidi, che vanno incontro a precoce degradazione. L'analisi dell'attività e della massa dell'LPL eseguita su plasma del soggetto portatore della mutazione, confrontato con il plasma di una coorte di soggetti controllo, ha evidenziato la totale

assenza di funzionalità e massa della proteina mutata, confermando la correlazione causa-effetto tra la variante IVS2-1G>C e l'ipertrigliceridemia. Dai dati di sequenza ottenuti è stato possibile verificare che, in linea con i dati di letteratura recentemente pubblicati da Hegele, le mutazioni a carico dei geni LPL, ApoCII, ApoAV, riescono a giustificare circa il 40% dei casi di chilomicronemia primitiva. Visto l'interesse della comunità scientifica su nuovi geni candidati come causa di chilomicronemia severa, abbiamo eseguito l'analisi genetica dei geni GPIHBP1 e LMF-1 su quei soggetti in cui risultava ancora ignota l'eziologia della ipertrigliceridemia. Come già spiegato nella parte introduttiva, la proteina GPIHBP1 agisce come piattaforma molecolare per la proteina LPL che può così idrolizzare i trigliceridi presenti sui chilomicroni e le VLDL. La proteina LMF-1 gioca un ruolo chiave nella maturazione dell'LPL nel reticolo endoplasmatico. Eventuali mutazioni a carico di questi geni possono dunque interferire con la normale funzione di chaperone molecolare e di fattore di maturazione dell'LPL impedendone una corretta maturazione e conseguente chilomicronemia. L'analisi del gene GPIHBP1 non ha permesso di evidenziare la presenza di varianti causali di chilomicronemia; sono state identificate delle varianti polimorfiche presenti anche nella popolazione generale. L'analisi del gene LMF-1, invece, ha permesso di identificare la seconda mutazione ad oggi nota (W464X) in omozigosi, in un probando di nazionalità tunisina con livelli di trigliceridi superiori a 1000 mg/dl. Peterfly e collaboratori, nel 2007, individuarono la prima mutazione nel gene LMF-1 (Y439X), come causa di ipertrigliceridemia. Dal confronto tra il caso studiato da Peterfly e il nostro probando possiamo affermare che entrambi i pazienti presentano ipertrigliceridemia severa, ricorrenti episodi di pancreatite e diabete mellito di tipo 2; il nostro probando, però, non presenta lipodistrofia e xantomi tuberosi. Una interessante differenza tra i due soggetti risiede nell'attività residua dell'LPL nel plasma post-eparinico e nella risposta alla terapia. Peterfly dimostra un decremento dell'attività plasmatica dell'LPL del 93% nell'individuo affetto, mentre nel nostro probando è stata evidenziata una riduzione del 76% dell'attività lipasica

comparata con l'attività dei soggetti normolipidemicici. L'attività post-eparinica dell'HL risulta ridotta in minor misura (27% rispetto al 50%). Sebbene la mutazione W464X e la mutazione Y439X si trovino nello stesso dominio DUF1222, l'effetto della mutazione W464X risulta meno dannoso sulla maturazione dell'LPL (fig.15). I livelli dei TG dei due probandi sono pressochè simili alla diagnosi. Il paziente portatore della mutazione Y439X sotto trattamento con metformina e dieta povera di lipidi presenta TG pari a 606 mg/dl. Il nostro probando, trattato con gemfibrozil, insulina e omega-3, mostra una sostanziale riduzione dei TG (195 mg/dl). Questo può essere spiegato ammettendo una maggiore conservazione dell'attività di maturazione dell'LPL operata da LMF-1 W464X rispetto alla mutazione Y439X.

Un'altra differenza sta nella terapia a cui erano sottoposti i due pazienti durante l'analisi dell'LPL: il nostro paziente era in trattamento con fibrati e insulina, che generalmente incrementano l'attività dell'LPL, mentre il probando con mutazione Y439X era in trattamento con metformina e dieta ipolipidica. Per questo motivo possiamo ipotizzare che l'insulina e/o i fibrati possono influire sull'attività della LPL e sulla sua maturazione attivando chaperon molecolari diversi da LMF-1.

