



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti

DOTTORATO DI RICERCA IN:
**FISIOPATOLOGIA DEL METABOLISMO: LIPIDI E
LIPOPROTEINE
XXII CICLO**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Una nuova mutazione di splicing del gene dell'ApoB responsabile di Ipobetalipoproteinemia Familiare in una paziente con steatosi epatica

Dottorando

Dott.ssa Gaetana Di Giovanni

Coordinatore

Ch.mo Prof. M. Averna

Tutor

Dott. A. B. Cefalù

SSD MED 09

Anno Accademico 2010/2011

INTRODUZIONE

Lipoproteine

Le lipoproteine sono dei grossi complessi idrosolubili ad alto peso molecolare che regolano il trasporto dei lipidi all'interno dell'organismo. Le lipoproteine sono delle particelle sferiche con un core idrofobico costituito da trigliceridi e colesterolo esterificato circondato da un guscio anfipatico costituito da fosfolipidi, colesterolo libero ed una o più proteine chiamate apolipoproteine (Fig 1).

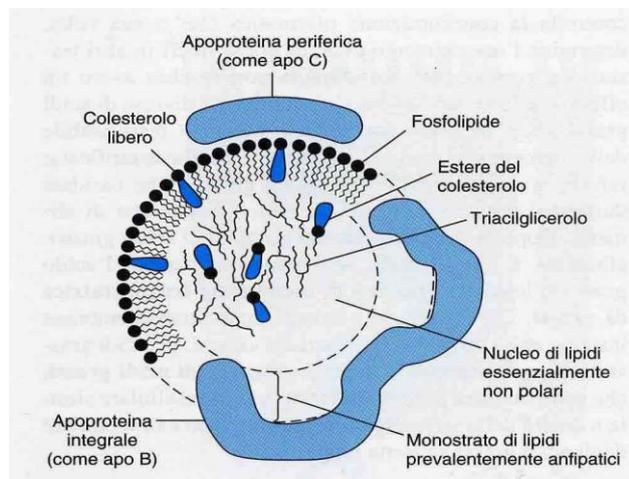


Fig. 1: Rappresentazione schematica di una particella lipoproteina

Le apolipoproteine sono delle proteine di natura anfipatica con una regione idrofobica che interagisce con i lipidi ed una regione idrofilica che prende contatto con l'ambiente acquoso (Segrest J.P et al., 1994). Proprio per questa loro natura le apolipoproteine agiscono da detergenti ed hanno un ruolo nel determinare e stabilizzare il diametro e la struttura delle lipoproteine. Le apolipoproteine svolgono ruoli molteplici. Il loro ruolo basale è di tipo strutturale e viene realizzato mediante interazioni con i lipidi (apoA-I, apoA-II, apoB-48, apoB-100); le apolipoproteine svolgono anche ruoli funzionali come quello di funzionare da sito di riconoscimento per diversi recettori cellulari che sono in grado di legare le lipoproteine (apoA-I, apoB-100, apoE), o quello di co-fattori capaci sia

di stimolare che di inibire l'attività dei principali enzimi coinvolti nel metabolismo lipoproteico ed infine quello di modulare l'attività enzimatica nel metabolismo delle lipoproteine (apo C-I, apo C-II, apo CIII) (Ginsberg HN et al., 1998; Patsch W, et al., 1996). Le lipoproteine che si ritrovano in circolo sono di dimensioni diverse: accanto alle lipoproteine più grandi in cui prevalgono i trigliceridi del nucleo rispetto ai lipidi polari del guscio, ci sono le lipoproteine più piccole in cui invece prevalgono i lipidi polari e le proteine del guscio. Poichè esiste una relazione inversa tra diametro e densità delle lipoproteine, (il guscio delle lipoproteine è più denso rispetto al nucleo) quelle più piccole risultano più dense delle lipoproteine più grandi nelle quali il rapporto tra componenti del guscio e quelli del nucleo è più basso. Pertanto sulla base della proprietà funzionali e fisiche le lipoproteine vengono generalmente classificate in cinque grandi categorie (Fig. 2):

- chilomicroni ($d < 0.96$ g/ml)
- VLDL (very low density lipoprotein ; $d= 0,950- 1.006$ g/ml)
- IDL (intermediate density lipoprotein; $d=1.006- 1.019$ g/ml)
- LDL (low density lipoprotein; $d=1.019 - 1.063$ g/ml)
- HDL (high density lipoprotein; $d=1.063- 1.210$ g/ml)

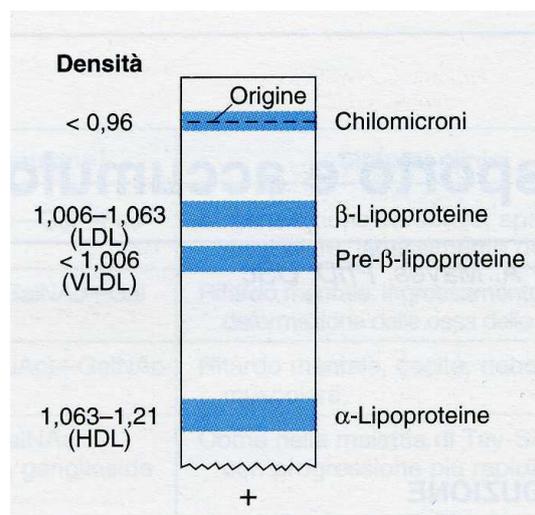


Fig.2 Classificazione delle lipoproteine

I chilomicroni sono responsabili del trasporto dei lipidi assunti con la dieta (essenzialmente trigliceridi e colesterolo non esterificato) che

vengono emulsionati dagli acidi biliari e dai fosfolipidi a formare le micelle, idrolizzate dagli enzimi pancreatici nel duodeno. I prodotti di idrolisi, colesterolo e acidi grassi, vengono assorbiti dalle cellule della mucosa del digiuno ed utilizzati per la sintesi di trigliceridi e esteri di colesterolo. I lipidi sono incorporati, assieme ai fosfolipidi e ad apoB-48 nei chilomicroni (Ginsberg HN et al., 1998; van Greevenbroek MMJ et al., 1998), ed attraverso il sistema linfatico giungono nel torrente circolatorio per essere trasportati ai tessuti muscolare ed adiposo.

Qui la componente triacilglicerolica dei chilomicroni viene idrolizzata da una lipoproteina lipasi (LPL) ed i prodotti dell'idrolisi vengono utilizzati dai tessuti periferici. Questo processo idrolitico porta ad una riduzione in massa e volume della componente lipidica dei chilomicroni formando i chilomicroni "*remnants*" ricchi in colesterolo. I *remnants* rientrano nel circolo e vengono captati dal fegato mediante il legame ad un recettore specifico.

Le VLDL sono responsabili del trasporto endogeno dei lipidi, che inizia nel fegato con l'assemblaggio e la secrezione delle particelle VLDL contenenti apoB-100. Anche le VLDL subiscono (nel sangue) come i chilomicroni una degradazione da parte della LPL. I *remnants* delle VLDL compaiono nella circolazione prima come IDL e poi come LDL (Fig. 3).

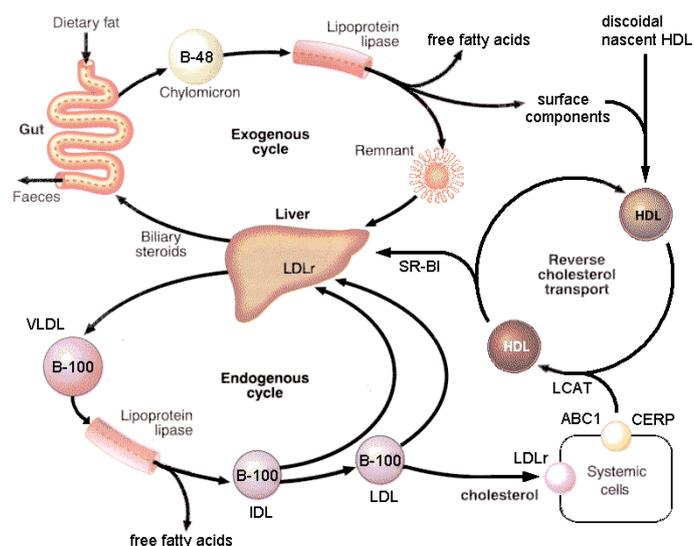


Fig 3. Rappresentazione schematica del rapporto e del metabolismo delle classi principali di lipoproteine.

Le LDL sono quindi il veicolo principale del colesterolo in circolo; e riconoscono - tramite apoB-100 – i recettori dell'LDL che si trovano in regioni specializzate della membrana rivestite sulla faccia citoplasmatica di una proteina chiamata clatrina (*coated pits*)

Queste invaginazioni si ripiegano su se stesse formando delle vescicole rivestite che, fondendosi con i lisosomi provocano l'idrolisi delle LDL e la degradazione dell' apoB-100. La lipasi lisosomiale idrolizzando gli esteri del colesterolo provoca un'aumento del colesterolo libero e quindi l'attivazione di meccanismi regolatori come l'inibizione della sintesi del colesterolo, l'immagazzinamento del colesterolo in eccesso o ancora l'inibizione della sintesi dei recettori per le LDL.

Le HDL si originano dalla degradazione di altre lipoproteine ed hanno la funzione opposta delle LDL, infatti rimuovono il colesterolo dai tessuti. Le HDL acquistano il colesterolo estraendolo dalla superficie delle cellule e convertendolo in colesterolo esterificato per poi trasportarlo al fegato, l'unico organo capace di conservare quantità significative di colesterolo (sotto forma di acidi biliari).

Il gene dell'apoB

Il gene che codifica per le apoB è un gene tessuto specifico che è espresso principalmente nelle cellule epatiche e nelle cellule epiteliali dell'intestino (Knott TJ et al.,1985).

Il gene, localizzato nel braccio corto del cromosoma 2 (Chan L et al., 1985), si estende per circa 43 kb ed è organizzato in 29 esoni e 28 introni.

(Fig 4)

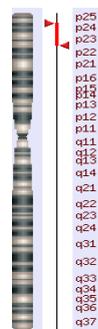


Fig 4: Localizzazione cromosomica del gene dell'apoB

All'estremità 5' del gene sono presenti una TATA box ed una CAAT box (Blackhart B.D. et al 1986) e diversi elementi di regolazione sia positivi che negativi. In particolare sono stati identificati un elemento di regolazione negativi nella regione compresa tra -2738 e -1802bp a monte del sito di inizio della trascrizione (Paulweber B et al., 1991) e diversi elementi di regolazione positiva e negativa localizzati sia nella regione del

promotore tra +1 e -898, che, nel primo esone non tradotto (Paulweber B et al., 1991; Chuang SS et al., 1995).

Anche nella regione 3' del gene si trovano elementi di regolazione: un elemento localizzato nella regione 3'UTR, 80 bp dopo il codone di stop nell'esone 29, con un probabile ruolo nel processo di terminazione della trascrizione, ed un elemento nella regione ipervariabile ricca in AT che sembra interagire con l'enzima topoisomerasi II (Levy-Wilson B et al., 1990).

Il gene presenta inoltre, elementi *enhancers* tessuto specifici localizzati nel secondo e terzo introne del gene (Brooks AR et al.,1991; Levy-Wilson B et al., 1992).

Benché siano state identificate diverse proteine nucleari leganti gli elementi regolatori sopra descritti (Zhuang H et al., 1992; Lee S-Y et al., 1996; Chuang SS et al., 1996), sono tuttavia poco noti i meccanismi e gli specifici fattori coinvolti nella regolazione dell'espressione tessuto specifica del gene.

Nell'uomo il gene sembra essere trascritto costitutivamente (i livelli di mRNA rimangono costanti) anche se la sintesi di apoB varia significativamente in relazione a fattori ambientali (Young SG et al., 1990; Pullinger CR et al., 1989; Selby SL et al., 1995) come trattamento con acido oleico, butirrato, insulina e ormoni tiroidei (Dashti N.et al.,1989; Kaptein A. et al.,1991; Moberly J.B. et al., 1990; Pullinger C.R. et al., 1989).

