



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA  
IN GENETICA MEDICA  
XXIV CICLO

---

**INDIVIDUAZIONE DELLA CAUSA  
GENETICA RESPONSABILE DELLA  
IPOCOLESTEROLEMIA NELLE  
FAMIGLIE DI CAMPODIMELE (LT).**

Tesi di Dottorato di:  
MINICOCCI ILENIA

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa PAOLA GRAMMATICO

Tutor:

Chiar.mo Prof. MARCELLO ARCA

Triennio Accademico 2008-2011

# **INDICE**

## *INTRODUZIONE*

1.1 Premessa	- 5 -
1.2 Metabolismo delle lipoproteine	- 8 -
1.3 La via esogena del colesterolo	- 12 -
1.4 La via endogena del colesterolo	- 15 -
1.5 HDL e trasporto inverso del colesterolo	- 20 -
1.7 Ipercolesterolemie primarie e secondarie	- 24 -
1.8 Ipolipoproteinemie	- 28 -
1.9 Il progetto WHO MONICA.	- 32 -
1.10 Il “caso Campodimele”	- 34 -

## *SCOPO DELLO STUDIO*

2.1 Obiettivi della ricerca svolta	- 38 -
------------------------------------	--------

## *MATERIALI E METODI*

3.1 Reclutamento dei soggetti	- 46 -
3.2 Misurazioni lipidiche	- 47 -
3.3 Misurazione degli steroli non-colesterolo.	- 48 -

3.4 Studio familiare	- 50 -
3.5 Studio di popolazione	- 50 -
3.6 Estrazione di DNA Genomico da Buffy Coat.	- 52 -
3.6 Genotipizzazione del polimorfismo dell'ApoE.	- 54 -
3.7 Amplificazione delle regioni esoniche e delle giunzioni introne-esone dei geni candidati.	- 56 -
3.7 Sequenziamento diretto degli ampliconi	- 61 -
3.8 Misurazione dei livelli sierici della proteina Angiopietina-like3.	- 63 -
3.9 Profilo lipoproteico tramite Fast Protein Liquid Chromatografy (FPLC).	- 66 -
3.10 Analisi statistiche	- 66 -

## *RISULTATI*

4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione generale di Campodimele.	- 69 -
4.2 Rapporti steroli non-colesterolo tra ipocolesterolemici e normolipemici.	- 72 -

4.3 Genotipizzazione del polimorfismo dell'ApoE	- 74 -
4.4 Studio familiare	- 74 -
4.5 Studio della popolazione	- 83 -
4.6 Caratteristiche biochimico-cliniche dei portatori delle mutazioni del gene ANGPTL3	- 86 -
4.7 Concentrazioni della proteina Angptl3 in base ai genotipi	- 92 -
4.8 Associazione tra mutazioni del gene ANGPTL3 e steroli non colesterolo	- 94 -
 <i>CONCLUSIONI</i>	 - 95 -
 <i>BIBLIOGRAFIA</i>	 - 108 -

# INTRODUZIONE

## 1.1 Premessa

L'aterosclerosi è una condizione patologica progressiva che interessa principalmente le medie e grandi arterie ed è responsabile dell'insorgenza dei più comuni eventi avversi del sistema cardiovascolare, quali infarto del miocardio e ictus. La malattia aterosclerotica è caratterizzata da un ispessimento e indurimento della parete arteriosa con conseguente perdita di elasticità, dalla formazione di depositi ateromatosi e da fibrosi nello strato più interno della parete arteriosa.

Le specifiche conseguenze dei cambiamenti patologici della malattia aterosclerotica dipendono, in parte, dalla dimensione del vaso interessato. Infatti, le larghe arterie elastiche, inclusa l'aorta e le arterie iliache, generalmente sono soggette alla distruzione della parete con conseguente aneurisma, mentre le medie e piccole arterie muscolari, quali coronarica, carotidea, vertebrale, femorale e tibiale, presentano lesioni occlusive che contribuiscono allo sviluppo di disturbi di natura ischemica.<sup>1</sup> Il carattere multifattoriale attribuito alla malattia aterosclerotica deriva dall'osservazione che

molteplici fattori di rischio contribuiscono non solo all'insorgenza ma anche alla progressione dell'aterosclerosi.

I fattori di rischio sono suddivisi in due categorie principali:

- fattori di rischio genetici: elevati livelli di lipoproteine a bassa o molto bassa densità (LDL e VLDL), ridotti livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL), elevati livelli di lipoproteina Lp(a), ipertensione arteriosa, iperomocisteinemia, diabete, elevati livelli di fattori ematici, sesso, infiammazione sistemica;
- fattori di rischio ambientali: dieta ad alto contenuto di grassi saturi e colesterolo, fumo di sigaretta, ridotto esercizio fisico, ridotti livelli di antiossidanti, agenti infettivi (es. *Chlamydia pneumoniae*).<sup>2,3,4</sup>

Studi clinici hanno mostrato che l'aterosclerosi inizia con l'adesione di monociti e linfociti alle cellule endoteliali attivate dell'intima; tale osservazione ha contribuito alla definizione, tuttora vigente, dell'aterosclerosi come patologia infiammatoria cronica.<sup>5,6,7</sup> Questa definizione è limitativa ed esclude la reale origine del danno vascolare focale che, osservazioni condotte sia nell'animale da laboratorio che nell'uomo, hanno identificato nella dislipidemia.

Alterazioni del metabolismo lipidico e lipoproteico che si manifestano con un aumento (iperlipoproteinemia) o una riduzione (ipolipoproteinemia) della concentrazione delle lipoproteine plasmatiche e/o con una loro alterazione qualitativa sono positivamente associate all'insorgenza e alla progressione delle lesioni aterosclerotiche.

Esistono una serie di evidenze sul ruolo cruciale giocato dai fattori nutrizionali nel causare arteriosclerosi e di conseguenza malattia coronarica. Le prime evidenze risalgono agli studi sperimentali di Ignatowski e Anitschkov su coniglio nutrito con dieta ricca in colesterolo e acidi grassi saturi e datano al 1908.<sup>8</sup> Tuttavia sino al 1950 non è stata disponibile una definizione precisa di quali fattori potessero contribuire e quali altri prevenire l'iperlipidemia e l'arteriosclerosi.

Data la correlazione lineare tra rischio cardiovascolare e livelli circolanti di lipoproteine plasmatiche, la comprensione del metabolismo lipidico e lipoproteico è di cruciale importanza al fine di individuare i processi cellulari che possono costituire efficaci target di intervento terapeutico nella gestione delle patologie cardiovascolari di natura aterosclerotica.

I notevoli progressi nel campo della farmacologia e più di recente della biologia molecolare hanno permesso e stanno permettendo la scoperta di nuovi meccanismi fisiologici e patogenetici coinvolti nel metabolismo lipidico e nella comparsa di iperlipidemie. Scoperte queste che stanno portando allo studio di nuovi approcci farmacologici volti a correggere diversi aspetti delle dislipidemie.

## 1.2 Metabolismo delle lipoproteine

I lipidi, a causa della loro scarsa idrosolubilità, necessitano di un sistema di trasporto che ne garantisca la possibilità di circolare nel torrente circolatorio e tale sistema è costituito dalle lipoproteine. Le lipoproteine sono particelle di forma globulare costituite da un nucleo centrale apolare, ricco in trigliceridi ed esteri del colesterolo, e da un involucro esterno polare, formato da fosfolipidi, apolipoproteine (apo) e piccole quantità di colesterolo libero.

Le apolipoproteine sono sia componenti strutturali delle lipoproteine come (apo B, apo A-I e apo A-II) sia ligandi di recettori di membrana (apo B, e Apo E). Le apolipoproteine possono inoltre agire da

attivatori o inibitori di enzimi (apo A-I, C-II, CIII) o sistemi di trasporto (apo A-IV, apo F). I lipidi meno idrofobici come i fosfolipidi (PL) e il colesterolo libero (FC) formano lo scheletro esterno delle lipoproteine mentre i lipidi con elevata idrofobicità, colesterolo esterificato (CE) e trigliceridi (TG) formano il core delle particelle.

Le lipoproteine differiscono tra loro per densità, composizione lipidica e natura della componente apolipoproteica. Le apolipoproteine giocano un ruolo fondamentale nel destino metabolico delle lipoproteine in quanto agiscono da elementi strutturali, cofattori per enzimi e ligandi per le interazioni con specifici recettori cellulari. (*Tabella 1*).

I principali tipi di lipoproteine plasmatiche furono originariamente identificati in base alla loro differente solubilità:

- chilomicroni;
- lipoproteine a densità molto bassa (very low density lipoproteins, VLDL);
- lipoproteine a densità intermedia (intermediate density lipoproteins, IDL);
- lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL);
- lipoproteine ad alta densità (high density lipoproteins, HDL).

La densità delle lipoproteine è proporzionale al contenuto proteico ed è inversamente proporzionale al contenuto lipidico. Generalmente, le dimensioni delle lipoproteine aumentano proporzionalmente al contenuto in trigliceridi ed esteri del colesterolo. La forma globulare delle lipoproteine, caratterizzata da un elevato rapporto volume/superficie, riduce al minimo l'interazione delle particelle lipoproteiche con

Tabella 1 : *Caratteristiche e composizione delle lipoproteine plasmatiche*

	Densità Kg/L	Diametro nm	Composizione %				
			CE	FC	TG	PL	proteine
CM	< 0,95	80-500	1-3	1	86-94	3-8	1-2
VLDL	0,96-1,006	30-80	12-14	6-8	55-65	12-18	8-15
IDL	1,006-1,019	25-30	20-35	7-11	25-40	15-22	12-19
LDL	1,019-1,063	19-25	35-45	6-10	6-12	20-25	20-25
HDL2	1,063-1,125	8-11	15-20	4-6	3-8	30-40	35-40
HDL3	1,125-1,210	6-9	10-18	1-4	3-6	25-35	45-55
Lp(a)	1,055-1,085	25-30	30-36	8-10	3-4	20-25	30-35

CM: chilomicroni, VLDL: lipoproteine a bassissima densità, IDL: lipoproteine a densità intermedia, LDL: lipoproteine a bassa densità, HDL: lipoproteine ad alta densità, Lp(a): lipoproteina a, CE: colesterolo estere, FC: colesterolo libero, TG: trigliceridi, PL: fosfolipidi

l'ambiente acquoso esterno, ne favorisce la solubilizzazione nel plasma e ne garantisce al contempo un'elevata capacità di trasporto dei lipidi.