Paragonando il probando F.G., portatore della mutazione IVS2-1G>C nel gene LPL, con il probando M.B., portatore della mutazione W464X nel gene LMF-1, possiamo sottolineare che sono presenti delle differenze importanti soprattutto per quanto riguarda la valutazione della massa e dell'attività della proteina LPL ed HL. In particolare, è possibile notare che il soggetto portatore della mutazione nel gene LPL ha una massa e attività della proteina pari a zero. Il soggetto portatore della mutazione in LMF-1 presenta una attività residua della proteina LPL pari a circa il 24% rispetto ad un soggetto normale. Riguardo l'attività della proteina HL, non si evidenziano, come atteso, differenze sostanziali tra il soggetto portatore della mutazione nel gene LPL rispetto ai controlli. Uno dei motivi che possono spiegare queste differenze risiede nel fatto che le mutazioni ricadono su due geni diversi, che partecipano in modo diverso nel

metabolismo dei trigliceridi. La proteina LPL, come già ampiamente descritto, riveste un ruolo centrale nell'idrolisi dei trigliceridi; mutazioni che alterano la normale produzione di una proteina funzionante determinano una diminuita o azzerata attività proteasica, che si esplica con un notevole aumento dei trigliceridi e/o chilomicroni. La proteina LMF-1, uno dei fattori di maturazione più importanti della proteina LPL, sebbene ricopre un ruolo fondamentale per il metabolismo dei trigliceridi, in caso di mutazioni geniche, può determinare una parziale attivazione della proteina LPL. Qualora il gene LMF1 risulti mutato, altri fattori quali ApoCII e ApoAV potrebbero compensarne il deficit, permettendo di attivare, seppur in minor misura, la proteina LPL, che potrà quindi svolgere la sua funzione idrolizzando i trigliceridi. Questo può spiegare il fatto che il soggetto con mutazione a carico del gene LMF-1 presenta una attività residua della proteina LPL pari al 24% rispetto alla totale assenza di attività riscontrata nel soggetto con mutazione nel gene LPL. Concludendo possiamo riassumere che, attraverso questo studio condotto è stato possibile individuare diverse mutazioni a carico del gene LPL, tra cui una nuova mutazione di splicing, come causa di chilomicronemia. Le altre mutazioni identificate, già note in letteratura, hanno permesso di caratterizzare geneticamente 10 soggetti sui 24 studiati. Abbiamo inoltre identificato la seconda mutazione patogenetica nel gene LMF-1 (W464X) in un paziente affetto da ipertrigliceridemia severa. Questi dati forniscono informazioni sui meccanismi genetico-molecolari alla base delle chilomicronemie primitive e indicano un percorso a tappe da seguire per porre diagnosi genetica di ipertrigliceridemia, che prevede in prima battuta la valutazione dei geni candidati "classici" (LPL, ApoCII, ApoAV) e successivamente dei nuovi geni candidati (GPIHBP1 ed LMF-1).

BIBLIOGRAFIA

- Al-Shali K, Wang J, Fellows F, Huff MW, Wolfe BM, Hegele RA. Successful pregnancy outcome in a patient with severe chylomicronemia due to a compound heterozygosity for mutant lipoprotein lipase. *Clin Bioch* 35: 125-30, 2002.
- Aouizerat BE, Kulkarni M, Heilbron D, Drown D, Paskin S, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP. Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids. *J Lipid Res* 44: 1167-73, 2003.
- Attie AD. High-maintenance proteins and hypertriglyceridemia. *Nature Genetics* 39: 1424-5, 2007.
- Austin MA, McKnight B, Edwards KL, et al. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: a 20-year prospective study. *Circulation* 101: 2777-82, 2000.
- Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 9: 326-34, 1989.
- Barbagallo CM, Aversa MR, Citarrella R, Rizzo M, Amato M, Noto D et al. Transient chylomicronemia preceding the onset of insulin-dependent diabetes in a young girl with no humoral markers of islet autoimmunity. *Eur J Endocrinol* 150: 831-6, 2004.
- Barter PJ, Rye KA 2008 Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:39–46