Tutto ciò ha portato a supporre che la regolazione dell'espressione dell'apoB avvenga a livello traduzionale (Pontrelli L.et al., 2004; Avramoglu R.K. et al., 2004).

Il gene APOB codifica sia per l'apoB-100 che l'apoB-48 grazie ad un meccanismo di editing del messaggero (fig 5)

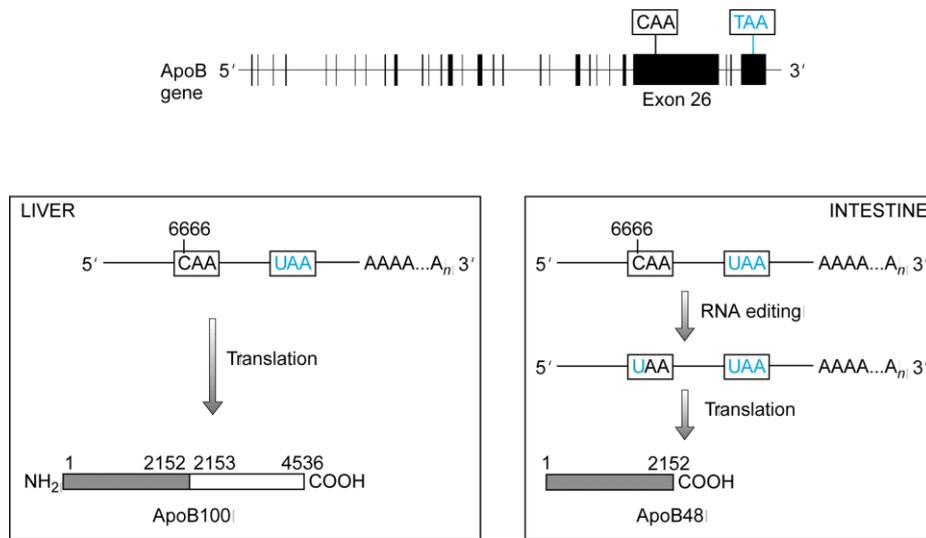


Fig.5: Meccanismo di editing dell'mRNA dell'apoB

L' Editing causa nella sequenza dell'mRNA intestinale di apoB il cambiamento della base azotata in posizione 6666 trasformando in codone di stop (UAA) il codone CAA (Chen S-H et al., 1987; Innerarity TL et al., 1996). L'attività di editing è tessuto specifica ed è ascrivibile all'attività di Apobec-1, una citidino deaminasi. Il fegato umano che presenta un'attività di editing minima sintetizza apoB-100, mentre l'intestino in cui l'attività di editing è alta sintetizza apoB48.

Struttura dell'apolipoproteina B

L'apolipoproteina B è la principale componente dei chilomicroni e delle LDL ed è presente nel plasma nelle due forme già precedentemente descritte, apoB48 e apoB100.

L'apo B-100, glicoproteina di origine epatica, è costituita da 4536 amminoacidi e ha massa molecolare di 550Kda. (Cladaras C et al., 1986; Law SW et al., 1986; Knott TJ et al., 1986; Yang C-Y et al., 1986).

La struttura primaria della proteina presenta una organizzazione strutturale pentamerica, ovvero, una struttura del tipo $\text{NH}_2\text{-}\beta\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_3\text{-COOH}$. (Segrest JP et al., 1994)

L'apo B-48, glicoproteina sintetizzata nell'intestino, è costituita da 2152 amminoacidi ed ha una massa molecolare di 264 Kda. Presenta solo i domini $\beta\alpha_1$ e β_1 (Cladaras C et al., 1986; Law SW et al., 1986; Knott TJ et al., 1986; Yang C-Y et al., 1986; Segrest JP et al., 1994) (fig 6).

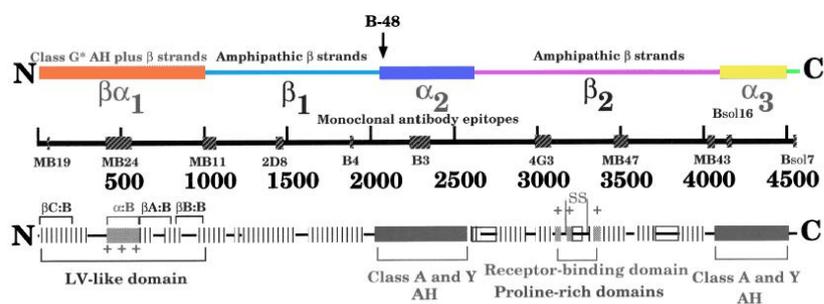


Fig. 6: Diagramma schematico del modello di struttura pentamerica dell'ApoB 100

Il dominio $\beta\alpha_1$ è costituito dai primi 1000 amminoacidi e presenta omologia di sequenza e di struttura con la vitellogenina e con la MTP (Microsomal triglyceride transfer protein) (Segrest J.P. et al., 1999; Segrest JP et al., 2001). Questo dominio, a differenza delle altre regioni della proteina presenta scarsa affinità per i lipidi (Cladaras et al., 1986).

I domini β_1 e β_2 sono regioni costituite da foglietti β e rappresentano delle porzioni non flessibili dell'apoB con elevata affinità per i lipidi (Chauhan V. et al., 1998; Segrest J.P. et al., 2001). In particolare questi domini si dispongono prendendo diretto contatto con il core lipidico facendosi spazio tra i fosfolipidi e il colesterolo libero del guscio esterno (Segrest J.P. et al., 1994; Segrest J.P. et al., 1998). Per questa loro natura sono considerati la “spina dorsale” della particella lipoproteica (Chauhan V. et al., 1998).

I domini α_2 e α_3 sono dei cluster di α eliche anfipatiche di classe A-Y (simili alle α eliche che si trovano nelle altre classi di lipoproteine) (Segrest J.P. et al., 1994). A differenza dei domini β_1 e β_2 sono regioni flessibili che permettono alla particella di adattarsi al variare della quantità di lipidi presenti (Chauhan V. et al., 1998) (Fig 7)

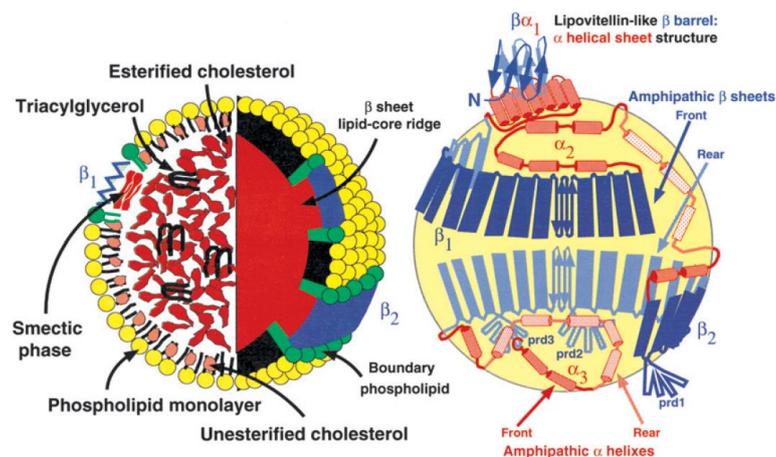


Fig.7: Diagramma schematico tridimensionale del modello di struttura pentamerica dell'apoB 100 e interazioni con la superficie di una particella di LDL.

L'apo B-100 viene glicosilata asimmetricamente a livello dei residui di asparagina a livello del sito di legame per il recettore delle LDL (Vauhkonen M. et al., 1985).

Assemblaggio delle lipoproteine

L'assemblaggio delle lipoproteine contenenti apoB, richiede l'associazione dei lipidi al polipeptide; tale associazione avviene co-traduzionalmente a livello del Reticolo Endoplasmatico Rugoso (RER) (Manchekar et al., 2004; Segrest J.P. et al 2001).

Per l'assemblaggio della particella lipoproteica è essenziale l'acquisizione del corretto *folding* della porzione N-terminale della proteina (che avviene grazie alla formazione di ponti disolfuro) (Ingram M.F. et al., 1996; Manchekart et al., 2004). Il corretto *folding* consente un'interazione ottimale tra i residui carichi positivamente della porzione N-terminale dell'apoB e l'MTP (Microsomal triglyceride transfer protein) (Hussain M.M. et al., 1998; Jiang G.Z. et al., 2005), un complesso in grado di trasferire i lipidi all'apoB ed, in vitro, anche all'interno del lume del RER (Kulinski et al., 2002; Wang S. et al., 1996).

L'MTP porta alla formazione di particelle simili per dimensione alle HDL (HDL-Like) (Segrest J.P. et al., 2001).(Fig 8)

Un *folding* non corretto o la scarsa disponibilità di lipidi, portano alla degradazione della proteina (Mason T.M., 1998; Olofsson S-O et al., 1999) mediata da proteasi presenti nel lume del RER o da ubiquitinazione(Yeung S.J. et al., 1996; Liao W. et al., 1998; Zhou M. et al., 1998).

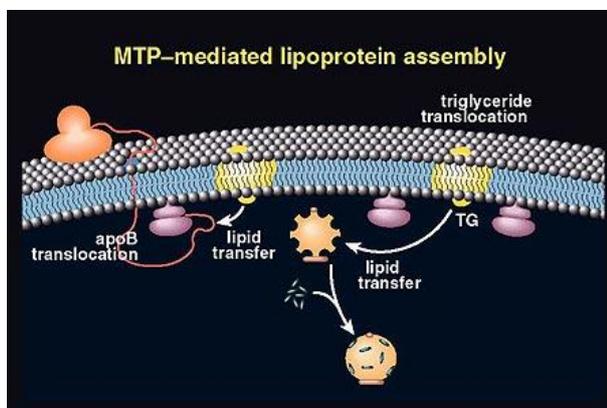


Fig 8: Schema dell'assemblaggio delle VLDL che avviene nel lume del reticolo endoplasmatico.

Riguardo alla formazione delle VLDL è stata proposta una loro formazione secondo la “two steps Hypothesis“ (Hamilton R.S. 1995), che prevede che la trasformazione delle particelle HDL-like nelle VLDL, avviene in seguito alla fusione di queste particelle povere di lipidi, con delle particelle ricche in lipidi ma prive di proteine, che sono state formate nel Reticolo endoplasmatico liscio.

Una volta formate, le particelle HDL-like vengono trasportate al Golgi dove verranno glicosilate e fosforilate (Dixon et al., 1993). Il trasporto avviene attraverso la formazione di vescicole rivestite da COPII (un complesso formato dall'associazione tra la GTPasi Sar1-b, il complesso Sec23/24 e il complesso Sec13/31).

La proteina Sar1-b, attivata dal legame col GTP, interagisce direttamente con doppio strato lipidico della membrana del RER, attraverso la sua porzione N-terminale. Una volta legata, idrolizza il GTP e ciò causa il reclutamento del complesso Sec23/24 che interagisce sia con i lipidi che con le porzioni esposte delle proteine transmembranarie; inoltre interagisce con l'apo B che, coadiuvata da hsp lega il complesso Sec23/24 e recluta Sec13/31, formando in questo modo il rivestimento più esterno delle vescicole (Bi X. et al., 2002; Antony B. et al., 2001) (Fig 9).