I chilomicroni, le lipoproteine di maggiori dimensioni, sono costituite principalmente da trigliceridi e sono presenti nel plasma solo nella fase postprandiale. Le apo presenti in queste lipoproteine sono principalmente apo B-48, apo A-I e apo C oltre a piccole quantità di apo A-II, A-IV e Apo E.

Le lipoproteine a bassissima densità (VLDL) sono lipoproteine ricche in trigliceridi e insieme alle lipoproteine a densità intermedia (IDL) sono costituite principalmente da apo B-100, le varie apo C e apo E. Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono più piccole delle VLDL e possiedono un rapporto componente proteica/componente lipidica più elevato.

L'apo B-100 rappresenta il 95% circa delle apolipoproteine presenti, sono inoltre presenti Apo C e Apo E.

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono le più piccole e pesanti. Circa il 45% è costituito da apo nelle seguenti proporzioni: 65% apo A-1; 10-23% apo A-II; 5-15% apo C-1; 1-3% apo E oltre a tracce di apo A-IV. Le HDL sono presenti in due sottoclassi principali: le HDL2 e le HDL3 le

seconde meno ricche in lipidi ricevono via via colesterolo libero e fosfolipidi trasformandosi in HDL2.

Il destino dei lipidi nel plasma segue tre vie principali, la prima detta anche via esogena rende conto del metabolismo dei lipidi introdotti con la dieta ed è legata all'azione dei chilomicroni, la seconda o via endogena ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato, la terza definita anche trasporto inverso del colesterolo catalizza il ritorno del colesterolo al fegato ed ha le HDL come attori principali. Sia la via esogena che quella endogena contribuiscono ai livelli di lipidi circolanti.

### 1.3 La via esogena del colesterolo

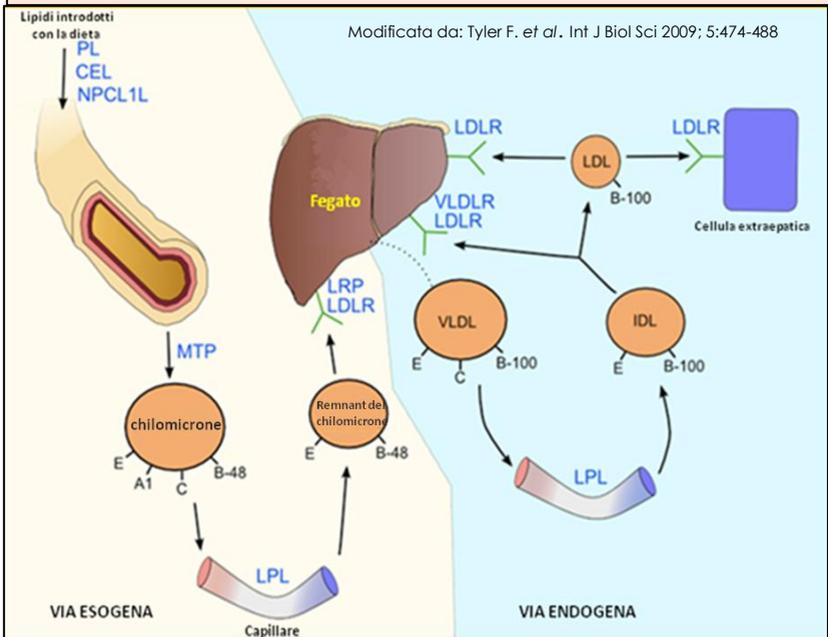
La via esogena inizia con l'assorbimento dei lipidi a livello intestinale e con la secrezione dei chilomicroni dall'epitelio intestinale nel sistema linfatico e conseguente entrata nel circolo venoso attraverso il dotto toracico linfatico. Appena i chilomicroni passano nei capillari entrano in contatto con la lipoprotein lipasi (LPL) associata alle cellule endoteliali, l'apo C-II associata ai chilomicroni attiva l'enzima che idrolizza i trigliceridi a glicerolo e

acidi grassi liberi che vengono captati rapidamente dal muscolo e dal tessuto adiposo (*Figura 1*).

L'apo E presente sulla superficie dei chilomicroni favorisce l'ancoraggio agli eparansolfato proteoglicani (HSPG) della membrana cellulare rendendo accessibili i chilomicroni all'azione della LPL. L'apo C-I e l'apo C-III hanno un'azione inibitoria sui processi lipolitici in quanto spiazzano l'apo E dalle lipoproteine oltre a mascherare i siti di legame per la LPL ed ad inibire l'azione dell'apolipoproteina C-II. La carenza di apo C-III porta a bassi livelli di TG circolanti.

In seguito a lipolisi mediata da LPL, il centro dei chilomicroni, ricco di TG, progressivamente condensa portando ad un eccesso di componenti dello scheletro esterno (FC, PL, apo A-I e apo A-II) che vengono trasferiti alle HDL nascenti; contemporaneamente i chilomicroni ricevono dalle HDL apo E, e le varie apo C.

Figura 1: Via esogena e via endogena del colesterolo



Il trasporto del colesterolo esogeno e la sintesi endogena del colesterolo richiede lipoproteine e proteine diverse come indicato nel testo.

NPCL1L: Niemann-Pick C1-Like 1

MTP: Proteina di Trasferimento Microsomiale dei Trigliceridi

LPL: Lipoprotein Lipasi

LDLR: Recettore delle LDL

LRP: Lipoprotein Related Protein

VLDLR: Recettore delle VLDL

In seguito a queste modificazioni e alla perdita di TG i chilomicroni si trasformano in particelle più piccole definiti remnants dei chilomicroni (CR).

Più del 50% dei CR vengono captati dal fegato attraverso l'interazione con il recettore delle LDL (LDLR), una proteina di 160 kDa espressa in tutte le cellule dei mammiferi che riconosce come ligandi sia l'apo B-100 che l'apo E. Esiste tuttavia un'altra via attraverso la quale i CR vengono captati nel fegato, e coinvolge il passaggio dei CR attraverso le fenestrature tra le cellule endoteliali dei capillari epatici, dove i CR si legano agli HSPG facilitandone l'interazione con un altro recettore della famiglia dei LDLR, l'LRP, un recettore di superficie in grado di legare diversi ligandi tra cui lipoproteine, proteasi e inibitori di proteasi che internalizza i CR. Un altro enzima, la lipasi epatica (HE), presente nei sinusoidi epatici, favorisce la lipolisi dei CR.

## 1.4 La via endogena del colesterolo

La via endogena ha inizio con la secrezione di VLDL da parte del fegato, ed è sempre attiva anche se la maggior attività si ha nella fase postprandiale (le VLDL

rappresentano l'80% delle particelle circolanti in questa fase). L'assemblaggio delle VLDL ha inizio ad opera della proteina di trasferimento microsomiale (MTP) che trasporta i lipidi verso i sistemi di sintesi della apolipoproteina apo B-100. In funzione dell'ulteriore associazione con lipidi, che avviene in un secondo tempo, si generano VLDL di diverse dimensioni: dalle VLDL 1, ricche in TG, a quelle più piccole e dense, ricche in CE chiamate VLDL 3. Una volta in circolo, le VLDL, come i chilomicroni, sono soggette all'azione della LPL, che idrolizza il core ricco in TG, aumentando la percentuale di CE presente; le particelle diventano a questo punto più piccole e più dense. Le componenti del guscio esterno in eccesso, in particolare FC, PL, le varie apo C e l'apo E sono trasferite alle HDL. L'azione lipolitica trasforma le VLDL in remnants o IDL. La grande maggioranza dei remnants sono catturati nuovamente dal fegato con un meccanismo simile a quello dei CR. (Figura 1)

Le IDL vengono metabolizzate dalla LPL e dalla HE, che mostra una spiccata affinità per le IDL. Dalla lipolisi delle IDL si generano le LDL, ricche in CE e con un minore contenuto di TG rispetto alle VLDL. Prima di interagire con i recettori cellulari, le LDL possono andare

incontro a cambiamenti legati principalmente all'attività della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP), che media il trasferimento di TG e CE tra lipoproteine. In particolare, i TG delle VLDL sono trasferite alle LDL e alle HDL in cambio di esteri del colesterolo. Questi interscambi diminuiscono il contenuto di colesterolo estere delle LDL e aumentano il contenuto di TG, rendendo queste particelle più suscettibili all'azione lipolitica dei TG da parte della HE. Il risultato finale è la formazione di LDL piccole e dense (dovuto ad una riduzione del rapporto lipidi/proteine) ritenute più aterogene delle LDL normali. I recettori B-E o il recettore per le LDL, presenti sulla superficie di tutte cellule, ma attivi principalmente nel fegato, sono i principali responsabili del catabolismo finale delle LDL. Il colesterolo che entra negli epatociti via recettore B-E viene esterificato dalla acil colesterolo aciltraferasi (ACAT) e immagazzinato nel citoplasma insieme con le molecole di colesterolo prodotte endogenamente nelle stesse cellule.