- Beigneux AP, Davies B, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale P, Bunting S, Walzem RL, Wong JS, Blaner WS, Ding ZM, Melford K, Wongsiriroj N, Shu X, de Sauvage F, Ryan RO, Fong LG, Bensadoun A, Young SG 2007 Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* 5:279– 291.
- Beigneux AP, Davies BS, Bensadoun A, Fong LG, Young SG 2009 GPIHBP1—a GPI-anchored protein required for the lipolytic processing of triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res* 50(Suppl):S57–S62.
- Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, Gin P, Melford K, Peter J, Walzem RL, Weinstein MM, Davies BS, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ, Fong LG, Dallinga-Thie GM, Young SG 2009 Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:956–962.
- Ben-Zeev O, Mao HZ, Doolittle MH. Maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. Concurrent formation of functional dimer and inactive aggregates. *J Biol Chem* 277: 10727-38, 2002.
- Boedeker JC, Doolittle MH, White AL. Differential effect of combined lipase deficiency (cld/cld) on human hepatic lipase and lipoprotein lipase secretion. *J Lipid Res* 42: 1858-64, 2001.
- Briquet-Laugier V, Ben-Zeev O, White A, Doolittle MH 1999 cld and lec23 are disparate mutations that affect maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. *J Lipid Res* 40:2044–2058
- Brunzell JD, Deeb SS 2001 Familial lipoprotein lipase deficiency, apoC-II deficiency and hepatic lipase deficiency. In: Scriver CR,

Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2789–2816

- Brunzell J. Familial Lipoproteine lipase deficiencies and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th Ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. Mc Graw-Hill, New York, 1913-1932, 2001.
- Brunzell J. Hypertriglyceridemia. N Engl J Med 357: 1009-17, 2007.
- Brunzell JD, Schrott HG, Motulsky AG, Bierman EL. Myocardial infarction in the familial forms of hypertriglyceridemia. Metabolism 25: 313-20, 1976. Brunzell JD, Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WD, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. Vol. 3. New York: McGraw-Hill: 2789-816, 2000.
- Brunzell JD, Schrott HG. The interaction of familial and secondary causes of hypertriglyceridemia: role in pancreatitis. Trans Assoc Am Physicians 86: 245-54, 1973.
- Brunzell JD, Bierman EL, Chylomicronemia syndrome. Med Clin North Am 66: 455-63, 1982.
- Bucher H, Rampini S, James RW, et al. Marked changes of lipid levels during puberty in a patient with lipoprotein lipase deficiency. Eur J Pediatr 156: 121-5, 1997.
- Calandra S, Priore Oliva C, Tarugi P, Bertolini S. APOA5 and triglyceride metabolism, lesson from human APOA5 deficiency. Curr Opin Lipidol 17: 122-7, 2006.

- Chait A, Brunzell JD. Acquired hyperlipidemia (secondary dyslipoproteinemias). *Endocrinol Metab Clin North Am* 19 : 259-78, 1990.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF 2007 The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76:51–74
- Condor WE. The dietary treatment of hypertriglyceridemia. *Med Clin North Am* 66: 485, 1982.
- Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol* 86: 943-9, 2000.
- Davies, B. S., H. Waki, A. P. Beigneux, E. Farber, M. M. Weinstein, D. C. Wilpitz, L. J. Tai, R. M. Evans, L. G. Fong, P. Tontonoz. The expression of GPIHBP1, an Endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by PPAR γ . *Mol. Endocrinol*: 22(12):2766, 2008.
- Durrington P 2003 Dyslipidaemia. *Lancet* 362:717–731
- Endo K, et al. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet* 111: 570-2, 2002.
- Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem and Biophys Res Commun* 319: 397-404, 2004.