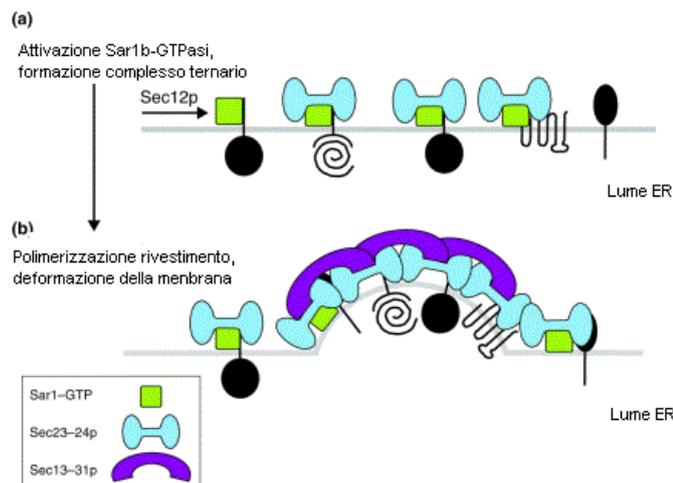


Fig 9: Rappresentazione schematica della formazione delle vescicole COPII

Una mancata glicosilazione della porzione N-terminale della proteina causa una mancata secrezione delle particelle lipoproteiche (Vukimirica et al., 2002 ; Yao Z. et al., 1997 ; Swift L.L. 1996)

Le Ipocolesterolemie Primitive

La distribuzione dei livelli plasmatici di colesterolo nelle popolazioni occidentali è regolata da interazioni complesse tra geni e fattori ambientali. Soggetti con valori di colesterolo totale (CT), LDL-colesterolo (LDL-C) ed apoB inferiori al 5°percentile (inferiori cioè rispettivamente a 128mg/dl, 90mg/dl e 50mg/dl), in assenza di altre patologie che determinano bassi livelli di colesterolo, sono affetti da Ipocolesterolemia primitiva. Esistono tre tipi di deficit lipoproteici su base ereditaria, caratterizzati da ipocolesterolemia:

- a) la Sindrome di Anderson o “ Chylomicron Retention Disease”;
- b) la Sindrome di Bassen-Konzweig o Abetalipoproteinemia;
- c) la Ipobetalipoproteinemia Familiare (FHBL).

La malattia di Anderson è la forma di ipobetalipoproteinemia con assenza selettiva di apoB-48. Sino ad oggi sono stati descritti 35 casi. I soggetti affetti sono tutti in età pediatrica e mostrano delle manifestazioni che consistono in una sindrome da malassorbimento, steatorrea e ritardo di crescita. L'endoscopia mostra generalmente alterazioni tipiche della mucosa intestinale.

Nel plasma dei soggetti affetti si nota assenza di lipoproteine contenenti apoB-48 e assenza di chilomicroni in fase postprandiale, mentre è possibile rilevare la presenza di lipoproteine contenenti apoB-100, sebbene in quantità ridotte. Inoltre risultano ridotti i livelli plasmatici di HDL, come i livelli totali di lipidi, colesterolo, fosfolipidi, carotenoidi e vitamine liposolubili. Appare normale l'assorbimento degli acidi grassi e la loro esterificazione da parte delle cellule epiteliali. Studi istologici condotti su biopsie intestinali hanno rilevato che i villi sono normalmente rappresentati e con lunghezza normale ma gli enterociti sono carichi di vacuoli contenenti materiale adiposo. L'introduzione di una dieta a basso tenore di lipidi, integrata con vitamine liposolubili (A ed E) ed acidi grassi essenziali provoca una ripresa della crescita ed una attenuazione dei sintomi gastrointestinali.

Recentemente sono state definite le basi molecolari responsabili della sindrome di Anderson; mutazioni del gene SARA2, nel cromosoma

5q31.1, codificante per la proteina Sar1b sono state associate a questo fenotipo.

La proteina Sar1-b, come già accennato, è una proteina regolatrice legante il GTP, responsabile del complesso di rivestimento delle vescicole COPII adibite al trasporto delle particelle dal RER al Golgi.

Le varianti attualmente descritte nel gene SARA2 sono mutazioni missenso che causano in Sar1b alterazioni della conformazione nella tasca di legame per il GTP, riducendo di conseguenza l'affinità di legame con lo stesso GTP e bloccando la formazione delle vescicole COP II.

Abetalipoproteinemia

Descritta da Bassen e da Konzweig è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da livelli estremamente bassi di colesterolo totale (20-50mg/dl), LDL-C ed apoB con malassorbimento dei grassi, retinite pigmentosa, atassia, neuropatia ed acantocitosi. Nel plasma dei soggetti affetti si osserva assenza di lipoproteine contenenti apoB, lipoproteine a bassissima densità (VLDL) e lipoproteine a bassa densità (LDL). Inoltre si ha un ridotto trasporto e assorbimento di grassi che ha come conseguenza un bassissimo livello di colesterolo nel plasma (Kane J.P. et al., 1995). Nei bambini si presenta con steatorrea ed assenza della crescita, in giovani adulti vi può essere un declino neurologico con perdita dei riflessi tendinei. I gravi problemi neurologici sono dovuti ad un deficit reversibile nell'assorbimento di vitamina E (Kayden H.J. et al., 1993; Kayden H.J. et al., 1983; Muller D.P.R. et al., 1985). I difetti a carico della retina sono invece dovuti all'assenza combinata della vitamina A ed E. Il trattamento con la vitamina A nel primo stadio della malattia può ripristinare le funzioni della retina ma non ne può bloccare la graduale e progressiva degenerazione.

Studi recenti hanno indicato che il difetto molecolare risiede nel gene codificante per la "Trygliceride Microsomal Transfer Protein" (MTP) localizzato nel cromosoma 4q22-24 ed organizzato in 18 esoni (Sharp D. et al., 1994). Delezioni dell'estremità C-terminale, di 30 amminoacidi, possono abolire l'attività dell'MTP o sopprimere la dimerizzazione con il

PDI responsabile della stabilizzazione del complesso (Ricci B. et al., 1995). Altre mutazioni permettono il legame con il PDI ma non hanno la capacità di trasferire i lipidi, questo dimostra che il dominio C-terminale contiene l'attività catalitica del complesso MTP.

L'assenza completa di MTP nel topo è letale; l'inattivazione fegato-specifica del gene MTP elimina la produzione delle VLDL ed LDL (Chang BH-J et al., 1999). I topi eterozigoti MTP +/- sono vitali ma hanno ridotti livelli plasmatici di LDL ed apoB (Raabe M et al., 1988; Leung G.K. et al., 2000). Inibendo farmacologicamente l'attività del complesso MTP si osserva sia in vitro che in vivo, una inibizione dose-dipendente della secrezione di lipoproteine contenenti apoB. L'iperpressione dell'MTP negli epatociti stimola la produzione di apoB (Liao W. et al., 1999).

In uno studio condotto su una famiglia tunisina di 3 pazienti con abetalipoproteinemia (Najah M et al., 2009) sono state evidenziate in due soggetti, due nuove mutazioni nell'introne 5 (c. 619-3T>G) e nell'esone 8 (c.923 G>A) del gene MTP; la prima causa la formazione di un mRNA privo dell'esone 6 che codifica per una proteina MTP tronca di 233 aminoacidi; l'altra è una mutazione nonsense che determina anch'essa la formazione di una proteina tronca. Il terzo soggetto presentava una delezione (c. 2172del T) in omozigosi nell'esone 15 del gene apoB determinando la formazione di un'apoB tronca di 706 aminoacidi.

Ipoabetalipoproteinemia Familiare

L'ipoabetalipoproteinemia familiare (FHBL) è una malattia genetica a trasmissione autosomica co-dominante caratterizzata da bassi livelli plasmatici di colesterolo ed apolipoproteina B (Kayden H.J. et al., 1985; Linton M.F. et al., 1993)

Il fenotipo FHBL può derivare da due tipi di difetti molecolari: alcuni legati al gene apo B, altri indipendenti da questo gene. La FHBL dovuta a mutazioni del gene apo B può essere associata alla presenza (forme visibili) o assenza (forme invisibili) di forme troncate di apoB

evidenziabili nelle lipoproteine plasmatiche. La presenza nel plasma di apo B troncate è funzione della loro lunghezza.

Le forme tronche di apoB vengono identificate secondo la nomenclatura in centili; la proteina matura costituita da 4536 amminoacidi è denominata apoB-100 e le forme tronche vengono identificate con il numero percentuale di amminoacidi che le costituiscono rispetto alla proteina matura. ApoB troncate di dimensioni inferiori ad apo B-25/B-27 (cioè con dimensioni corrispondenti al 25-27% dell'apo B-100) non sono evidenziabili nel plasma in quanto non secrete in forma di lipoproteine (Kane J.P. et al., 1995). L'assenza di forme tronche di apo B visibili nelle lipoproteine plasmatiche può derivare da diversi fattori:

- a) mutazioni che determinano la formazione di apo B troncate di dimensioni inferiori al 25-27 % della apoB matura (apo B-25/B-27);
- b) mutazioni del gene apo B che determinano modificazioni della sequenza amminoacidica dell'apo B tali da prevenire l'assemblaggio intracellulare di lipoproteine o aumentare il catabolismo delle lipoproteine contenenti apo B.

Nei soggetti affetti da FHBL, eterozigoti per mutazioni del gene dell'apoproteina B, circolano nel plasma almeno due popolazioni di particelle lipoproteiche contenenti apoB, quelle di sintesi epatica normali (VLDL, IDL e LDL) contenenti apoB-100, e lipoproteine contenenti le forme di apoB troncate di sintesi epatica o epatica ed intestinale (Kane J.P. et al., 1995; Krul E.S. et al., 1992). Le forme troncate di apo B più corte dell'apo B 48 sono sintetizzate sia dal fegato che dall'intestino, mentre le forme troncate più lunghe dell'apoB-48 vengono probabilmente sintetizzate soltanto dal fegato e, le concentrazioni di apoB-100 nel plasma in pazienti con FHBL sono minori dell'atteso 50% (Huang et al., 1991; Parhofer et al., 1996; Welty et al., 1997) proveniente dalla sintesi dell'allele normale dell'apoB.

Diversi studi hanno evidenziato che questa minore secrezione possa essere dovuta ad una ridotta sintesi (Krul E.S. et al., 1992; Parhofer K.G. et al., 1996; Srivastava N. et al., 1999; Welty FK et al., 1997), e la minore sintesi di apoB troncate possa essere dovuta sia ad una maggiore degradazione dell'mRNA mutato (Srivastava R.A. et al., 1999), sia anche

perché le particelle lipoproteiche contenenti le forme troncate di apoB vengono eliminate molto più rapidamente rispetto alle particelle che presentano la proteina matura (Krul E.S. et al., 1992; Gabelli C. et al., 1996; Parhofer K.G. et al., 1992; Parhofer K.G. et al., 1990).

Tutte le mutazioni, eccetto due, del gene dell'apoB riportate fino ad ora (circa 60 diverse mutazioni) in soggetti con FHBL determinano la sintesi di forme troncate di apoB (Linton M.F. et al., 1993; Schonfeld G., 2003). In particolare secondo studi condotti da Fouchier et al (Fouchier S.W. et al., 2005) su famiglie olandesi e spagnole, la prevalenza di mutazioni del gene dell'apo B responsabili del fenotipo FHBL dovute a forme troncate, è di circa il 52%. Questi risultati, si pongono in netto contrasto con studi precedenti secondo i quali, la frequenza di mutazioni nel gene dell'apo B responsabili di forme tronche, è compresa tra l' 1.4% e il 2.7% (Welty F.K. et al., 1998; Wu J. et al., 1999). Questa discrepanza è data secondo Fouchier, dai criteri di inclusione molto stretti e dal diverso approccio usato.

Da tutti gli studi condotti è emerso che il gene dell' apoB è responsabile solo in parte del fenotipo FHBL, altre cause sono da attribuire a mutazioni localizzate su altri geni.

La possibilità di forme di FHBL non legate al gene apoB trova inoltre riscontro, nell' osservazione che in alcune grandi famiglie l'analisi dell'aplotipo ha dimostrato una assenza di co-segregazione del fenotipo FHBL con il gene apoB. Queste forme di FHBL possono essere dovute a difetti di altri geni che controllano l'assemblaggio, la secrezione o il catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB.