Quando serve colesterolo per la sintesi di ormoni, acidi biliari o per la membrana cellulare, la CE-idrolasi neutra riconverte il CE a FC. L'influsso cellulare di colesterolo attraverso

la via del recettore B-E porta a tre eventi distinti, ma concomitanti: una diminuzione della sintesi di colesterolo e recettore B-E e un aumento di sintesi di CE. Questi effetti di feedback negativo sono controllati da un fattore di trascrizione, la sterol regulatory element-binding protein (SREBP) che può modulare la trascrizione di geni coinvolti nella biosintesi degli steroli, come l'idrossi metil glutaril coenzima A sintasi (HMGCoA sintasi), l'idrossi metil glutaril coenzima A reduttasi (HMGCoA reduttasi), i recettori B-E ed altri enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi grassi. L'accumulo di colesterolo diminuisce il rilascio proteolitico di SREBP dal precursore legato alla membrana. Viceversa in presenza di richiesta di colesterolo da parte della cellula, il precursore di SREBP viene tagliato in due regioni permettendo il rilascio del fattore di trascrizione solubile che si sposta nel nucleo stimolando la trascrizione dei geni bersaglio.

Le LDL possono essere immobilizzate all'interno delle pareti vasali (mediante azione della LPL, HE, HSPG): il legame ai proteoglicani le rende suscettibili a fenomeni ossidativi, generando lipoproteine modificate, spesso identificate come LDL ossidate (Ox-LDL). Le Ox-LDL possono essere fagocitate dai macrofagi

presenti nella parete vascolare infiammata, ad opera di una classe di recettori definiti scavenger. Questa famiglia di recettori, a differenza dei recettori B-E, non risente di un meccanismo di feedback negativo da parte dei livelli di colesterolo intracellulare, da ciò consegue che possono continuare a introdurre colesterolo modificato trasformandosi in cellule schiumose.

Un'altra lipoproteina aterogena è la lipoproteina (a) (Lp(a)). L'Lp(a) è costituita da due unità: una particella di LDL dove l'apo B-100 è legata covalentemente con un ponte disolfuro con l'apo(a), una glicoproteina idrofila. Le sue proprietà aterogene sono legate con ogni probabilità all'omologia con una proteasi del plasminogeno. L'apo(a) è sintetizzata nel fegato, e viene assemblata nelle lipoproteine ricche in apo-B100 sulla superficie degli epatociti. Il catabolismo di questa lipoproteina è ancora poco noto, una buona parte viene convertita in LDL e catabolizzata via recettore B-E. Il rene sembra il sito principale di rimozione della Lp(a): sembra infatti che la metalloendoproteasi renale clivi l'apo(a) favorendone poi l'escrezione con le urine attraverso un meccanismo non del tutto chiaro.

## 1.5 HDL e trasporto inverso del colesterolo

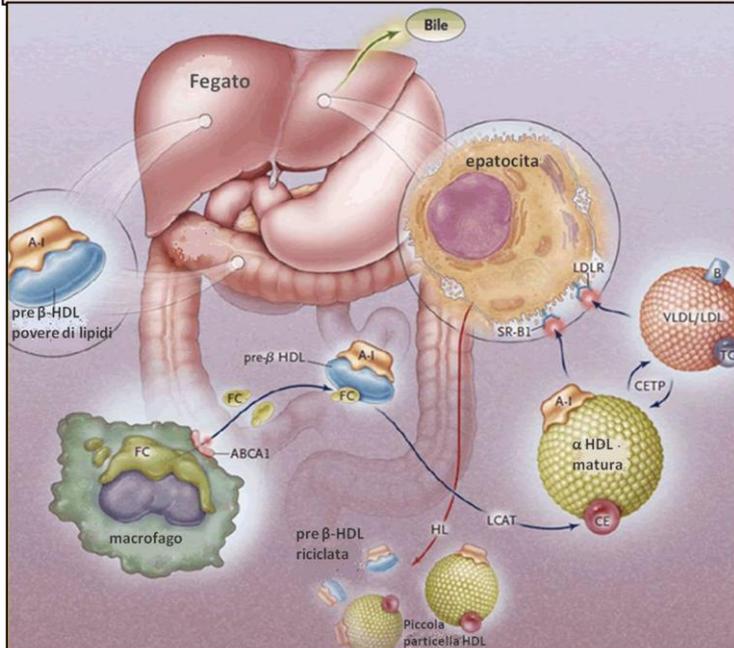
Il colesterolo non può essere catabolizzato per via enzimatica nell'uomo, esiste pertanto un trasporto centripeto che riporta il colesterolo al fegato per le vie metaboliche finali. (*Figura 2*)

Le HDL giocano un ruolo fondamentale in questo meccanismo, denominato trasporto inverso del colesterolo (RCT). Le HDL vengono classificate in diverse sottoclassi a seconda della loro composizione. Le particelle piccole, discoidali, contenenti apo A-I, chiamate pre-b<sub>1</sub>, pre-b<sub>2</sub> e pre-b<sub>3</sub> LpA-I (in base al contenuto crescente di sfingomieline e fosfatidilcolina e alla loro motilità elettroforetica b) e quelle contenenti apo E (g-LpE) o apo A-IV (LpA-IV) che sono prodotte dal fegato, dagli enterociti o si dissociano dai chilomicroni e dalle VLDL come componenti in eccesso dello scheletro esterno. Queste lipoproteine sono molto povere di lipidi e acquisiscono fosfolipidi e colesterolo sia dalle cellule epatiche che non-epatiche. Non è ancora chiaro se questo meccanismo sia extracellulare (le HDL nascenti possono mediare l'efflusso di colesterolo da numerose cellule comprese i macrofagi e gli

epatociti) o intracellulare (le HDL possono essere internalizzate e riscrete come lipoproteine lipidate, mediante un processo chiamato retroendocitosi), tuttavia richiede l'attività di un trasportatore di membrana chiamato ATP-binding cassette A1 (ABCA1).

Questo trasportatore è localizzato sulla superficie cellulare e nelle membrane del

Figura 2: *Trasporto inverso del colesterolo*



Trasporto inverso del colesterolo: Trasporto del colesterolo dai tessuti al fegato; implica il legame del colesterolo alle HDL3, che divengono HDL2 e la sua esterificazione ad opera della L-CAT.

Golgi, e può trasportare i lipidi dall'apparato di Golgi alla membrana cellulare facilitandone poi l'efflusso. L'efflusso di colesterolo ABCA1 dipendente è attivato dall'apo A-I, down-regolato nelle cellule proliferanti e in attiva differenziazione.

Una volta associato alle HDL nascenti, il colesterolo libero viene esterificato ad opera della lecitina-colesterolo acil transferasi (LCAT), un enzima chiave attivato dall'apo A-I. Le HDL povere in lipidi diventano mature, ricche in lipidi e sferiche ( $\alpha$ -LpA-I con mobilità elettroforetica a) come conseguenza dell'uptake di colesterolo, PL e altre apo dalle cellule periferiche, dai chilomicroni e dalle lipoproteine ricche in apo B-100. Inizialmente si formano le HDL3 ancora dense e relativamente povere in lipidi; via via che si arricchiscono in colesterolo libero, immediatamente esterificato ad opera della LCAT, le HDL3 si fondono tra di loro ad opera della proteina di trasferimento dei fosfolipidi (PLTP), in grado anche di aggiungere nuovi fosfolipidi.

Questo porta alla formazione delle HDL2, più grandi, meno dense e ricche in lipidi.

## 1.6 Fisiopatologia delle dislipoproteinemie

Le dislipidemie costituiscono un gruppo di alterazioni del metabolismo lipidico e si manifestano con un aumento (iperlipoproteinemia) o una riduzione (ipolipoproteinemia) della concentrazione delle lipoproteine plasmatiche e/o un'alterazione delle loro caratteristiche qualitative. Possono essere classificate in primarie o secondarie. Le prime sono causate da alterazioni metaboliche ereditarie di tipo mono o poligenico (ma appaiono sensibili anche ad influenze ambientali) che interessano uno o più geni coinvolti nel metabolismo lipoproteico.

Le forme secondarie, al contrario, sono dipendenti dalla presenza di uno stato morboso primitivo concomitante oppure dall'assunzione di farmaci o altre sostanze esogene. Valuteremo in questa sede solo le ipercolesterolemie e le ipolipoproteinemie, forme di dislipoproteinemie di cui solo negli ultimi anni si stanno scoprendo nuovi meccanismi fisiopatologici.