- Garber Y, Goldbourt U, Segev S, Harats D. Indices related to apo CII and CIII serum concentrations and coronary heart disease: a case-control study. *Preventive Med* 37: 18-22, 2003.
- Garcia-Otin AL, Civeira F, Peinado-Onsurbe J, Gonzalvo C, Llobera M, Pocovi M. Acquired lipoprotein lipase deficiency associated with chronic urticaria. A new etiology for type I hyperlipoproteinemia. *Eur J Endocrinol* 141: 502-5, 1999.
- Gerber Y, Goldbourt U, Cohen H, Harats D. Association between serum apolipoprotein CII and coronary heart disease. *Prev Med* 35: 42-7, 2002.
- Goldberg IJ, Paterniti JR, Franklin BH, Ginsberg HN, Ginsberg-Fellner F, Brown WV. Transient lipoprotein lipase deficiency with hyperchylomicronemia. *The American Journal of the Medical Sciences* 286: 28-31, 1983.
- Goldberg IJ, Paterniti JR Jr, Franklin BH, Ginsberg HN, Ginsberg-Fellner F, Brown WV. Transient lipoprotein lipase deficiency with hyperchylomicronemia. *Am J Med Sc* 286: 28-31, 1983.
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 52: 1544-68, 1973.
- Groenendijk M, et al. The ApoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 157: 1-11, 2001.

- Grundy SM, Mok HY, Zech L, et al. Transport of very low density lipoprotein triglycerides in varying degrees of obesity and hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 63: 1274-83, 1979.
- Havel RJ, Kane JP 2001 Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2705–2716
- Hixson JE, Vernier DT 1990 Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J Lipid Res* 31:545–548
- Hodis HN, Mack WJ, Krauss RM, et al. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: clinical aspects. *Clin Cardiol* 22: 1115-20, 1999.
- Hodis HN. Triglyceride-rich lipoprotein remnant particles and risk of atherosclerosis. *Circulation* 99: 2852-4, 1999.
- Hodis HN, Mack WJ. Triglyceride-rich lipoproteins and progression of atherosclerosis. *Eur Heart J* 19: 40-4, 1998.
- Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent for high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 3: 213-9, 1996.
- Hubacek JA. Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med* 43: 897-902, 2005.

- Huttunen JK, Ehnholm C, Kinnunen PK, Nikkila EA1975. An immunochemical method for the selective measurement of two triglyceride lipases in human postheparin plasma. *Clin Chim Acta* 63:335–347.
- Jian Wang, Henian Cao, Matthew R. Ban, Brooke A. Kennedy, Siqi Zhu, Sonia Anand, Salim Yusuf, Rebecca L. Pollex and Robert A. Hegele. Resequencing Genomic DNA of Patients With Severe Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27;2450-2455, 2007
- Koren E, Corder C, Mueller G, Centurion H, Hallum G, Fesmire J, et al. Triglyceride enriched lipoprotein particles correlate with the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 122: 105-115, 1996.
- Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 81: 13B-7B, 1998.
- Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, Adiconis X, Ordovas JM. The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res* 44: 2365-73, 2003.
- Lambert DA, Smith LC, Pownall H, Sparrow JT, Nicolas JP, Gotto AM. Hydrolysis of phospholipids by purified milk lipoprotein lipase. Effects of apoprotein CII, CIII, A and E, and synthetic fragments. *Clin Chim Acta* 291: 19-33, 2000.
- Leaf DA. Chylomicronemia and the chylomicronemia syndrome: a practical approach to management. *The American Journal of Medicine* 121: 10-2, 2008.

- Li GP, Wang JY, Yan SK, Chen BS, Xue H, Wu G. genetic effect of two polymorphism in the apolipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population. *Clin Genet* 65: 470-6, 2004.
- Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, et al. Apolipoprotein CIII and E in apoB e non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrastino risk for myocardial infarction: the ECTIM study. *J Lipid Res* 37: 508-17, 1996.
- Ma Y, Henderson HE, Murthy V, Roederer G, Monsalve MV, Clarke LA, Normand T, Julien P, Gagne C, Lambert M, Hayden MR. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med* 234: 1761-6, 1991.
- Ma Y, Ooi TC, Liu MS, et al. High frequency of mutations in the human lipoprotein lipase gene in pregnancy-induced chylomicronemia: possibile association with apolipoprotein E2 isoform. *J Lipid Res* 35: 1066-75, 1994.
- Maeda N, et al. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 269: 23610-16, 1994.
- Marcais C, Verges B, Carriere S, Pruneta V, Merlin M, Billion S, Pierrot L, Drai J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Durlach V, Moulin P. ApoA5 Q139X truncation predispose sto late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase ipairment. *J Clin Invest* 115: 2862-9, 2005.

- Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 80: 753-69, 2002.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* 43: 1997-2006, 2002.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 43: 1997-2006, 2002.
- Murthy V, Julien P, Gagne C. molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70: 101-35, 1996.
- Nabika T, et al. The genetic effect of the apoprotein AV gene of the serum triglyceride level in Japanese. *Atherosclerosis* 165: 201-4, 2002.
- Nagasaka H, Kikuta H, Chiba H, Murano T, Harashima H, Ohtake A et al. Two cases with transient lipoprotein lipase (LPL) activity impairment: evidence for the possible involvement of an LPL inhibitor. *Eur J Pediatr* 162: 132-8, 2003.
- Okamoto Y, et al. Hypertriglyceridemia caused by the autoantibody to lipases for plasma lipoproteins: a case report. *J Atheroscler Thromb* 2: 66-9, 1995.
- Oliver M, Wang X, Cole R, Gau B, Kim J, Rubin EM, Pennacchio LA. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomica* 83: 912-23, 2004.
- Parker F, Bagdade JD, Odland JF, Bierman EL. Evidenced for the chylomicron origin of lipids accumulatine in diabetic eruptive

xanthoma: a correlative lipid biochemical, histochemical and electron microscopic study. *J Clin Invest* 49: 2172-87, 1970.

- Paterniti JR, Brown WV, Ginsberg HN, Artzt K. Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. *Science* 221: 167-9, 1983.
- Pennacchio LA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294: 169-73, 2001.
- Pennacchio LA, et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Genet* 11: 3031-8, 2002.
- Peterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, Frost PH, Kane JP, Malloy MJ, Reue K, Pajukanta P, Doolittle MH. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nature Genetics* 39: 1483-7, 2007.
- Peterfy M, Mao HZ, Doolittle MH. The cld mutation: narrowing the critical chromosomal region and selecting candidate genes. *Mamm Genome* 17: 1013-24, 2006.
- Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 25: 411-417, 2005.
- Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, Catalano A, Tarugi P, Bertolini S, Calandra S. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 411-7, 2005.

- Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotta L, Bellocchio A, Bertolini S, Guardamagna O, Schaap FG 2006 A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 188:215–217.
- Ribalta J, et al. Newly identified apolipoprotein AV gene predispose to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* 48: 1597-600, 2002.
- Reue K, DoolittleMH1996 Naturally occurring mutations in mice affecting lipid transport and metabolism. *J Lipid Res* 37:1387–1405.
- Santamarina-Fojo S. The familial chylomicronemia syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27: 551-567, 1998.
- Santamarina-Fojo S, Brewer HB. Hypertriglyceridemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *J. Intern Med* 231: 669-77, 1992.
- Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. Protection against lipopoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9558-61, 1998.
- Suga S, Tamasawa N, Kinpara I, et al. Identification of homozygous lipoprotein lipase gene mutation in a woman with recurrent aggravation of hypertriglyceridemia induced by pregnancy. *J Intern Med* 243: 317-21, 1998.
- Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G 2006 Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive

monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17450–17455.

- Talmud Pj, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem* 280:28215-20, 2005.
- Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, Pennacchio LA, Humphries SE. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 11: 3039-46, 2002.
- Talmud PJ, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 11: 3039-46, 2002.
- Talmud PJ, Martin S, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kasaniemi YA, Pasternack A, Humphries SE, Syvanne M. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res* 45: 750-6, 2004.
- Taskinen MR 1987 Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 3:551–570.
- Van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 1156-9, 2002.

- Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, Yusuf S, Pollex RL, Hegele RA. Resequencing Genomic DNA of Patients with Severe Hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2450-5, 2007.
- Wiebusch H, Nofer JR, von Eckardstein A, Funke H, Wahrburg U, Martin H, Kohler E, Assmann G. Electrophoretic screening for human apolipoprotein C-II variants: repeated identification of apolipoprotein C-II(K19T). *J Mol Med* 73: 373-8, 1995.
- Yang WS, Nevin DN, Peng R, et al. A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia, and low LPL activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4462-6, 1995.
- Yin F, Doolittle MH, Pe'terfy M, A quantitative assay measuring the function of lipase maturation factor 1 (Lmf1). *J Lipid Res*, in press.
- Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H 2002 Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 43:1770–1772.
- Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *Canadian Med Assoc* 176: 1113-9, 2007.
- Zanelli T, Catapano AL, Averna MR, Barbagallo CM, Liotta A, Giardina CF et al. A new case of apo C-II deficiency with a nonsense mutation in the apo C-II gene. *Clin Chim Acta* 224 : 111-8, 1994.

INDICE

INTRODUZIONE	pag 1
Le dislipidemie.....	pag 1
La sindrome chilomicronemica.....	pag 3
Enzimi coinvolti nel metabolismo delle lipoproteine.....	pag 4
Trasporto dei lipidi esogeni.....	pag 5
Trasporto dei lipidi endogeni.....	pag 7
Sistema delle lipoproteine APOB100.....	pag 8
Sistema delle lipoproteine APOA1.....	pag 9
Sistema lipolitico	pag 10
LPL, Struttura biochimica, sintesi e funzione.....	pag 11
LPL, insulinoresistenza e diabete.....	pag 17
ApoCII ad altri mediatori dell'attività LPL.....	pag 18
Inibizione di LPL da parte di ApoCII.....	pag 18
Effetti di altre apoproteine sull'attività di LPL.....	pag 19
Correlazione tra ApoCII, ApoCIII e CHD.....	pag 19
ApoAV.....	pag 22
L' ApoAV accelera il turnover dei trigliceridi VLDL.....	pag 24
L'ApoAV stimola l'attività di LPL.....	pag 24
L'ApoAV riduce i livelli di ApoCIII e ApoB.....	pag 25
Risposta post-prandiale dei trigliceridi.....	pag 26
LPL e ipertrigliceridemia severa.....	pag 28
ApoCII e ipertrigliceridemia severa	pag 28
ApoAV e ipertrigliceridemia severa	pag 29
Nuovi geni candidati responsabili di ipertrigliceridemia severa.....	pag 30
LMF1.....	pag 31
GPIHBP1.....	pag 37
LMF-1 e ipertrigliceridemia severa.....	pag 41
OBIETTIVO DELLO STUDIO	pag 44
MATERIALI E METODI	pag 45
Scelta dei probandi.....	pag 45
Analisi biochimiche di primo livello.....	pag 45
Estrazione di DNA genomico da sangue intero.....	pag 45
Amplificazione del DNA genomico.....	pag 45
Purificazione dei prodotti di PCR.....	pag 46
Sequenziamento diretto.....	pag 46
Sequenziamento	pag 48
Attività post-eparinica di LPL e HL.....	pag 49

Costruzione di un minigene del gene LPL	pag 50
Amplificazione dell'inserto.....	pag 50
Clonaggio e costruzione del vettore di espressione	pag 51
Reazione di legame e trasformazione.....	pag 51
Analisi dei ricombinanti: minipreparazioni dei plasmidi.....	pag 51
Maxi-preparazione del DNA plasmidico.....	pag 51
Colture cellulari.....	pag 52
Trasfezione	pag 52
RT-PCR.....	pag 52
Analisi funzionale di LMF-1.....	pag 53
RISULTATI	pag 55
Caratterizzazione genetico-molecolare della mutazione IVS2-1G>C	pag 57
Caratterizzazione della variante di splicing del gene LPL	pag 58
Identificazione della mutazione W464X nel gene LMF-1	pag 61
Analisi genetica.....	pag 67
Attività di LPL ed HL.....	pag 70
Analisi funzionale di LMF-1 (W464X).....	pag 71
DISCUSSIONE	pag 74
BIBLIOGRAFIA	pag 79