Un “*wide genome scan*” per la ricerca di nuovi loci di suscettibilità per FHBL è stato condotto da Pulai et al. su una famiglia di 38 individui (Pulai J.I. et al., 1998). La prima fase di genotipizzazione, utilizzando un set di 387 marcatori cromosomici tetra, tri e dinucleotidici con un potere di risoluzione di 10 CM, è stata condotta presso il Marshfield Medical Research Foundation, Marshfield, WI. È stato descritto un aplotipo comune composto tra i marcatori D3S3521 e D3S1578 in tutti i soggetti affetti (Yuan B. et al., 2000); successive analisi di linkage hanno mostrato l'esistenza di questa associazione in altre sei famiglie con

FHBL. Per circoscrivere il locus di suscettibilità, è stata condotta un'analisi dell'aplotipo in una delle famiglie dove era presente un fenomeno di *cross over* nella regione critica. Questa analisi è riuscita a circoscrivere la regione di suscettibilità da 10 CM a 2CM (Neuman R.J. et al., 2002). Un recente lavoro di Ko et al. sostiene la possibilità che esista un locus di suscettibilità per FHBL nel cromosoma 3 umano. Usando una progenie di N2 e di F2 (backcrossed) di topi, che sono "elevati" e "bassi" produttori di apoB umana, sono stati in grado di identificare due loci considerati come i regolatori principali dei livelli della apoproteina B. I loci sono stati identificati sui cromosomi 6 e 4 murini. La regione del cromosoma 6 murino è corrispondente al cromosoma umano 3p (Ko C. et al., 2001). La regione critica è compresa fra D3S2407 e D3S1767.

Un altro studio (Sherva et al., 2007) è stato effettuato su famiglie caucasiche attraverso un "whole genome scan" utilizzando 443 marker microsatelliti. Nello studio sono state tipizzate 9 famiglie multi generazionali con almeno due membri affetti da FHBL. Sono stati valutati gli SNPs all'interno della regione di linkage considerata sul cromosoma 10, per valutare la presenza di varianti associate a bassi livelli di apoB e di LDL. Il risultato più rilevante è da riferire per il polimorfismo identificato in banca dati con rs2277205 nella regione 5' non tradotta del gene che codifica per un'acyl-coA deidrogenasi. Sebbene siano stati identificati diversi segnali di linkage con il cromosoma 10, esistono molte altre regioni cromosomiche che potrebbero contribuire ad abbassare i livelli di apoB e di LDL colesterolo.

Dai dati finora disponibili è possibile speculare sul meccanismo cellulare responsabile dell'accumulo intraepatico di trigliceridi, estrapolando i dati dell'unico modello in vitro, ex-vivo. Infatti in colture primarie di epatociti di topo geneticamente modificato per ricombinazione omologa, esprime un fenotipo FHBL eterozigote con produzione di apoB troncata, è stato dimostrato che l'accumulo di trigliceridi e la formazione quindi di "fatty liver" è dovuta ad una diminuita capacità di "export" di apo B troncata e trigliceridi.

La diagnosi molecolare di FHBL è relativamente semplice quando forme troncate di apo B sono evidenziabili nel plasma. In questo caso la dimensione dell'apo B troncata, valutata mediante elettroforesi ed immunoblot, suggerisce la localizzazione della mutazione nel gene apo B (in genere queste mutazioni si trovano in una regione che comprende gli esoni 26-29), limitando a questi esoni l'analisi di sequenza. In assenza di forme troncate visibili la strategia è più complessa e richiede l'analisi della sequenza completa del gene apo B (almeno i primi 23 esoni e le giunzioni introne-esone), del promotore prossimale e delle sequenze regolatrici negli introni 2 e 3.

Mutazioni del gene dell'apoproteina B responsabili di FHBL

Come detto precedentemente le mutazioni del gene dell'apoB responsabili di FHBL (Linton M.F. et al., 1993; Schonfeld, 2003) sono generalmente responsabili della sintesi di forme tronche di apoB. Sono state individuate più di 60 mutazioni del gene apo B associate a ipocolesterolemia. Si distinguono mutazioni missenso, nonsense, mutazioni dei siti di splicing e inserzioni o delezioni. (tabella 1).

Sono note solo due mutazioni missenso del gene dell'apoB non associate a forme tronche della proteina: la variante R463W e la L343V. La prima è stata identificata dal gruppo di Burnett (Burnett J.R. et al., 2003) dimostrando che la mutazione cade in una regione che è fondamentale per il corretto folding della proteina e per il legame a MTP ed è responsabile di Ipobetalipoproteinemia Familiare. La seconda risulta essere responsabile anch'essa dell'alterato folding della proteina alterandone la secrezione. (Burnett J.R. et al., 2007).

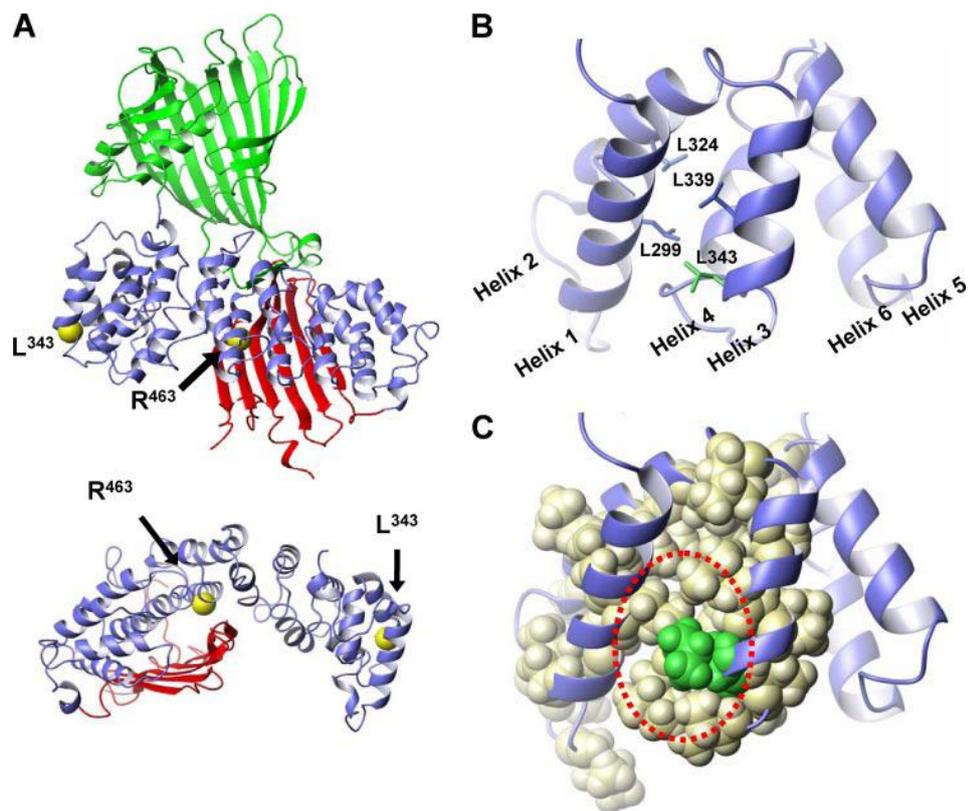


Fig. 10. Modello molecolare di apo B 17. (Burnett J.R. et al., 2007). A) visione superiore delle α -eliche, Leu³⁴³ Arg⁴⁶³ sono mostrate come sfere gialle. B) rappresentazione delle eliche 1-6 del dominio α -elica. Quattro residui di leucina sono localizzati nell'interfaccia tra la prima e la seconda coppia di α -eliche, la leucina è evidenziata in verde. C) distribuzione dei residui idrofobici nelle prime due coppie di di α -eliche.

Mutazioni missenso/nonsense

Numero di accesso	Cambio codone	Cambio aa	Posizione aa	Fenotipo	Bibliografia
CM040370	gCAG-TAG	Gln-Term	294	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Lancellotti (2004) Biochim Biophys Acta 1688, 61</u>
CM045275	gCTG-GTG	Leu-Val	343	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Whitfield (2004) Clin Chem 50, 1725</u>
CM021487	cCGA-TGA	Arg-Term	412	Apolipoprotein B deficiency	<u>Yue (2002) Hum Mutat 20, 110</u>
CM031933	gCGG-TGG	Arg-Trp	463	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Burnett (2003) J Biol Chem 278, 13442</u>
CM040371	CGT-CAT	Arg-His	1101	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Lancellotti (2004) Biochim Biophys Acta 1688, 61</u>
CM031934	TATc-TAA	Tyr-Term	1173	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Whitfield (2003) Hum Mutat 22, 178</u>
CM056935	TATa-TAA	Tyr-Term	1220	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Lancellotti (2005) J Hepatol 43, 188</u>
CM880006	tCGA-TGA	Arg-Term	1306	Apolipoprotein B deficiency	<u>Collins (1988) Nucleic Acids Res 16, 8361</u>
CM051004	cCAA-TAA	Gln-Term	1309	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Fouchier (2005) J Med Genet 42, e23</u>

CM072861	TACa-TAA	Tyr-Term	1336	Hypocholesterolaemia	<u>Edgar (2007)</u> <u>Mol Psychiatry</u> <u>12, 258</u>
CM900018	GGT-GTT	Gly-Val	1424	Apolipoprotein B deficiency	<u>Young (1990) J</u> <u>Clin Invest 85,</u> <u>933</u>
CM920058	aCAG-TAG	Gln-Term	1450	Apolipoprotein B deficiency	<u>McCormick</u> <u>(1992) Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> <u>1138, 290</u>
CM014503	TATg-TAA	Tyr-Term	1510	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Tarugi (2001) J</u> <u>Lipid Res 42,</u> <u>1552</u>
CM984232	gCAA-TAA	Gln-Term	1755	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Ohashi (1998)</u> <u>Arterioscler</u> <u>Thromb Vasc</u> <u>Biol 18, 1330</u>
CM980091	AAT-AGT	Asn-Ser	1887	Hypocholesterolaemia ?	<u>Leren (1998)</u> <u>Hum Genet</u> <u>102, 44</u>
CM980092	CAT-CGT	His-Arg	1896	Hypocholesterolaemia ?	<u>Leren (1998)</u> <u>Hum Genet</u> <u>102, 44</u>
CM962634	aCGA-TGA	Arg-Term	1985	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Srivastava</u> <u>(1996)</u> <u>Metabolism 45,</u> <u>1296</u>
CM890005	tCGA-TGA	Arg-Term	2058	Apolipoprotein B deficiency	<u>Young (1989) N</u> <u>Engl J Med 320,</u> <u>1604</u>
CM870004	aCAA-TAA	Gln-Term	2153	Apolipoprotein B deficiency	<u>Hospattankar</u> <u>(1987)</u> <u>Biochem</u> <u>Biophys Res</u> <u>Commun 148,</u> <u>279</u>

CM910034	cCAG-TAG	Gln-Term	2252	Apolipoprotein B deficiency	<u>Hardman (1991) J Clin Invest 88, 1722</u>
CM910035	cCGA-TGA	Arg-Term	2486	Apolipoprotein B deficiency	<u>Wagner (1991) J Lipid Res 32, 1001</u>
CM920059	cCGA-TGA	Arg-Term	2495	Apolipoprotein B deficiency	<u>Talmud (1992) Clin Genet 42, 62</u>
CM051005	aCGA-TGA	Arg-Term	2507	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Fouchier (2005) J Med Genet 42, e23</u>
CM980093	CCA-CTA	Pro-Leu	2712	Hypocholesterolaemia	<u>Leren (1998) Hum Genet 102, 44</u>
CM980094	GCT-GTT	Ala-Val	3371	Apolipoprotein B deficiency	<u>Gaffney (1998) Atherosclerosis 137, 167</u>
CM980095	cGAA-CAA	Glu-Gln	3405	Hypocholesterolaemia	<u>Leren (1998) Hum Genet 102, 44</u>
CM952192	CGG-CCG	Arg-Pro	3480	Apolipoprotein B deficiency	<u>Nissen (1995) Clin Chem 41, 419</u>
CM015396	tCGG-TGG	Arg-Trp	3480	Apolipoprotein B deficiency	<u>Boren (2001) J Biol Chem 276, 9214</u>
CM950075	aCGG-TGG	Arg-Trp	3500	Apolipoprotein B deficiency	<u>Gaffney (1995) Arterioscler Thromb Vasc Biol 15, 1025</u>
CM890006	CGG-CAG	Arg-Gln	3500	Apolipoprotein B deficiency	<u>Soria (1989) Proc Natl Acad Sci U S A 86, 587</u>