## 1.7 Ipercolesterolemie primarie e secondarie

La prima classificazione delle iperlipidemie è stata proposta da Fredrickson nel 1967 e prevedeva 5 fenotipi differenti (*Tabella 2*). Il completamento del progetto genoma e le nuove tecniche di biologia molecolare hanno permesso in questi ultimi anni di effettuare notevoli progressi nel campo delle forme primarie identificando numerosi geni coinvolti nelle patologie osservate.<sup>9</sup>

Le iperlipidemie primarie comprendono le ipercolesterolemie familiari; sono note forme dominanti (la patologia è presente già in forma eterozigote) e recessive (la patologia si manifesta quando entrambi gli alleli portano la stessa mutazione o siamo in presenza di una doppia eterozigosi). Tra le ipercolesterolemie familiari quella più frequente è legata alle mutazioni nel gene che codifica per il recettore delle LDL (Familial Hypercholesterolemia, FH, OMIM# 606945). Si trasmette in modo autosomico dominante, la sua frequenza in forma eterozigote è di 1:500 (si stima che in Italia circa 120.000 soggetti siano eterozigoti) e di 1:1.000.000 in forma omozigote. Sono state identificate più di 800

mutazioni su questo gene che sono in grado di incrementare il rischio cardiovascolare in questi soggetti di 4-10 volte.<sup>10</sup>

Tabella 2: Classificazione delle Iperlipoproteinemie secondo Frederickson	
Iperlipoproteinemia	Descrizione
Tipo I:	aumento dei chilomicroni, cioè aumento dei trigliceridi provenienti dalla dieta
Tipo IIa	aumento delle LDL, quindi del colesterolo
Tipo IIb	aumento delle LDL e delle VLDL, quindi sia del colesterolo che dei trigliceridi
Tipo III	aumento del colesterolo e dei trigliceridi totali, non accompagnato dall'aumento di lipoproteine, per aumento di prodotti intermedi derivanti dalla scissione delle VLDL prima di formare le frazioni LDL
Tipo IV	aumento delle VLDL e quindi dei trigliceridi, provenienti dal metabolismo dei carboidrati
Tipo V	aumento dei chilomicroni e delle VLDL, quindi dei trigliceridi provenienti dalla dieta e da quelli sintetizzati a partire dai carboidrati a livello del fegato

Clinicamente simile alla FH è l'ipercolesterolemia familiare da difetto di apo B100 (Hypercholesterolemia Autosomal Dominant, TYPE B, FDB, OMIM #144010), anch'essa a trasmissione autosomica dominante, è provocata da mutazioni del gene dell'apo B 100. Anche in questo caso la frequenza è stimata in 1:500-1:700 individui eterozigoti.<sup>11</sup>

Un terzo tipo di Ipercolesterolemia familiare denominata di tipo 3 (Hypercholesterolemia Autosomal Dominant, FH3, OMIM #603776) è stata identificata più di recente ed è legata alla mutazione del gene PCSK9, che codifica per la proteina NARC-1. La funzione di questa proteina è ancora sconosciuta anche se nei soggetti mutati che presentano ipercolesterolemia si assiste a riduzione della presenza dei recettori LDL e aumento della secrezione epatica di Apo B100.<sup>12</sup>

Esistono poi forme recessive quali l'ipercolesterolemia familiare recessiva (Hypercholesterolemia Autosomal Recessive, ARH, OMIM #603813) legata a mutazioni del gene di un adaptor protein coinvolta nella regolazione dell'attività del recettore LDL. È interessante rilevare che la frequenza di

omozigoti o eterozigoti composti per questo gene è molto elevata (1:38.000) nei paesi del bacino mediterraneo rispetto al resto dei paesi occidentali (1:1.000.000). L'esatta comprensione del ruolo di questa proteina consentirà in futuro la definizione di un intervento terapeutico ottimale.<sup>13</sup>

Le mutazioni di altri tre geni sono responsabili di altre due forme di ipercolesterolemie. Mutazioni a carico dei geni ABCG5 e ABCG8 causano un'alterazione dell'eliminazione degli steroli vegetali nell'enterocita, favorendo un aumento delle concentrazioni plasmatiche di steroli vegetali e di colesterolo (sitosterolemia, OMIM # 210250);<sup>14</sup> mentre mutazioni a carico della colesterolo 7 $\alpha$ -idrossilasi, enzima responsabile della prima tappa del catabolismo del colesterolo, diminuiscono la sintesi di acidi biliari causando un aumento delle concentrazioni di colesterolo plasmatico.<sup>15</sup>

Le ipercolesterolemie secondarie, ugualmente importanti nell'aumentare il rischio cardiovascolare, compaiono come conseguenza di patologie primitive quali malattie endocrine (diabete mellito, ipotiroidismo, obesità), alcolismo, colestasi, sindrome nefrosica, insufficienza renale o conseguenza di

somministrazione cronica di farmaci ( $\beta$ -bloccanti, diuretici tiazidici, corticosteroidi e steroidi sessuali).

## 1.8 Ipolipoproteinemie

Numerosissimi studi hanno confermato che bassi livelli di HDL si associano ad un aumento del rischio cardiovascolare. Lo studio di patologie genetiche caratterizzate da bassi livelli di HDL ha consentito di approfondire la conoscenza dei complessi rapporti tra HDL e patologia vascolare.

Le mutazioni di tre geni (LCAT, ABCA-1 e apo A-I) sono particolarmente importanti nel favorire la presenza di bassi livelli di HDL. Il deficit di LCAT nella forma classica e nella forma parziale (fish eye disease OMIM #136120) provoca una drastica riduzione dei livelli circolanti di HDL, ma ad oggi questa non è stata ancora correlata con la malattia coronarica in questi soggetti.<sup>16</sup>

Più importanti e frequenti sono le mutazioni di ABCA-1 che nella forma più grave portano alla malattia di Tangier (OMIM #205400) in cui il rischio cardiovascolare è

circa 3 volte maggiore rispetto ai soggetti normali.<sup>16</sup>

Le mutazioni dell'Apo-AI sono invece più rare, anche se ad oggi ne sono state individuate almeno 46 in grado di generare un fenotipo che provoca una ridotta attivazione della LCAT o che si associa alla deposizione amiloide (Ipoalfalipoproteinemia, OMIM #604091).<sup>17</sup> Una mutazione con caratteristiche particolari prende il nome di Apo AI Milano; questa mutazione consente la formazione di un dimero AI Milano-AI Milano che è caratterizzato da una migliore efficacia nel rimuovere il colesterolo, oltre che da un prolungato tempo di residenza nel plasma. Sono oggi in corso numerosi studi che prevedono la somministrazione terapeutica di questa proteina per valutare il suo potenziale anti-aterogeno.

La Ipobetalipoproteinemia primaria (HBL) include un gruppo eterogeneo di disordini ereditari del metabolismo lipidico caratterizzati da bassi livelli di LDL-C e/o ApoB nel plasma (inferiori al valore del 5° percentile sesso ed età specifico).<sup>18,19</sup>

Almeno tre patologie monogeniche, abetalipoproteinemia (ABL) (OMIM #200100), la sindrome da ritenzione di chilomicroni (CRD)

(OMIM #246700) e la ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL) (OMIM #107730) sono state incluse nel gruppo HBL. Il deficit della proteina di trasferimento microsomiale dei trigliceridi (MTP), necessaria per l'assemblaggio delle apoB contenenti lipoproteine (VLDL e chilomicroni) nel fegato e nell'intestino, è la causa della ABL.<sup>20</sup>

In assenza di MTP, apoB non può essere lipidata e subisce una rapida degradazione intracellulare. Per questo motivo, i pazienti con ABL mostrano livelli estremamente bassi di apoB contenenti lipoproteine che sono associati a malassorbimento cronico di grassi, deficit di vitamine liposolubili, ritardo nella crescita e sintomi neurologici variabili.<sup>21,22,23</sup>

La CDR, sindrome da ritenzione dei chilomicroni, è una malattia recessiva molto rara caratterizzata da anomalie del metabolismo dei chilomicroni. Soggetti affetti non hanno chilomicroni nel plasma a seguito di un pasto contenente grassi e mostrano un marcato accumulo di lipidi negli enterociti. Tuttavia, poiché la sintesi epatica di apoB è mantenuta, particelle LDL sono rilevabili nel sangue. Pazienti CDR possono mostrare steatorrea, malnutrizione e ritardo della crescita: la CRD è dovuta a mutazioni del gene

SARA2 che codifica per una piccola GTPasi (Sar1b) coinvolta nel traffico intracellulare dei grandi chilomicroni nelle vescicole COPII.<sup>24</sup>

I casi di FHBL mostrano riduzioni variabili (da moderate a gravi) di LDL-C o ApoB che possono essere associate o meno a steatosi epatica o malassorbimento dei grassi.<sup>25</sup> La maggior parte dei casi di Ipobebetaliipoproteinemia Familiare sono associati a mutazioni nel gene che codifica per la ApoB, che portano a difetti nella secrezione delle VLDL nel fegato.

Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che anche mutazioni nel gene PCSK9 possono essere responsabili di FHBL.<sup>26</sup> Il gene PCSK9 codifica per una proproteina convertasi regolata dal colesterolo, che fa parte delle subtilisin/kexin type 9 serina proteasi, subfamiglia delle pro proteine convertasi in grado di degradare il recettore delle LDL.<sup>27</sup> Infatti topi knock-out per PCSK9 mostrano una marcata riduzione di LDL-C plasmatico, dovuta all'aumento della clearance dell'LDL plasmatico conseguenza di una maggiore espressione dei recettori dell'LDL nel fegato.<sup>28</sup>

Recentemente è stato riportato che mutazioni a carico del gene ANGPTL3 (Angiopietin protein like 3) sono coinvolte

nella ipobetalipoproteinemia familiare. I portatori di due alleli non-senso del gene mostrano bassi livelli plasmatici non solo di LDL-C, ma anche di HDL-C e trigliceridi. Questo nuovo fenotipo è indicato come Ipolipidemia familiare combinata 2 (FHBL 2, OMIM #605019).<sup>29</sup> La Angiopietin-like 3 protein (Angptl3) è un polipeptide di 460 aa che regola in parte il metabolismo lipidico inibendo la Lipoprotein Lipasi (LPL), la Lipasi Epatica (HL) e la Lipasi Endoteliale (EL).<sup>30,31,32</sup>

## 1.9 Il progetto WHO MONICA.

La World Health Organization Monitoring Trend and Determinants in Cardiovascular Disease (WHO MONICA Project) è stata lanciata agli inizi degli anni '80 per misurare i trends nelle mortalità cardiovascolare e nella morbosità della malattia coronarica e cerebrovascolare e per valutare la misura in cui queste tendenze sono legate a cambiamenti di fattori di rischio noti, abitudini di vita quotidiana, assistenza sanitaria, o grandi caratteristiche socio-economiche misurate allo stesso tempo in comunità definite in diversi paesi.

Il progetto MONICA è stato sviluppato con l'obiettivo di misurare oltre 10 anni e in molte

differenti popolazioni, le tendenze e le cause delle malattie cardiovascolari. In particolare il programma si concentra sui tassi di eventi cardiovascolari e ictus convalidati, fatali e non fatali, e sui fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione, fumo di sigaretta e il colesterolo sierico) misurati in uomini e donne di età compresa tra i 25 e i 64 anni nello stesso tempo e in comunità definite in diversi Paesi. In questo modo si misurano le variazioni della mortalità cardiovascolare, da un lato tramite variazioni nell'incidenza mediata dai livelli di fattori di rischio e dall'altro tramite cambiamenti dei tassi di casi letali, connessi alla cure mediche.

Il progetto MONICA comprende 118 Reporting Units (subpopolazioni) per una popolazione totale di 15 milioni di soggetti.

Nella cornice della sezione italiana del Progetto MONICA veniva individuata una popolazione con colesterolemia media desiderabile e contenente un cluster di ipocolesterolemia, che aprì il "caso di Campodimele".<sup>33</sup>

## 1.10 Il “caso Campodimele”

Campodimele è un piccolo paese a 150 km a sud di Roma, nella provincia di Latina, noto al mondo per essere il “paese della longevità”. Infatti i suoi abitanti hanno un’aspettativa di vita che va oltre i 90, se non i 100 anni.

Questo paesino è passato alla ribalta quando, a seguito del progetto internazionale MONICA sull’individuazione dei fattori di rischio dell’aterosclerosi promosso dalla World Health Organization, furono riscontrati valori medi molto bassi di LDL-C.<sup>33</sup>

Successivamente la popolazione fu oggetto di diversi studi. Il gruppo di Cugini ha effettuato uno studio sulla pressione arteriosa nelle 24 ore nei soggetti anziani (45 uomini e 47 donne, di età compresa tra 76-102 anni), reclutati a Campodimele. L’indagine è stata eseguita per mezzo di un monitoraggio ambulatoriale non invasivo combinato con stime cronobiometriche, ed ha costituito un indice di riferimento per la pressione sanguigna nelle 24 ore in persone anziane.<sup>34</sup> Il livello di pressione arteriosa media giornaliera e di impatto barico nelle persone anziane in buona salute sono paragonabili con quelli di soggetti

giovani, suggerendo che i soggetti longevi sono caratterizzati da un controllo eugenetico del loro regime pressorio.<sup>35</sup>

I soggetti longevi mostravano una diastolica media giornaliera di livello meno pronunciato del previsto, rispetto alla popolazione generale sesso/età specifico. Sia i figli che i nipoti dei soggetti longevi mostravano una pressione sistolica e diastolica media giornaliera meno pronunciata rispetto ai loro compaesani coetanei. Quindi è stato ipotizzato che questi soggetti potevano essere protetti dallo sviluppo di ipertensione causata da vasocostrizione arteriolare. Dati i bassi livelli di pressione sistolica e diastolica nei soggetti giovani e adulti con familiarità positiva per la longevità, l'ipotesi che la protezione emodinamica da ipertensione senile poteva essere una caratteristica biologica ereditabile della longevità è stata accettata.<sup>36</sup>

Un altro studio condotto da Fazio e colleghi ha individuato tra otto soggetti con livelli di colesterolo inferiore al 5° percentile sesso/età specifico, individuati nella casistica di Campodimele della sezione italiana del progetto MONICA, cinque soggetti appartenenti alla stessa famiglia.<sup>37</sup>

Un successivo screening familiare ha rivelato 3 ulteriori soggetti con diagnosi di ipobetalipoproteinemia. Al fine di stabilire se questo fenotipo di FHLB fosse dovuto a larghe mutazioni nel gene ApoB, il gruppo di Fazio ha effettuato un'analisi di restrizione su DNA genomico su sei soggetti FHLB e due controlli normolipemici non consanguinei.<sup>38</sup> La digestione non ha mostrato riarrangiamenti evidenti nel gene ApoB, escludendo l'ipotesi iniziale e indicando un possibile nuovo locus genico responsabile della FHLB.

## SCOPO DELLO STUDIO

## 2.1 Obiettivi della ricerca svolta

I tre anni di dottorato sono stati svolti nel laboratorio di Genetica delle Dislipidemie del Prof. Marcello Arca (Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Sapienza – Università di Roma), la cui attività è rivolta allo studio delle basi molecolari che generano dislipidemia ed altri difetti del metabolismo lipidico.

Il progetto Campodimele riguarda l'individuazione della causa genetica responsabile della ipocolesterolemia nelle famiglie del comune di Campodimele, in provincia di Latina. Queste famiglie, caratterizzate da un'alta frequenza di individui con bassi livelli di colesterolo totale ed LDL, sono state individuate alcuni anni fa nel corso di una indagine epidemiologica dedicata ai fattori di rischio dell'aterosclerosi.<sup>38</sup> Nel lavoro di Fazio et al. è stato riportato lo studio clinico-molecolare di una di queste famiglie da cui si è evinto che tale forma di ipocolesterolemia aveva una base genetica e si trasmetteva con una modalità di tipo autosomico dominante. In particolare, tale studio ha consentito di escludere che la causa della ipocolesterolemia potesse risiedere in

alterazioni del gene codificante per l'apolipoproteina B che rappresenta la principale proteina trasportatrice del colesterolo nel plasma.

Al momento dell'inizio del progetto la causa della ipocolesterolemia di Campodimele rimaneva ancora sconosciuta. La sua individuazione rappresenta invece un obiettivo di grande interesse sia scientifico sia clinico-epidemiologico in quanto potrebbe consentire di caratterizzare nuovi geni che sono in grado di influenzare i livelli della colesterolemia. Inoltre, lo studio dei probandi e delle famiglie portatrici delle varianti geniche responsabili dell'ipocolesterolemia potrebbe permettere di comprendere l'effetto anti-aterogeno di valori ridotti della colesterolemia totale che, causati da fattori ereditari, si manifestano molto precocemente nella vita.

Un ruolo fondamentale nel metabolismo lipidico è svolto dalla Apolipoproteina E (ApoE), una glicoproteina che partecipa alla clearance dei remnants dei chilomicroni e delle VLDL agendo come ligando per il recettore delle LDL.<sup>39</sup> Il gene APOE, localizzato sul cromosoma 19 è polimorfico, con tre alleli comuni ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  ed  $\epsilon 4$ ) che danno origine a tre differenti isoforme della proteina, E2, E3 ed E4.

Queste isoforme differiscono nella sequenza amminoacidica alla posizione 112 e 158. ApoE3 contiene Cisteina alla posizione 112 e arginina alla 158. ApoE2 ha cisteina in entrambe le posizioni e ApoE4 arginina in entrambe le posizioni.<sup>40</sup>

Diversi studi hanno mostrato un'associazione tra le isoforme della apolipoproteina E (ApoE2, ApoE3 e ApoE4) e i livelli di colesterolo plasmatici. Il 60% della popolazione generale mostra il genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , definito wild type. Nei portatori dell'allele  $\epsilon 4$  si ha una down regulation dell'espressione dei recettori LDL epatici con conseguente aumento del tasso di colesterolo nel plasma, mentre l'allele  $\epsilon 2$  mostra un effetto protettivo.<sup>40-41</sup>

Studi su soggetti centenari hanno mostrato che l'allele  $\epsilon 2$  si associa ad un vantaggio di sopravvivenza. Frequenze alterate nel polimorfismo dell'Apo $\epsilon$  sono state riscontrate in persone molto anziane messe a confronto con soggetti giovani delle stesse popolazioni. Questi risultati possono essere correlati sia ad una leggera riduzione di malattie cardiovascolari sia ad un ridotto rischio di morbo di Alzheimer.

L'omeostasi del colesterolo viene mantenuta se la sintesi endogena e l'assor-

bimento intestinale sono in equilibrio con l'escrezione fecale di colesterolo. Per mantenere questo equilibrio si sono selezionati nel corso dell'evoluzione più di 100 geni che intervengono nella sintesi, nel trasporto e nel metabolismo del colesterolo. La sintesi endogena non rappresenta quindi l'unica fonte di colesterolo per l'organismo, ma esso viene anche assorbito dalla dieta a livello intestinale. L'assorbimento intestinale è un processo, composto di più fasi, durante il quale gli enterociti della mucosa intestinale catturano una parte del colesterolo che si viene a trovare quotidianamente nel lume intestinale, pari a circa 1.200-1.500 mg. In media un individuo adulto assorbe il 30-50% circa del colesterolo che entra nell'intestino tenue quotidianamente. Oltre al colesterolo, con la dieta immettiamo nell'intestino anche una certa quantità di steroli vegetali (200-400 mg/die), i quali però vengono scarsamente assorbiti, la loro concentrazione plasmatica che a seconda del tipo di sterolo è da 5.000 a 20.000 volte inferiore a quella del colesterolo.

Nell'uomo esiste una correlazione altamente significativa tra livelli plasmatici di alcuni steroli non-colesterolo (colestanolo, campesterolo e sitosterolo) e assorbimento di coles-

terolo, e tra altri steroli (lanosterolo e latosterolo) e sintesi endogena di colesterolo.

Gli steroli non-colesterolo plasmatici costituiscono quindi indicatori significativi dell'assorbimento o della sintesi endogena di colesterolo, poiché la tecnica di determinazione con cromatografia gas-liquida è relativamente semplice, la loro misurazione può essere preziosa per il monitoraggio del metabolismo del colesterolo in grande scala in studi epidemiologici.<sup>42</sup>

Nel caso della ipocolesterolemia di Campodimele questi indici possono essere necessari per individuare se la causa sia nell'assorbimento o nella sintesi di colesterolo.

Tra i geni coinvolti nella regolazione della colesterolemia quelli le cui varianti sono state associate a bassi livelli colesterolo LDL plasmatico sono: PCSK9, l'NPC1L1, l'MTP, l'ANXN-2A ed infine L'ANGPTL3. Il primo codifica per una proteina in grado di degradare il recettore delle LDL (LDL-r). L'espressione del recettore sulla superficie cellulare sembra infatti essere inversamente proporzionale all'attività di questa proteina.