CM950076	aCGC-TGC	Arg-Cys	3531	Apolipoprotein B deficiency	<u>Pullinger (1995) J Clin Invest 95, 1225</u>
CM043965	cCAC-TAC	His-Tyr	3543	Apolipoprotein B deficiency	<u>Soufi (2004) Atherosclerosis 174, 11</u>
CM021488	TATg-TAG	Tyr-Term	3653	Apolipoprotein B deficiency	<u>Yue (2002) Hum Mutat 20, 110</u>
CM920060	TCA-TAA	Ser-Term	3750	Apolipoprotein B deficiency	<u>Farese (1992) J Lipid Res 33, 569</u>
CM980096	cGTA-ATA	Val-Ile	3894	Hypocholesterolaemia	<u>Leren (1998) Hum Genet 102, 44</u>

Mutazioni di splicing

Numero di accesso	Posizione	donatore accettore	Sostituzione	Fenotipo	Bibliografia
CS032058	IVS 1 -1	Ds	G-A	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Whitfield (2003) Hum Mutat 22, 178</u>
CS910414	IVS 5 +1	Ds	G-T	Apolipoprotein B deficiency	<u>Huang (1991) J Lipid Res 32, 1341</u>
CS020800	IVS 7 -2	As	A-G	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Hegele (2002) Clin Genet 61, 101</u>
CS072141	IVS 8 + 4	Ds	A-G	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Di Leo (2007) J Med Genet 44, 219</u>
CS072142	IVS 9 -1	Ds	G-A	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Homer (2007) Clin Chem 53, 1165</u>

CS021720	IVS 13 -1	As	G-A	Apolipoprotein B deficiency	<u>Yue (2002) Hum Mutat 20, 110</u>
CS941419	IVS 24 + 2	Ds	T-C	Apolipoprotein B deficiency	<u>Talmud (1994) J Lipid Res 35, 468</u>
CS072139	IVS 24 -2	As	A-G	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Di Leo (2007) J Med Genet 44, 219</u>
CS072140	IVS 25 -1	As	G-T	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Di Leo (2007) J Med Genet 44, 219</u>

Delezioni

Numero di accesso	Delezione	Codone	Fenotipo	Bibliografia
CD032100	CATCTCT ^GAGcaaaa tatCCAGA GAGCT	312	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Whitfield (2003) Hum Mutat 22, 178</u>
CD014625	CACTCAC ^ATCcTCC AGTGGCT	367	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Tarugi (2001) J Lipid Res 42, 1552</u>
CD051292	ACAGGCA ^GATatTA ACAAAAT T	546	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Fouchier (2005) J Med Genet 42, e23</u>
CD051293	GCTGGA^ TTACaGT TGCAAAT A	817	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Fouchier (2005) J Med Genet 42, e23</u>
CD051294	CATTCCT ^TCCcCAA AGAGACC	901	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Fouchier (2005) J Med Genet 42, e23</u>
CD021775	GATTCG^ AATAtCA AATTCAG T	1407	Apolipoprotein B deficiency	<u>Yue (2002) Hum Mutat 20, 110</u>

CD900272	AGTCTCA ^AAAgGT TACTAA T	1423	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Young (1990) J Clin Invest 85, 933</u>
CD880081	TGACCAC ^ACAaaca GTCTGAA CAT	1727	Hypobetalipoproteinaemia		<u>Young (1988) Science 241, 591</u>
CD880082	CCCTG^A AGCTgCA TGTGGCT G	1793	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Collins (1988) Nucleic Acids Res 16, 8361</u>
CD920825	AGCAGAC ^ACTgtTG CTAAGGT T	1828	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Talmud (1989) J Lipid Res 30, 1773</u>
CD982442	GAAAAA^ TTAAaAA GTCTTGA T	2182	Hypobetalipoproteinaemia		<u>Ruotolo (1998) Atherosclerosis 137, 125</u>
CD930898	CTACAA^ CAAGttaag ATAAAAG ATT	2356	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Groenewegen (1993) J Lipid Res 34, 971</u>
CD910477	GTTAACA ^GGGaAG ATAGACT T	3039	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Welty (1991) J Clin Invest 87, 1748</u>
CD920826	CATAAC^ AGTAcTG TGAGCTT A	3385	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Krul (1992) J Lipid Res 33, 1037</u>
CD014626	AATTT^A AGTAAtGA TTTCAAT T	3434	Hypobetalipoproteinaemia		<u>Tarugi (2001) J Lipid Res 42, 1552</u>
CD051295	ATCGCA^ GACTttGA GTTGCC A	3822	Hypobetalipoproteinaemia		<u>Fouchier (2005) J Med Genet 42, e23</u>

CD920827	GTTTG^A AAAACAA AGCAGAT T	3876	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Linton (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89, 11431</u>
CD961784	CTGCTTT CAG_I27E 28_g^GAA TGGGAAG	3942	Apolipoprotein deficiency	B	<u>Gabelli (1996) Arterioscler Thromb Vasc Biol 16, 1189</u>

Grosse delezioni

Numero di accesso	Descrizione	Fenotipo	Bibliografia
CG921050	37 bp nt 8525-8561 (described at genomic DNA level)	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Pullinger (1992) J Lipid Res 33, 699</u>
CG890194	694 bp incl. ex. 21 (described at genomic DNA level)	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Huang (1989) J Biol Chem 264, 11394</u>

Inserzioni

Numero di accesso	Inserzione	Codone	Fenotipo	Bibliografia
CI032141	AAGCA^GACA CcTGTTGCTA AG	1827	Hypobetalipoproteinae mia	<u>Whitfield (2003) Hum Mutat 22, 178</u>
CI952256	ATCATT^GAT GaatatcattgaCTT TAGAGAT	2011	Hypobetalipoproteinae mia	<u>Welty (1995) Circulation 92, 2036</u>
CI043909	ATCATC^AAT TaGGTTACAG GA	2467	Hypobetalipoproteinae mia	<u>Maruyama (2004) J Atheroscler Thromb 11, 131</u>

CI942146	ATTTT^GAAA AaAAACAGAA AC	3182	Hypobetalipoproteinaemia	<u>Groenewegen</u> (1994) <u>Arterioscler</u> <u>Thromb 14, 1695</u>
----------	--------------------------------	------	--------------------------	---

Tabella 1: mutazioni del gene dell' apoB associate a FHBL e a forme tronche di apoB

Scopo del lavoro

Nel corso degli anni è stato selezionato presso il laboratorio di biologia molecolare del Centro di Riferimento Regionale per le Dislipidemie Genetiche, un gruppo di soggetti ipocolesterolemici con livelli plasmatici di colesterolo totale, LDL colesterolo e apolipoproteina B < 5° percentile. Tali soggetti sono stati sottoposti ad uno screening genetico per individuare l'eventuale presenza di mutazioni responsabili di forme primitive di ipocolesterolemia.

Recentemente è stata posta all'attenzione del nostro centro il caso clinico di una donna di 19 anni caucasica che presentava all'anamnesi epatomegalia ed elevati livelli di transaminasi. Il profilo lipidico mostrava bassi livelli di colesterolo LDL (45 mg/dL, < 5° percentile) con livelli di colesterolo totale < 5° percentile (93 mg/dL), trigliceridi (93 mg/dL), colesterolo HDL (34 mg/dL).

L'analisi di Western blot sul siero del probando non ha evidenziato la presenza di forme troncate secrete di apoB; si è proceduto quindi al sequenziamento diretto dei primi 25 esoni del gene dell'apoB che ha permesso di individuare una variante nel sito donatore di splicing dell'introne 14 (c. 2195 bp+1G>T). L'analisi bioinformatica effettuata attraverso [splice site analysis](https://splice.uwo.ca/cgibin/protected/display.cgi?forweb_sis/folder67/donor/gene.html) (https://splice.uwo.ca/cgibin/protected/display.cgi?forweb_sis/folder67/donor/gene.html) prevede che la suddetta mutazione determina un'alterazione del corretto sito di splicing con conseguente sintesi di una proteina apoB difettiva. Da queste evidenze, scopo dello studio è quello di descrivere l'effetto funzionale in vitro di questa nuova mutazione del gene dell'Apo B c. 2195 bp+1G>T, utilizzando la strategia del minigene su cellule di CHO K1H8 (Chinese Hamster Ovary).

Materiali e metodi

Estrazione di DNA genomico da sangue intero

Il DNA genomico è stato isolato da sangue intero al quale è stato aggiunto EDTA per evitarne la coagulazione, utilizzando un kit commerciale di estrazione (Puregene, Gentra Systems, Inc., Minneapolis, USA), e quantificato mediante la lettura spettrofotometrica a 260 nm.

Amplificazione dell'inserto

E' stata amplificata una porzione del gene dell'apoB comprendente la mutazione identificata (parte dell'esone 14- introne 14- parte dell'esone 15), utilizzando come stampo il DNA del probando. Per la reazione di amplificazione sono stati utilizzati i seguenti

primer:

Ex14F GCTCTGAAAGAATCTCAACTTCC

Ex15R AGACACCATCAGGAACTTGACC.

L'amplificazione è stata effettuata seguendo il seguente profilo

termico: 95 °C per 1min (1 ciclo); 95 °C per 1min, 62 °C per 1min, 72 °C per 1 min (35 cicli), 72 °C per 10 min (1 ciclo).

La lunghezza attesa dell'amplicone (1203 bp) è stata confermata su gel d'agarosio all'1% (Fig 11)

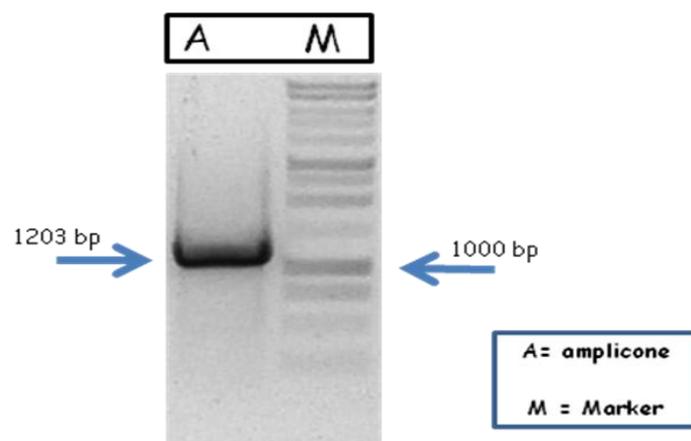


Fig. 11. Elettroforesi dell'amplicone ottenuto su gel d'agarosio al 1%

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.

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 quindi 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 sec 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. In seguito la sospensione è stata piastrata su LB-agar condito con ampicillina all'1%, X-GAL e IPTG. Le piastre sono state incubate a 37°C O.N.

Analisi dei ricombinanti : minipreparazione di 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 alla velocità di 250 rpm.

Da ogni coltura batterica è stata eseguita una minipreparazione del DNA plasmidico utilizzando un kit commerciale (Minipreps DNA purification kit – Promega).

300 ng di DNA plasmidico sono stati digeriti con 5 U dell'enzima di restrizione EcoRI (Fermentas), 1X buffer, in un volume totale di 20 μ l ed incubati per 2 h a 37°; il prodotto della digestione è stato analizzato su gel di agarosio all'1%.

Preparazione di DNA plasmidico (Maxi Prep)

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

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 che 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.)

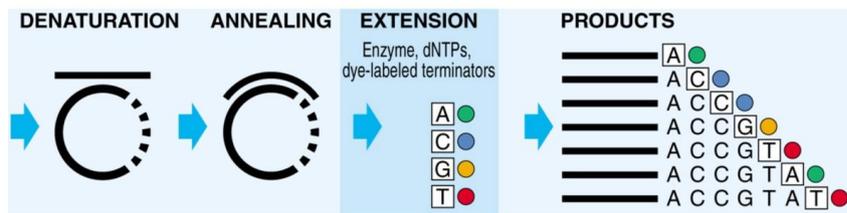


Fig. 12. Meccanismo molecolare che illustra le fasi del sequenziamento ciclico diretto

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.