Il secondo gene noto per essere associato ad una diminuzione del colesterolo plasmatico, l'NPC1L1, codifica per un trasportatore

intestinale del colesterolo introdotto con la dieta. Mutazioni loss of function in questo gene determinano una diminuzione dell'efficienza di assorbimento del colesterolo esogeno e sono epidemiologicamente associate ad una diminuzione della colesterolemia LDL di circa il 10%.

Il gene MTP (proteina microsomiale trasferente i trigliceridi) gioca un ruolo importante nell'assemblaggio epatico e nella secrezione delle lipoproteine VLDL, indispensabili per il trasporto plasmatico della vitamina E e di altri fattori liposolubili come le vitamine A e K.

Alcuni studi hanno dimostrato che la proteina Annexina A2 può inibire l'attività catalitica di Pcsk9 sul recettore delle LDL, attraverso il legame con il dominio C-terminale ricco in cisteine e istidine di Pcsk9 (CHRD). Il CHRD e il prosegmento forniscono integrità strutturale alla molecola del Pcsk9, permettendo così l'interazione del dominio catalitico con l'LDL recettore. Così, è stato supposto che il legame di AnxA2 al CHRD deve in qualche modo produrre cambiamenti allosterici alla struttura della subunità catalitica di Pcsk9, ostacolando la sua capacità di aumentare la degradazione del LDL-r.<sup>43</sup>

Recentemente è stato descritto da Musunuru *et al.* che il gene ANGPTL3 è il gene responsabile della Ipolipemia Familiare Combinata.<sup>29</sup>

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Reclutamento dei soggetti

In collaborazione con il Comune di Campodimele sono stati invitati allo screening 601 soggetti iscritti alle liste elettorali con età superiore ai 18 anni.

Tutti i soggetti partecipanti sono stati sottoposti ad una visita medica di base che includeva la misurazione di peso, altezza, circonferenza vita, circonferenza fianchi, pressione arteriosa e un elettrocardiogramma; inoltre ai soggetti è stato proposto un questionario strutturato per effettuare una prima stima degli eventuali fattori di rischio coronarico, della storia clinica, con particolare attenzione a malattie epatiche e cardiovascolari e dei farmaci utilizzati (incluse vitamine e supplementi dietetici).

Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato specifico per gli studi genetici. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico della Sapienza Università di Roma.

I soggetti hanno fornito tre campioni di sangue per un totale di 20 ml, utilizzati per estrarre DNA genomico e misurare le concentrazioni di lipidi plasmatici e un campione di urine di 50 ml. Il prelievo è stato effettuato in primo mattino dopo un digiuno

notturno di almeno 8 ore, secondo un protocollo standard.

Quindi sono stati costruiti gli alberi genealogici di tutte le famiglie disponibili.

### 3.2 Misurazioni lipidiche

I campioni di sangue sono stati raccolti in tubi contenenti EDTA e il plasma è stato ottenuto immediatamente tramite centrifugazione a 3000 rpm a 4°C per 10 minuti. Sono state effettuate delle aliquote a cui sono stati aggiunti EDTA (0,04%), NaN<sub>3</sub> (0,05%) e PMSF (0.015%), al fine di prevenire cambiamenti nelle lipoproteine e nei lipidi.

Un'aliquota è stata utilizzata per la determinazione dei livelli lipidici e di glucosio nel sangue, il resto è stato conservato a -80°C per misurazioni aggiuntive.

L'assetto lipidico, colesterolo totale (CT), trigliceridi (TG), colesterolo HDL (HDL-C), transaminasi glutamico-ossalacetica (GOT), transaminasi glutamico piruvica (GPT) e Apolipoproteina B (ApoB) e i livelli di glicemia e cretinina sono stati misurati enzimaticamente, tramite un analizzatore automatico *ILab 300 plus* (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA), da siero fresco. Il colesterolo LDL è stato

calcolato tramite la formula di Friedwald:  $LDL-C = CT - [HDL-C + (TG / 5)]$ .

### 3.3 Misurazione degli steroli non-colesterolo.

I markers di assorbimento del colesterolo, come colestano e gli steroli vegetali, campesterolo e sitosterolo, e i markers della sintesi del colesterolo, come lanosterolo e latosterolo e i precursori degli acidi biliari, 7 $\alpha$ -idrossicolesterolo, 24S e 27-idrossicolesterolo sono stati misurati mediante gas cromatografia e spettrometria di massa con elevata sensibilità e specificità utilizzando, come standard interni per la quantificazione degli steroli non-colesterolo, ossisteroli marcati radioattivamente con epicoprostanolo e ossisteroli marcati con deuterio per quantificare gli ossisteroli.<sup>44</sup>

I campioni per l'analisi degli steroli sono stati corsi su un gas-cromatografo Agilent HP 5890 –Agilent HP 5972 MSD quadropole spettrometro di massa che utilizza la modalità di ionizzazione a impatto di elettroni (Stockholm,Sweden). Due microlitri di ogni campione vengono iniettati nel gas-cromatografo tramite un campionatore

automatico. La temperatura dell'iniettore deve essere di 280°C durante tutta l'analisi. L'iniezione viene eseguita in modalità splitless. La separazione viene eseguita su una colonna capillare da 30m HP-5MS (Scantec Lab AB, Gothenburg, Sweden), utilizzando elio come gas carrier con una portata di 0,8 ml min<sup>-1</sup>. La temperatura iniziale di 180°C della colonna è mantenuta per 1 min, poi programmata ad un tasso di 20° C min<sup>-1</sup> fino a raggiungere i 250°C, portata a 300°C con una velocità di 4°C min<sup>-1</sup> e mantenuta a questa temperatura per 7 minuti, per un tempo di esecuzione totale di 24 min.

La variabilità di accuratezza e precisione intra-giorno e tra giorni per tutti gli analiti è inferiore al 4% dei rispettivi valori nominali e medi, rispettivamente. Le concentrazioni plasmatiche assolute degli steroli devono essere corrette per il colesterolo totale (TC) (steroli/TC) per tener conto delle differenze nei livelli di colesterolo plasmatico; il rapporto lathosterol/sitosterolo, indipendente dal colesterolo totale, che misura l'equilibrio della sintesi e l'assorbimento del colesterolo, è stato calcolato.

### 3.4 Studio familiare

All'interno degli alberi genealogici ricostruiti sono state individuate 9 famiglie non consanguinee, con fenotipo FHLB. (Figura 3).

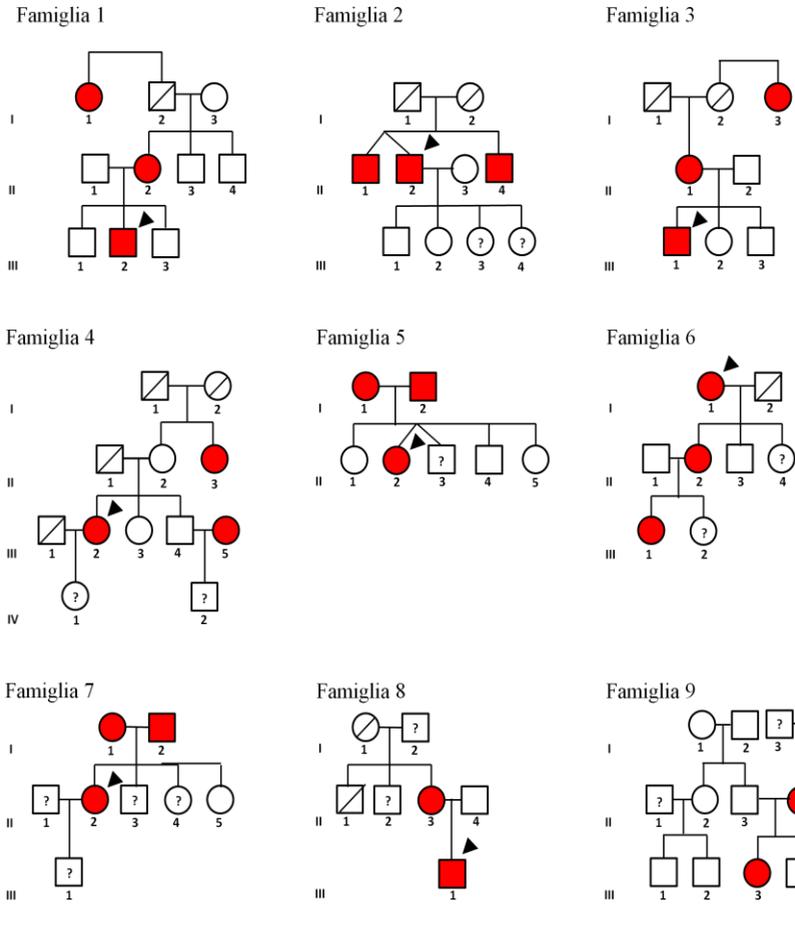
Nello studio familiare sono inclusi 52 individui: 9 probandi, 28 parenti di primo grado, 11 parenti di secondo grado, 4 coniugi. I criteri diagnostici utilizzati sono stati:

1. presenza di un caso indice con valori di LDL-C inferiori al 5° percentile sesso/ età specifico della popolazione generale,
2. presenza in famiglia di almeno un consanguineo con fenotipo FHLB, e
3. nessuna evidenza di cause secondarie di ipolipidemia.

### 3.5 Studio di popolazione

È stato analizzato l'assetto lipidico di 352 individui (58,5%) appartenenti al resto della popolazione non inclusi nelle 9 famiglie con fenotipo FHLB. Inoltre sono stati misurati gli steroli non colesterolo sierici in tutti i soggetti con le metodologie sopra descritte.

**Figura 3: Alberi genealogici delle famiglie selezionate**



○	femmina	/	deceduto	■	ipocolesterolemico
□	maschio	?	Non partecipante allo screening	▲	probando

I simboli quadrati indicano i soggetti maschi, e i simboli circolari i soggetti femmine. La barra diagonale indica persone decedute e le frecce i probandi. I numeri romani alla sinistra degli alberi genealogici mostrano la generazione e il numero arabo il alto a sinistra di ogni simbolo indicano il singolo componente della famiglia. Per il genotipo ANGPTL3 la X indica uno stop codon.

### 3.6 Estrazione di DNA Genomico da Buffy Coat.

Il buffy coat è stato isolato da sangue periferico tramite centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Un'aliquota di 300  $\mu$ l è stata utilizzata per l'estrazione del DNA genomico con il Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA).

Il protocollo prevede 4 fasi: lisi delle cellule, lisi dei nuclei, precipitazione delle proteine, concentrazione e precipitazione del DNA genomico.

In una provetta sterile da 1,5 ml per microcentrifuga si aggiungono 900 $\mu$ l di Cell Lysis Solution, quindi si trasferiscono 300  $\mu$ l di buffy coat e si mescola per inversione 4-5 volte. Per lisare i globuli rossi si lascia in incubazione per 10 minuti, invertendo la provetta due o tre volte durante l'incubazione. Si centrifuga poi per 20 secondi a 13.000 rpm a temperatura ambiente.

Viene rimosso più supernatante possibile, senza disturbare il pellet visibile. Quindi si risospende il pellet bianco vortexando vigorosamente e si ripete lo step precedente finché il pellet non risulta bianco.

A questo punto si aggiungono nel tubo contenente le cellule risospese 300µl di Nuclei Lysis Solution pipettando la soluzione 5-6 volte per lisare i globuli bianchi. Se nella soluzione sono visibili dei grumi si incuba la soluzione a 37°C in un bagnetto termostato, finché non saranno più visibili (circa un'ora).

Si aggiungono al lisato nucleare 100µl di Precipitation Solution, e si vortexa energicamente per 10-20 secondi, sono visibili dei grumi proteici.

Quindi si centrifuga per 3 minuti a 13.000 rpm a temperatura ambiente.

Il supernatante viene trasferito in provetta pulita sterile da 1,5 ml contenente 300µl di isopropanolo a temperatura ambiente. La soluzione viene mescolata tramite inversione della provetta fintantoché i filamenti bianchi di DNA non formano una massa visibile.

Si centrifuga per 1 minuto a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Il DNA è visibile come un piccolo pellet bianco. Si decanta il supernatante e si aggiungono 300 µl di etanolo al 70%. Per un migliore lavaggio del pellet e delle pareti si inverte la provetta 2-3 volte.

A questo punto si centrifuga come nel passaggio precedente. In questa fase il DNA è molto delicato, quindi con una pipetta Pasteur

in vetro, con la punta di diametro molto piccolo, si aspira con molta cura l'etanolo e si lascia asciugare all'aria per 10-15 minuti.

Il DNA viene reidratato con 200  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile incubando a 4°C overnight.

### 3.6 Genotipizzazione del polimorfismo dell'ApoE.

La genotipizzazione del polimorfismo dell'apoE è stata condotta tramite RFLP con enzima di restrizione HhaI .La miscela di reazione di PCR era così composta: 1  $\mu$ M di primer F4 con sequenza: 5'AGA ATT CGC CCC GGC CTG GTA CAC 3'; 1  $\mu$ M di primer F6 con sequenza: 5'TA AGC TTG GCA CGG CTG TCC AAG GA 3'; 1,5 di Taq Polymerase (GE Healthcare, Uppsala, Sweden); 200 $\mu$ M di dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA); 100 ng di DNA genomico; 6  $\mu$ l di Enhancer system (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA); H<sub>2</sub>O sterile fino ad un volume totale di 20  $\mu$ l.

Le condizioni di amplificazione in un termociclatore sono le seguenti:

- 94°C x 5'
  - 94°C x 30''
  - 53°C x 30''
  - 72°C x 30''
  - 72°C x 5'
  - 4°C x ∞
- } x 35 cicli

Il prodotto di PCR (231 bp) viene controllato su gel di agarosio al 2% con Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) all' 1X, contenente Bromuro di Etidio con concentrazione di 10µg/L. Dopo elettroforesi, il DNA è visibile con luce ultravioletta e fotografato con pellicola Polaroid 667.

10 µl di amplificato vengono digeriti con 0,5 U di enzima di restrizione HhaI (New England Biolabs, Ipswich, MA) per 3 ore a 37°C.

Il pattern di digestione viene analizzato tramite corsa elettroforetica del prodotto su gel di agarosio al 4% in TBE buffer in camera fredda a 4°C. Di seguito sono riportati i pattern di digestione dei possibili alleli:

- ε2: 91, 83, 38 e 19 bp;
- ε3: 91, 48, 38, 35 e 19 bp;
- ε4: 72, 48, 38,35 e 19 bp.

### 3.7 Amplificazione delle regioni esoniche e delle giunzioni introne-esone dei geni candidati.

I soggetti III2, II2, III1 e II2 appartenenti alle famiglie #1, #2, #3 e #5 rispettivamente, (Figura 3) sono stati screenati per le mutazioni nei geni MTP, PCSK9, NPC1L1, ANXA2 e ANGPTL3, geni descritti come candidati per causare ipocolesterolemia. Questi individui sono stati scelti perché presentano un pattern di ereditarietà dominante (III2#1, III1#3 e II2#5) o livelli di LDL-C molto bassi (II2#2 LDL-C 21mg/dl).

La reazione di amplificazione tramite PCR (Reazione a catena della Polimerasi) ha richiesto un volume finale di 20  $\mu$ l contenente dai 100 ai 200 ng di DNA genomico; 1,5 U di Taq DNA Polymerase (GE Healthcare, Uppsala, Sweden); 200 $\mu$ M di dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA); 0,5  $\mu$ M di primer forward e 0,5  $\mu$ M di primer reverse. I primers disegnati e le condizioni di amplificazione per ciascun gene sono descritti in tabella 2.

Il prodotto di PCR è stato controllato tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TBE buffer e successivamente purificato tramite

colonnine di purificazione Euro Gold PCR purification Kit (EuroClone, Milano, Italy). Ad ogni reazione di PCR viene aggiunto un egual volume di buffer XP1 e la miscela viene vortexata.

La soluzione viene pipettata all'interno di colonnine in cui è presente una membrana per cromatografia per affinità. Le colonnine sono poste in tubi di raccolta e centrifugate per 1 minuto a 10.000 g, per far aderire il DNA alla membrana. Il liquido di scarto viene eliminato. Quindi vengono aggiunti alle colonnine 650 µl di Washing Buffer (a cui sono stati aggiunti 80 ml di etanolo puro per un volume totale di 100 ml) e centrifugate per 1 minuto a 10.000 g. Il liquido presente nei tubi viene eliminato e viene effettuato un secondo lavaggio con 650 µl di Washing Buffer.

Tabella 3 : Primers e condizioni di amplificazione.

Gene	Eso ne	Primers	Condizioni di amplificazione
MTP	1	5' GAACTTAGGTCCTGATTTG 3' 5' CTCITTCACIATTCACTCACAC 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' } x 36 cicli 55°C x 40'' 72°C x 40'' 72°C x 10' 4°C x ∞
	2	5' CACTGTGGTAGAGAGATGC 3' 5' ATAGAAGCTGCTTGTTTAGTG 3'	
	17	5' TTAAGTGTTCCTCCAGTC 3' 5' ATCTCCAGAATCAAATGAAC 3'	
	3	5' TAAAGTGAGTGGCAAGGTCC 3' 5' CAGGGCATGATTCAGITTG 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' } x 15 cicli 58°C x 40'' 72°C x 40'' 94°C x 40'' } x 21 cicli 60°C x 40'' 72°C x 40'' 72°C x 10' 4°C x ∞
	4	5' TCTCCCTAAACTTCATATTCTG 3' 5' GTCARCITTTCTGAGCATTACC 3'	
	5-6	5' AACCTTGTTCTGTCTTTGTATC 3' 5' TCTCAGAAGCTATCCCATG 3'	
	7	5' GCITTCAGTTACCTCTGGAG 3' 5' GAATGAGTTGATGCTTTCAC 3'	
	8	5' GACACAAGGGACATTTTATCC 3' 5' CACTGTGGCATAACTTTCCG 3'	
	9	5' AGAAACTCTGTAATGGTAGAG 3' 5' TACGAAAAAGGCACTAAGT 3'	
	10	5' GCAAATGTGTAAGTGTCAC 3' 5' GTAAAGAGAATTAGGAGTGCC 3'	
15	5' TTTAAGTTTTGGCCCCTTGAG 3' 5' AACATTTTCTTTTGCCTCC 3'		
11	5' ACTGTTTGCITTTATCCAC 3' 5' AATACAGAGTGACTTGAGCG 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' } x 15 cicli 56°C x 40'' 72°C x 40'' 94°C x 40'' } x 21 cicli 58°C x 40'' 72°C x 40'' 72°C x 10' 4°C x ∞	
12	5' CCAAATCACAAAGGAATCTG 3' 5' TAACCCTGCATAATGACCAC 3'		
13-14	5' CTAATCCTGATGCTACCACG 3' 5' TGACAGAAGCCACCATTAAAC 3'		
16	5' ATTATCTACAGCAGGAGGTC 3' 5' TAAITCCAATAGAAAGCATAG 3'		
18	5' ACACTCATATCCTTTCTCAG 3' 5' AGGTAATATGTAACGCTG 3'		
PCSK9	1		5' CTCGGTGGCGTATCTGC 3' 5' ACATGGGGGAAACTGAGG 3'
9	5' AAGATTTCTGTGGAGGTCCC 3' 5' AGCTGGAGTCTGGAGGATG 3'		
7	5' TCTCTGGGCTCCTTTCTC 3' 5' CCAICAGGCCTACTTCATC 3'		
2	5' GGTTTGCTGGGTTTCTCC 3' 5' TTCTGATTTTCAGCAATGGG 3'		
10	5' TAGTCCCTTTCTGTGTTTC 3' 5' AGICTCATGGATCACACTTG 3'		