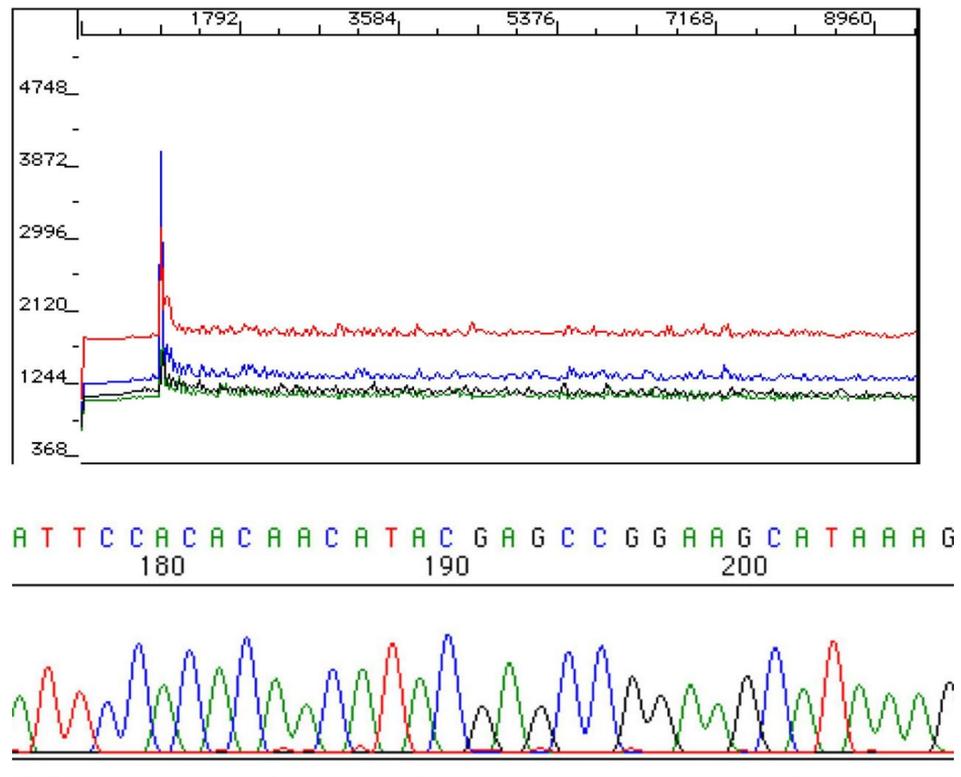


Fig.13 Esempio dello spettro dato dai dati grezzi della reazione di sequenza e elaborazione dei dati mediante l'utilizzo del programma Sequencing Analysis 3.4.1.

Per analizzare i dati grezzi (Fig. 13) 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 .

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 µl 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 µl. 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 µl della reazione purificata diluita in 20 µl 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.

Colture cellulari

Le cellule CHO K1H8 (Chinese Hamster Ovary) che non sintetizzano apoB sono state mantenute in mezzo di coltura F12 (Hem, Gibco) con siero bovino fetale (FCS) al 10%, L-Glutamina 2mM, penicillina e streptomina alla concentrazione di 100 U.I/ml, amminoacidi non essenziali all'1%, a 37°C in ambiente saturo al 5% di CO₂.

Trasfezione

Le cellule CHO sono state piastrate 2×10^5 cells/well in piastre da 24 pozzi in un volume di 1 ml di terreno F12- FCS 10%. Dopo 24 h, raggiunta la confluenza dell'80%, le cellule sono state trasfettate con 0.8 µg di vettore pTarget vuoto, pTarget/ apoBWT o MUT e 2 µl lipofectamine 2000 (invitrogen) per pozzo. Dopo incubazione a 37° al 5% CO₂ per 48 h è stato estratto l'RNA totale mediante l'impiego del TRI Reagent (Ambion). L'integrità e la purezza dell'RNA è stata valutata su gel d'agarosio all'1% e mediante lettura spettrofotometrica espresso come rapporto 260/280 nm.

RT-PCR

500 ng dell'RNA totale estratto sono stati utilizzati per la reazione di retrotrascrizione in presenza del primer 15 R (2pmoli), DNTPs (10 mM),

H₂O fino a un volume di 12 µl ed incubati a 65°C per 5'. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti Buffer 1X, DTT 0.01M, ribonuclease inhibitor (40 unità) e incubati a 37°C per 2'.

E' stata aggiunta M-MLV RT invitrogen (200 U) e incubata a 25°C per 10', 37°C per 50' e a 70°C per 15'; 2 µl del cDNA così ottenuto vengono utilizzati per la reazione di PCR insieme a Buffer 1X, MgCl₂ (1.5mM), DNTPS (10mM), Primer 14F (10 pmoli), Primer 15R (10 pmoli), 2 unità Taq polimerase (fermentas) e H₂O fino a volume di 50 µl secondo il seguente profilo termico: 95 °C per 1min (1 ciclo); 95 °C per 1min, 62 °C per 1min, 72 °C per 1 min (35 cicli), 72 °C per 10 min (1 ciclo)

Risultati e discussioni

L'Ipobetalipoproteinemia è una patologia caratterizzata da bassi livelli di colesterolo e/o apolipoproteina B. Possono essere distinte forme primitive e forme secondarie. Le cause primitive sono di natura genetica e quindi ereditarie e includono ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL), abetalipoproteina e sindrome di Anderson. L'FHBL è trasmessa con modalità autosomica dominante e la maggior parte dei pazienti eterozigoti sono asintomatici. La prevalenza degli eterozigoti FHBL è stata stimata in un range di 1:1000 a 1:3000. I soggetti omozigoti e doppi eterozigoti presentano condizioni cliniche più severe con livelli molto bassi di apoB-100. Solo una parte di FHBL è causata da mutazioni nel gene che codifica per l'apolipoproteina B-100. In letteratura sono state descritte più di 60 mutazioni del gene dell'apoB; queste includono mutazioni nonsense, missenso, inserzioni e delezioni e mutazioni dei siti di splicing.

L'associazione tra FHBL e steatosi è ancora sconosciuta anche se in letteratura sono stati riportati dei casi in cui FHBL potrebbe essere causa di steatosi. In colture primarie di epatociti di topo geneticamente modificato per ricombinazione omologa, esprime un fenotipo FHBL eterozigote con produzione di apoB troncata 38,9, è stato dimostrato che l'accumulo dei trigliceridi e la formazione di acidi grassi, è dovuta a una diminuita capacità di esportare i trigliceridi dal fegato da parte delle particelle VLDL che contengono forme troncate di apoB. Lo studio dimostra quindi che nel caso del modello murino non è la diminuita secrezione di apoB 38,9 la causa del determinarsi della steatosi ma la diminuita capacità di trasportare trigliceridi da parte delle VLDL che trasportano forme troncate di apoB.

Nei pazienti con FHBL i fattori determinanti per lo sviluppo della steatosi sono il grasso intraperitoneale, che contribuisce per il 55%, e la presenza di mutazioni del gene dell'apoB che contribuisce per il 19%.

In questo studio presento i dati relativi alla valutazione funzionale in vitro degli effetti di una nuova mutazione di splicing del gene dell'apoB (c. 2195 bp+1G>T) identificata in una donna di 19 anni caucasica che

presentava all'anamnesi epatomegalia ed elevati livelli di transaminasi e bassi livelli di colesterolo. La paziente era asintomatica ad eccezione di sporadici episodi di dolori al quadrante superiore destro dell'addome e mostrava una normale crescita e sviluppo sessuale. La biopsia epatica ha evidenziato la presenza di steatosi severa in assenza di fibrosi. L'analisi di Western blot non ha permesso di identificare forme tronche di apoB secrete nel plasma. L'analisi genetica dei primi 25 esoni del gene dell'apoB ha permesso di identificare nel nostro probando una nuova mutazione in eterozigosi (c. 2195 +1 G>T) nel sito di splicing donatore dell'introne 14 (fig 14). L'analisi genetica effettuata sui genitori della paziente evidenzia la presenza della stessa mutazione in eterozigosi nella madre che presenta bassi livelli di colesterolo LDL (46 mg/dL) e bassi livelli di colesterolo totale (122 mg/dL), trigliceridi (82 mg/dL) colesterolo HDL (60 mg/dL); il padre non è portatore di nessuna mutazione del gene dell'apoB e il suo profilo lipidico mostra livelli normali di colesterolo LDL (93 mg/dL), colesterolo totale (143 mg/dL) e colesterolo HDL (47 mg/dL).

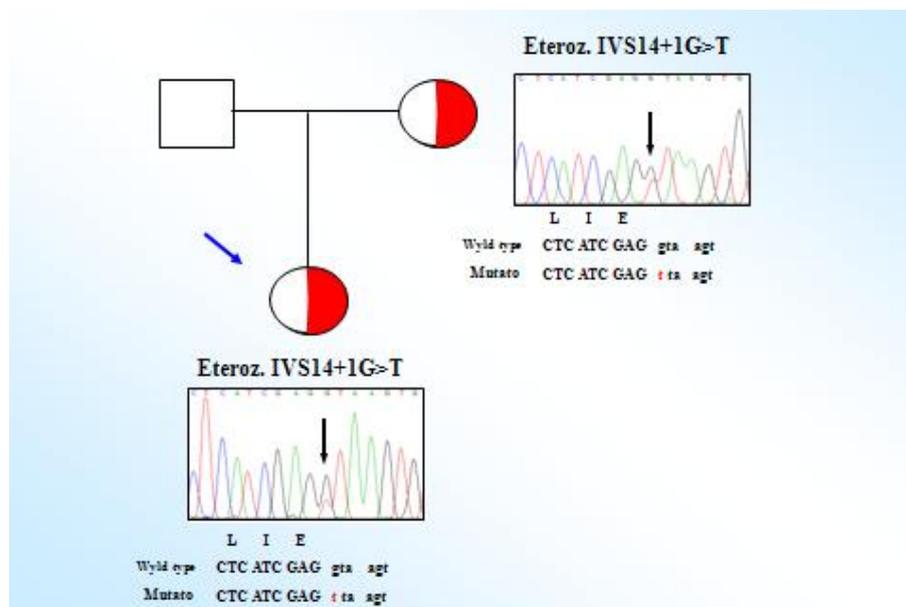


Fig. 14. Albero genealogico della famiglia del probando

Considerato che si tratta di una mutazione mai descritta in precedenza, abbiamo effettuato degli studi in vitro per valutare l'effetto della variante

sulla trascrizione dell'mRNA utilizzando la strategia del minigene. A tale scopo abbiamo disegnato una coppia di primer complementari ad una porzione dell'esone 14 (primer forward) e a un porzione dell'esone 15 (primer reverse) con lo scopo di amplificare, su stampo di DNA genomico, la regione comprendente l'esone 14-introne 14- esone 15 del gene dell'apoB contenente la mutazione IVS14+1 G/C. E' stato utilizzato il DNA del probando per ottenere un regione di DNA pari a 1203 bp_ che è stata successivamente clonata nel vettore d'espressione pTarget™ vector (Promega) per ottenere cloni mutati (minigene apoB mut) e cloni wt (minigene apoB wt).

Il vettore utilizzato è un pTarget™ ,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 15)

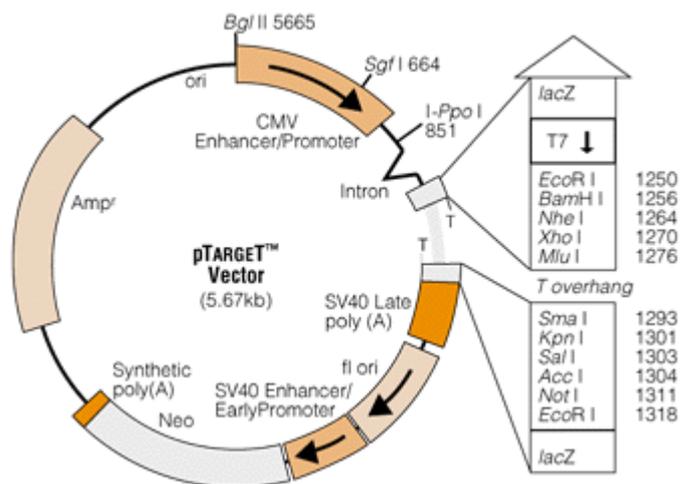
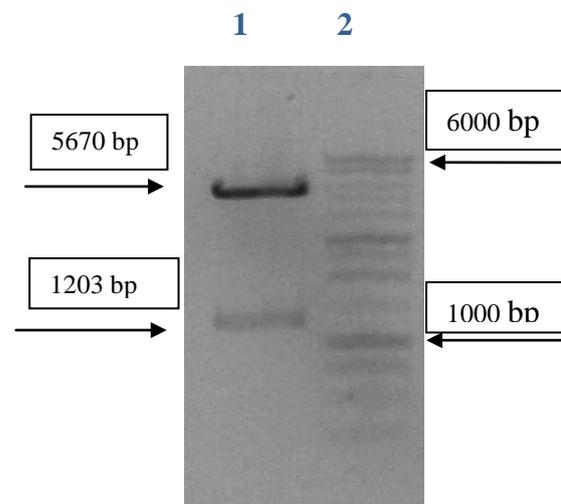


Fig. 15. Immagine del vettore d'espressione pTarget™ (Promega)

L'espressione dell'inserto 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. pTargetTM 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 pTargetTM 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 EcoRI. I prodotti della digestione, valutati su gel d'agarosio all'1% evidenziano la presenza di due bande; la banda più in alto di 5670 bp che corrisponde alla lunghezza del vettore e un banda di 1203 bp corrispondente all'inserto.



Linea 1 vettore (5,6 KB) + inserto (1,2 Kb)
Linea 2 Marker

Fig 16. Immagine dei campioni di DNA plasmidico digeriti con enzima di restrizione EcoRI su gel d'agarosio all'1%

La sequenza diretta della preparazione plasmidica (maxi prep) dei cloni apoB wt e mut ha confermato la corretta sequenza nucleotidica degli inserti clonati (Fig 17)

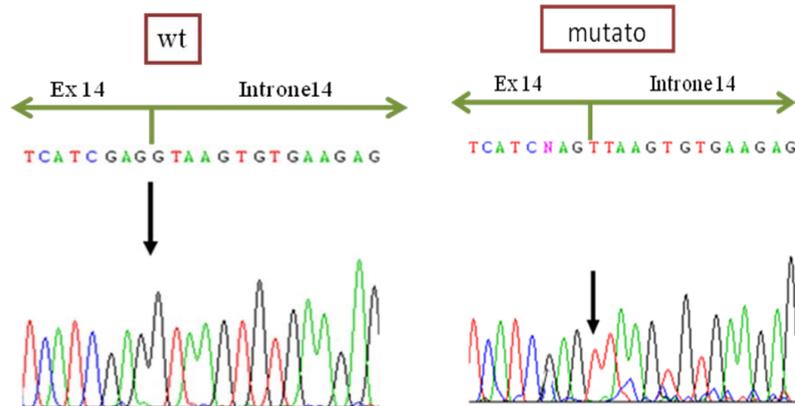


Fig. 17. Sequenziamento automatico delle maxi-prep ApoB wt/apoB mut

Una volta ottenuti i due cloni ricombinanti, il passo successivo è stato quello di effettuare la trasfezione in cellule CHO K1H8. Questa linea cellulare costituisce un ottimo modello per il nostro studio in quanto, non esprimendo il gene dell'apoB, 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 CHO K1H8 sono state piastrate in piastre da 24 well e, raggiunta la confluenza dell'80% , sono state trasfettate con il vettore pTarget vuoto, pTarget/ apobWT 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 apoB clonate nel vettore di espressione (wt e mut) è stata effettuata una reazione di retrotrascrizione e successiva PCR (Fig. 18)

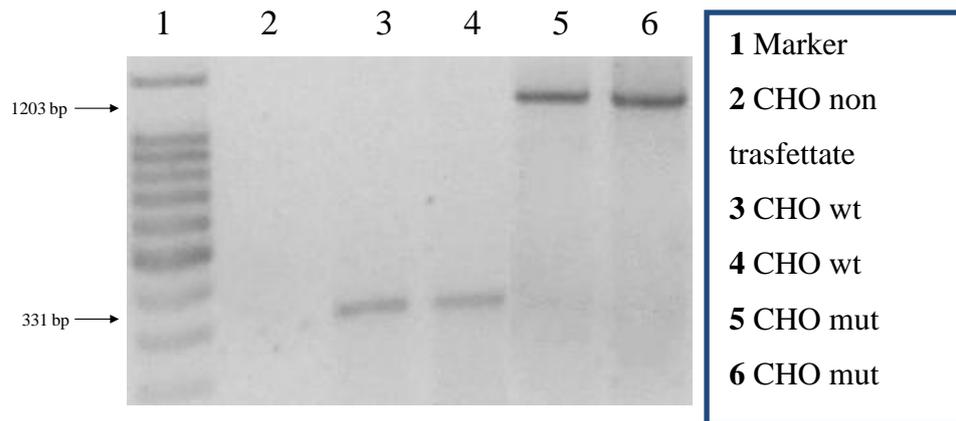
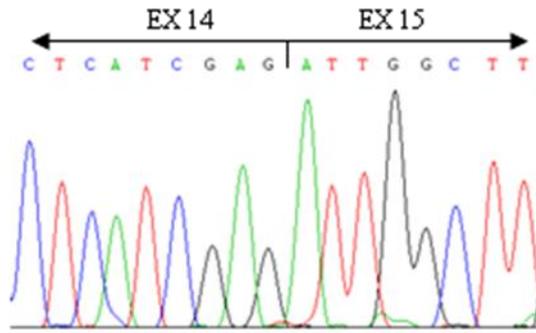


Fig. 18. Immagine dell'RT PCR apoB wt/mut su gel d'agarosio all'1%

Il diverso pattern di amplificazione ottenuto a partire dall'RNA di cellule CHO K1H8 trasfettate con pTarget apobWT rispetto alle cellule trasfettate con pTarget apob mut dimostra che la mutazione c.2195 bp+1G>T ha un effetto sulla trascrizione dell'mRNA. L'RT PCR ottenuta dall'RNA WT infatti, ha una lunghezza attesa di 331 bp, mentre l'RT PCR ottenuta dall'RNA mutato è pari a 1203 bp. L'analisi di sequenza spiega la differenza tra le due RT PCR mostrando che, mentre la sequenza nucleotidica dell'RT PCR WT (Fig A) corrisponde all'esone 14 immediatamente seguito dalla sequenza nucleotidica dell'esone 15, l'RT PCR mutato (Fig B) consta dell'esone 14, tutto l'introne 14 e l'esone 15, corrispondente all'intero inserto clonato.

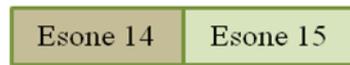


A

CTC ATC GAG ATT GGC TTG
 L I E I G L



Splicing



apoB-100

In conclusione abbiamo identificato una nuova variante in eterozigosi del gene dell'apoB che determina l'alterazione del sito di splicing con conseguente formazione di una proteina apoB tronca. La mutazione cosegrega con il fenotipo della madre del probando e non è presente nel padre normolipidemico. Gli esperimenti di espressione effettuati su cellule CHO K1H8 ci hanno permesso di dimostrare il ruolo funzionale della mutazione identificata (c.2195 bp+1G>T) che è associata al fenotipo FHBL.

L'FHBL è un raro disordine del metabolismo lipidico ed è geneticamente eterogenea. I difetti molecolari associati alla patologia possono essere determinati sia da mutazione del gene che codifica per apoB sia da mutazioni a carico di altri geni. La maggior parte dei soggetti eterozigoti per il gene dell'apoB sono asintomatici, circa il 40% dei pazienti presenta steatosi epatica e un leggero aumento delle transaminasi come nel caso del nostro probando.

Bibliografia

Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. & Schekman, R. *Nat. Cell Biol.* 3,531-537; 2001
Swift LL. Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 1996;271:31491-31495.

Avramoglu R.K., Adeli K. Hepatic Regulation of Apolipoprotein B. *Kluwer Academic Publishers* 2004;5:293-301

Biophysical Research Communications. 189(2):1069-76, 1992

Blackhart BD, Ludwig EM, Pierotti VR, Caiati L, Onasch MA, Wallis SC, Powell L, Pease R, Knott TJ, Chu M-L, Mahley RW, Scott J, McCarthy BJ, Levy-Wilson B. Structure of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem.* 1986;261:15364-15367

Chang BH-J, Liao W, et al. Liver specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 6051-6055.

Chauhan V, Wang X, Ramsamy T, Milne RW, Sparks DL. Evidence for lipid-dependent structural changes in specific domains of apolipoprotein B100. *Biochemistry.* 1998;37:3735-3742

Chen Z, Fitzgerald RL, Averna MR, Schonfeld G. A targeted Apo B-38.9-Producing mutation causes fatty livers in mice due to the reduced ability of apo B-38.9 to transport triglycerides. *J Biol Chem.* 2000; 275(42): 32807-32815.

Chen S-H, Yang C-Y, Chen P-F, Setzer D, Tanimura M, Li W-H, Gotto AM Jr, Chan L. The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem.* 1986;261:12918-12921.

Chen S-H, Habib G, Yang C-Y, Gu Z-W, Lee BR, Weng S-A, Silberman SR, Cai S-J, Deslypere JP, Rosseneu M, Gotto AM Jr, Li W-H, Chan L. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science.* 1987;238:363-366.

Chuang SS, Das HK. Identification of trans-acting factors that interact with cis-acting elements present in the first nontranslated exon of the human apolipoprotein B gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220:553-562.

Chuang SS, Zhuan H, Reisher SR, Feinstein SI, Das HK. Transcriptional regulation of the apolipoprotein B-100 gene: identification of cis-acting elements in the first nontranslated exon of the human apolipoprotein B-100 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215:394-404

Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J.* 1986;5:3495-3507.

Dashti N., Williams D.L., Alaupovic P. Effects of oleate and insulin on the production rates and cellular mRNA concentrations of apolipoproteins in HepG2 cells. *J Lipid Res* 1989;30:1365-1373

Di Leo, Magnolo, Pinotti, Martini, Cortella, Vitturi, Rabacchi, Wunsch, Pucci, Bertolini, Calandra, Tarugi. Functional analysis of two model splice site mutation of APOB gene in familial

hypobetalipoproteinemia. *Molecular Genetics and Metabolism* 96 (2009) 66-72

Dixon JL, Ginsberg HN. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res.* 1993;34:167-179.

Fouchier S.W., Sankatsing R.R., Peter J., Castillo S., Pocovi M., Alonso R., Kastelein J.J.P., Defesche J.C. High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinaemia in patients of Dutch and Spanish descent. *J Med Genet* 2005;42

Gabelli C, Bilato C, Martini S, Tennyson GE, Zech LA, Corsini A, Albanese M, Brewer HB Jr, Crepaldi G, Baggio G. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia. Increased LDL catabolism in hypobetalipoproteinemia due to a truncated apolipoprotein B species, apo B-87Padova. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1189-1196.

Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrin Metab Clin North Amer.* 1998;27:503-519.

Ginsberg HN. Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6:275-280.

Hamilton R.L., Erickson S.K., Havel R.J. Nascent VLDL assembly occurs in two steps in the endoplasmic reticulum (ER) of hepatocytes. In *Atherosclerosis*. Woodford X.F.P., Davignon J., Sniderman A., editors. Elsevier Science, Amsterdam 1995;414-418

Huang L-S, Kayden H, Sokol RJ, Breslow JL. ApoB gene nonsense and splicing mutations in a compound heterozygote of familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1991;32:1341-1348.

Huang L-S, Ripps ME, Korman SH, Deckelbaum RJ, Breslow JL. Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21

deletion derived by Alu-Alu recombination. *J Biol Chem.* 1989;264:11394-11400

Hussain MM, Bakillah A, Jamil H. Apolipoprotein binding to microsomal triglyceride transfer protein decreases with increases in length and lipidation: implications for lipoprotein biosynthesis. *Biochemistry.* 1997;36:13060-13067

Ingram MF, Shelness GS. Folding of the amino-terminal domain of apolipoprotein B initiates microsomal triglyceride transfer protein-dependent lipid transfer to nascent very low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1996;272:10279-10286.

Innerarity TL, Borén J, Yamanaka S, Olofsson S-O. Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* 1996;271:2353-2356.

Kane JP, Havel RJ. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D., eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. II. 7th ed. New York, McGraw Hill, 1995; 1853-1885

Kayden HJ, Traber MG, 1993. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 34: 343-358.

Kaptein A., Roodenburg L., Princen H.M. Butyrate stimulates the secretion of apolipoprotein (apo) A-I and apo B100 by the human hepatoma cell line HepG2. Induction of apo A-I mRNA with no change of apo B100 mRNA. *Biochem J.* 1991;278:557-564

Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC Jr, Innerarity TL, Blackhart B, Taylor WH, Marcel Y, Milne R, Johnson D, Fuller M, Lusic AJ, McCarthy BJ, Mahley RW, Levy-Wilson B, Scott J.

Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature*. 1986;323:734-738.

Knott TJ, Rall SC Jr, Innerarity TL, Jacobson SF, Urdea MS, Levy-Wilson B, Powell LM, Pease RJ, Eddy R, Nakai H, Byers M, Priestley LM, Robertson E, Rall LB, Betsholz C, Shows TB, Mahley RW, Scott J. Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. *Science*. 1985;230:37-43.

Ko C, Lee TL, Lau PW, Li J, Davis BT, Voyiaziakis E, Allison DB, Chua SC Jr, Huang LS. Two novel quantitative *trait loci on mouse chromosomes 6 and 4 independently and synergistically regulate plasma apoB levels*. *J Lipid Res*. 2001 May;42(5):844-55.

Krul ES, Tang J, Kettler TS, Clouse RE, Schonfeld G. Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 189(2):1069-76, 1992

Kulinski A., Rustaesus S., Vance J.E. Microsomal Triacylglycerol Transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with apo B, as well as for apo B lipidation. *J Biol Chem* 2002; 277:31516-31525

Law SW, Grant SM, Higuchi K, Hospattankar A, Lackner NL, Brewer HB Jr. Human liver apolipoprotein B-100 cDNA: complete nucleic acid and derived amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:8142-814

Lee S-Y, Nagy BP, Brooks AR, Wang D-M, Paulweber B, Levy-Wilson B. Members of the caudal family of homeodomain proteins repress transcription from the human apolipoprotein B promoter in intestinal cells. *J Biol Chem*. 1996;271:707-718.

Levy-Wilson B, Paulweber B, Nagy BP, Ludwig EH, Brooks AR. Nuclease-hypersensitive sites define a region with enhancer activity in the third intron of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem.* 1992;267:18735-18743.

Levy-Wilson B. D.NaseI hypersensitive sites at the 3' end of the human apolipoprotein B gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;171:162-168.

Liao W, Yeung S-CJ, Chan L. Proteasome-mediated degradation of apolipoprotein B targets both nascent peptides cotranslationally before translocation and full-length apolipoprotein B after translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1998;273:27225-27230

Linton MF, Farese RV jr, Young SG. Familial hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 1993; 34: 521- 541

Linton MF, Pierotti V, Young SG. Reading-frame restoration with an apolipoprotein B gene frameshift mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:11431-11435.

Manchekar M., Richardson P.E., Forte T.M., Datta G., Segrest J.P., Dashti N. Apolipoprotein B-containing lipoprotein particle assembly. *J Biol Chem* 2004; 279:39757-39766

Mason TM. The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. *Critical Rev Clin Lab Sci.* 1998;35:461-487.

Moberly J.B., Cole T.G., Alpers D.H., Schonfeld G. Oleic acid stimulation of apolipoprotein B secretion from HepG2 and Caco-2 cells occurs posttranscriptionally. *Biochim.Biophys.Acta* 1990;1042:70-80.

Muller DPR, Lloyd JK, Wolff OH, 1985. the role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption. *J Inherit Metab Dis* 8 (Suppl 1): 88-92.

Najah M, Di Leo E, Awatef J, Magnolo L, Imene J, Pinotti E, Bahri M, Barsaoui S, Brini I, Fekih M, Slimane MN, Tarugi P. Identification of patients with abetalipoproteinemia and homozygous familial hypobetalipoproteinemia in Tunisia. *Clin Chim Acta.* 2009 Mar;401(1-2):51-6. Epub 2008 Nov 21

Neuman RJ, Yuan B, Gerhad DS, Liu KY, Yue P, Duan S, Aversa M, Schonfeld G. 2002. Familial hypobetalipoproteinemia found linked to chromosome 3p in 6 kindreds. *J Lipid res* 43:407-415.

Paulweber B, Brooks AR, Nagy BP, Levy-Wilson B. Identification of a negative regulatory region 5' of the human apolipoprotein B promoter. *J Biol Chem.* 1991;266:21956-21961.

Paulweber B, Onasch MA, Nagy BP, Levy-Wilson B. Similarities and differences in the function of regulatory elements at the 5' end of the human apolipoprotein B gene in cultured hepatoma (HepG2) and colon carcinoma (CaCo-2) cells. *J Biol Chem.* 1991;266:24149-24160.

Parhofer KG, Barret PHR, Aguilar-Salinas CA, Schonfeld G. 1996. Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in human apoB-89, apoB-75, apoB-54.8, and apoB-31 heterozygotes. *J Lipid Res* 37:844-852

Patsch W, Gotto AM Jr. Apolipoproteins: pathophysiology and clinical implications. *Methods Enzymol.* 1996;263:3-32.

Pullinger CR, Hillas E, Hardman DA, Chen GC, Naya-Vigne JM, Iwasa JA, Hamilton RL, Lalouel J-M, Williams RR, Kane JP. Two apolipoprotein B gene defects in a kindred with hypobetalipoproteinemia, one of which results in a truncated variant, apoB-61, in VLDL and LDL. *J Lipid Res.* 1992;33:699-710.

Pullinger CR, North JD, Teng B, Rifichi VA, Ronhild de Brito AE, Scott J. The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2

cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J Lipid Res.* 1989;30:1065-1077.

Pontrelli L., Sidiropoulos KG, Adeli K. Translational control of apolipoprotein B mRNA: regulation via cis elements in the 5' and 3' Untranslated Regions. *Biochemistry* 2004;43:6734-6744.

Pulai JJ, Latour MA, Kwok P-Y, Schonfeld G. Diabetes mellitus in a new kindred with familial hypobetalipoproteinemia and an apolipoprotein B truncation (apoB-55). *Atherosclerosis.* 1998;136:289-295.

Pulai JJ, Zakeri H, Kwok P-Y, Kim JH, Wu J, Schonfeld G. Donor splice mutation (665+1G-T) in familial hypobetalipoproteinemia with no detectable apoB truncation. *Am J Med Genet.* 1998;80:218-220.

Pulai JJ, Neuman RJ, Groenewegen AW, Wu J, Schonfeld G. Genetic heterogeneity in familial hypobetalipoproteinemia: linkage and non-linkage to the apoB gene in Caucasian families. *American Journal of Medical Genetics.* 76(1):79-86, 1998.

Pullinger CR, Hillas E, Hardman DA, Chen GC, Naya-Vigne JM, Iwasa JA, Hamilton RL, Lalouel J-M, Williams RR, Kane JP. Two apolipoprotein B gene defects in a kindred with hypobetalipoproteinemia, one of which results in a truncated variant, apoB-61, in VLDL and LDL. *J Lipid Res.* 1992;33:699-710.

Pullinger CR, North JD, Teng B, Rifici VA, Ronhild de Brito AE, Scott J. The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin, and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J Lipid Res.* 1989;30:1065-1077.

Richard Sherva, Pin Yue, Gustav Schonfeld and Rosalind J. Neumann. Evidence for a quantitative trait locus affecting low levels of

apolipoprotein B and low density lipoprotein on chromosome 10 in Caucasian families. *J.Lipid Res.* 2007. 48: 2632-263

Segrest JP, Jones MK, Mishra VK, Anantharamaiah GM, Garber DW. ApoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic -strand domains. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1674-1685.

Segrest,J.P., D.W.Garber,C.G.Brouillette, S.C. Harvey,and G.M.Anantharamaiah. 1994. The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv.protein chem* . 45: 303-369.

Segrest J.P., Jones M. K., De Loof H., Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lip Res.* 2001;42:1346-1367.

Selby SL, Yao Z. Level of apolipoprotein B mRNA has an important effect on the synthesis and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. Studies on transfected hepatoma cell lines expressing recombinant human apolipoprotein B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1900-1910.

Sharp D, Ricci B, Kiennzle B, Lin MC, Wetterau JR, 1994. Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure. *Biochemistry* 33: 9057-9061.

Srivastava N, Noto D, Averna M, Pulai J, Srivastava RAK, Cole TG, Latour MA, Patterson BW, Schonfeld G. A new apolipoprotein B truncation (apoB-43.7) in familial hypobetalipoproteinemia: genetic and metabolic studies. *Metabolism.* 1996;45:1296-1304.

Srivastava RA. Srivastava N. Averna M. Cefalù AB. Schonfeld G. Molecular bases of low production rates of apolipoprotein B-100 and truncated apoB-82 in a mutant HepG2 cell line generated by targeted

modification of the apolipoprotein B gene. *Journal of Lipid Research*. 40(5):901-12, 1999.

Swift LL. Role of the Golgi apparatus in the phosphorylation of apolipoprotein B. *J Biol Chem*. 1996;271:31491-31495.

Van Greevenbroek MMJ, de Bruin TWA. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*. 1998;141:S9-S16

Vauhkonen M, Viitala J, Parkkinen J, Rauvala H. High-mannose structure of apolipoprotein-B from low-density lipoproteins of human plasma. *Eur J Biochem*. 1985;152:43-50

Vukmirica J., Nishimaki-Mogami T., Tran K., Shan J., McLeod R.S., Yuan J., Yao Z. The N-linked oligosaccharides at the amino terminus of human apoB are important for the assembly and secretion of VLDL. *J Lipid Res* 2002; 43:1496-1507.

Welty FK, Hubl ST, Pierotti VR, Young SG. A truncated species of apolipoprotein B (B67) in a kindred with familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1991;87:1748-1754.

Welty FK, Lahoz C, Tucker KL, Ordovas JM, Wilson PWF, Schaefer EJ. 1998. Frequency of ApoB and ApoE gene mutations as causes of hypobetalipoproteinemia in the Framingham offspring population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1745-1751.

Welty FK, Lichtenstein AH, Barret PHR, DolniKowski GG, Ordovas JM, Schaefer EJ. 1997. Decreases production and increased catabolism of apolipoprotein B-100 in apolipoprotein B-67/B-100 heterozygotes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:881-888.

Welty FK, Ordovas J, Schaefer EJ, Wilson PWF, Young SG. Identification and molecular analysis of two apoB gene mutations causing low plasma cholesterol levels. *Circulation*. 1995;92:2036-2040.

Wu J., Kim J., Li Q., Kwok P-Y., Cole T.G., Cefalù A.B., Averna M., Schonfeld G. Known mutations of apoB account for only a small minority of hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1999; 40:955-959

Yang C-Y, Chen S-H, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li W-H, Sparrow DA, De Loof H, Rosseneu M, Lee F-S, Gu Z-W, Gotto AM Jr, Chan L. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature.* 1986;323:738-742

Yao Z, Tran K, McLeod RS. Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J Lipid Res.* 1997;38:1937-1953.

Yuan B, Neuman R, Duan SH, Weber JL, Kwok PY, Saccone NL, Wu JS, Liu KY, Schonfeld G. Linkage of a gene for familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p21.1-22. *Am J Hum Genet.* 2000 May;66(5):1699-704. Epub 2000 Apr 10.

Zhou M, Fisher EA, Ginsberg HN. Regulated co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem.* 1998;273:24649-24653

Zhuang H, Chuang SS, Das HK. Transcriptional regulation of the apolipoprotein B100 gene: purification and characterization of trans-acting factor BRF-2. *Mol Cell Biol.* 1992;12.

Siti Web

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

<https://splice.uwo.ca/>