	3	5' GGTTTGCTGGGTTTCTCC 3' 5' TGTTTGCTGCTGTCCAAATG 3'	94°C x 5'
	4	5' ACTTTATGCTCATCCCTCC 3' 5' GAGTACAGCTGCAACGCTC 3'	94°C x 40'' 58°C x 40'' } x 15 cicli
	5	5' GATTTGTTATAGGGTGGAGG 3' 5' GGTCAGATGGAGAGAGAC 3'	72°C x 40'' 94°C x 40'' 60°C x 40'' } x 21 cicli
	6	5' CATCACTCTGTGCCTGTAAG 3' 5' CTGACGACTCCTCCAAAG 3'	72°C x 40'' 72°C x 10'
	8	5' CGTGTGTTTGTGTATGTG 3' 5' AGAAGGGAGAGACTGTCAAG 3'	4°C x ∞
	11	5' AGAGGGTCTGATGGGGATG 3' 5' AAAGCTGTGCAGGAGAGACAC 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' 62°C x 40'' 72°C x 40'' } x 36 cicli 72°C x 10' 4°C x ∞
NPC1L1	1	5' CTAGCACCTGCGTGATGAG 3' 5' GTGCATTCAAGCCTGTAACC 3'	94°C x 5' 94°C x 40''
	2C	5' AGCCTTTCATCAATGTGAC 3' 5' TGACAGATAGCACCAAGATG 3'	58°C x 40'' 72°C x 40'' } x 15 cicli
	4-5	5' GTGGGGTGTAGGAGGTAAG 3' 5' TCTGAGGTGCTGTGGTTAG 3'	94°C x 40'' 60°C x 40'' 72°C x 40'' } x 21 cicli
	20	5' GAACATAGTGACCCTGGAAG 3' 5' AAGATCCCCATAACCCTTTG 3'	72°C x 10' 4°C x ∞
	2A	5' GCCTTCCAGCATGACTTTC 3' 5' CGTCACCTGGGACTCAITG 3'	
	2B	5' CAGGGAGACACAGGCAATGG 3' 5' GGACGAGGGGCAGAGATAATC 3'	
	3	5' GCTCACCCCTCCATAGTGCTG 3' 5' TGGTTCCTGCCCAATACTG 3'	
	6	5' GAGGGGCTTTAATGTGAGATG 3' 5' ATGGTAGAGGCAGGATGAAGTC 3'	94°C x 5'
	7-8	5' ATCAGGAAGGTCAGAGCAGC 3' 5' TCTCTGTGGTAAAGCCAC 3'	94°C x 40'' 60°C x 40'' 72°C x 40'' } x 15 cicli
	9-10	5' CAGCACACTGGTATGTCCTC 3' 5' GGTGCCTCCAGAGTAATGAAC 3'	94°C x 40'' 62°C x 40'' 72°C x 40'' } x 21 cicli
	11-12	5' TGTACCTCTGTGTACCTTCG 3' 5' CCTCTCCAGTCTCTCCTTTC 3'	72°C x 10' 4°C x ∞
	13-14	5' CTCCACAAATGACAAATGC 3' 5' CAGTGAGAACCTCCTGACAAAG 3'	
	15	5' CACCTATGTAGCACTATTGTTTC 3' 5' ATACAAAAATAGCTGAGCATAG 3'	
	16-17	5' TCTCTGTAGGCTTCACTCATC 3' 5' TAGTCTGGCTACTTTGGAG 3'	
	18-19	5' CCTCATCTCCCTAGTTCCTTC 3' 5' ATGGTCATAGTCTGGCTTC 3'	

ANXA2	1	5' GTGAGTCACCCCTGACTTGG 3' 5' CCTCCCCAAAGACTCTCCAG 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' 62°C x 40'' 72°C x 40'' 72°C x 10' 4°C x ∞	} x 36 cicli
	7	5' AGAAAGCAGGATGCTAACAGAC 3' 5' AGGTGAAGGAGAGAAACTTGG 3'		
	8	5' CTCAGAGTCTTAGTGGGAAATG 3' 5' GGGGATTAGTTAATCACTCC 3'		
	4	5' GGAAAACATATTAGGCATTG 3' 5' GGGAGAATAAAGAGACAACC 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' 56°C x 40'' 72°C x 40'' 72°C x 10' 4°C x ∞	} x 36 cicli
	13	5' AAAGTTTTGGATTTGGAGC 3' 5' GCCACTCTGTCATCATTCTG 3'		
	6	5' CCTTATGATTCCTGTTATC 3' 5' CCAAATTACACTCAGAAAGC 3'		
	10	5' CTGTGCCTAAGGAAGACTG 3' 5' AGAATGGGAGAGAAAGGTG 3'		
	14	5' TGTGCGTTGAGGCTACTTC 3' 5' AATGAGGTTGGGGTAATG 3'		
	2	5' GCTTGCCACACTTCTACAG 3' 5' GCAGGTGCTAAATCAACTTG 3'		
	3	5' TGAGGTTTAGTTTTACAGTCG 3' 5' ATGTCCCATCTTCCTTAG 3'	94°C x 5' 94°C x 40'' 58°C x 40'' 72°C x 40'' 72°C x 10' 4°C x ∞	} x 36 cicli
	5	5' GTAGAGGATGCTGACGAAAG 3' 5' AAGAAAAGCAATGTCTGAGG 3'		
	9	5' CCCATCTATGTTCAAAGTAAG 3' 5' GTTTAAGCCACAGAGTTTG 3'		
	11-12	5' CATTGAGGACAGGTGGTATG 3' 5' GAAAAGCTGAGTGTGGAAC 3'		

Dopo aver eliminato di nuovo la soluzione di lavaggio, si centrifuga a 10.000 g per un minuto per eliminare completamente ogni traccia di etanolo. A questo punto le colonnine vengono poste all'interno di tubi di raccolta da 1,5 ml puliti e sterili e vengono aggiunti 20 µl di Elution Buffer nel centro della membrana. Per ottenere migliori risultati si incuba un minuto a

temperatura ambiente e successivamente si centrifuga un minuto a 5.000g.

### 3.7 Sequenziamento diretto degli ampliconi

Gli ampliconi ottenuti tramite PCR sono stati sequenziati sia nel filamento forward che nel filamento reverse e analizzati con un sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), utilizzando il Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

In tubi da 0,2 ml si miscelano 2,5  $\mu$ l di Big Terminator, 2,5  $\mu$ l di Big Dye Sequencing Buffer, 20 ng di prodotto purificato, 1,1  $\mu$ l di primer 2 $\mu$ M e H<sub>2</sub>O fino a volume di 12  $\mu$ l.

Le condizioni di reazione di sequenziamento tramite termociclatore GeneAmp® PCR System 9700 sono:

96°C x 1'	} x 25 cicli
96°C x 10''	
50°C x 5''	
60°C x 4'	
4°C x $\infty$ .	

I campioni prima di essere sequenziati devono essere purificati. La procedura di purificazione risulta essere molto importante per ottenere un elettroferogramma di alta qualità. In questo caso i campioni vengono purificati con colonnine Illustra Microspin G-50 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), contenenti resina Sephadex™ G-50 DNA-grade. Le molecole più grandi dei pori della Sephadex sono esclusi dal gel ed eluiscono per prime mentre le molecole di dimensioni intermedie penetrano nella matrice in varia misura, a seconda della loro dimensione e della resina utilizzata. Molecole molto piccole eluiscono per ultime.

Le colonne prima dell'utilizzo devono essere preparate. Si procede risospendendo la resina vortexando la colonna, poi svitando il tappo di un quarto di giro e la chiusura sul fondo. Quindi si pone la colonna in tubo di raccolta da 2 ml e si centrifuga 1 minuto a 2000 giri. La colonnina deve essere inserita in tubo da centrifuga DNAsi-free da 1,5 ml e il prodotto viene applicato molto lentamente al centro della resina facendo molta attenzione a non toccarla con il puntale della pipetta. Si centrifuga per 2 minuti a 2000 giri. Il campione purificato si concentra sul fondo della provetta.

In tubi per sequenza da 0,5 ml si mescolano 15 µl di Hi-Di Formamide (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) con 5 µl di purificato e si denatura per 2 minuti a 96°C. Dopo il ciclo di denaturazione si raffreddano velocemente i campioni in ghiaccio per poi caricarli nel sequenziatore automatico AB 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

In questo caso il sequenziatore 310 Genetic Analyzer separa frammenti di DNA usando il polimero POP 4™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) attraverso elettroforesi capillare. Il capillare utilizzato ha una lunghezza di 47 cm e un diametro di 50 µm.

### 3.8 Misurazione dei livelli sierici della proteina Angiopietina-like3.

I livelli di Angiopietina-like 3 (Angptl3) nel siero sono stati determinate un metodo ELISA già descritto da Robciuc *et al.*

Come anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio contro una Angptl3 (aa 17-223) (BioVendor, Repubblica

Ceca) e come un anticorpo di riconoscimento, una IgG biotinilato di pecora contro Angptl3 ricombinante umana (aa 17-460) (Rnd Systems, Minneapolis, MN). L'anticorpo primario è stato utilizzato per rivestire piastre da 96 pozzetti, 100µl/pozzetto (1 µg/ml in PBS) overnight a 4 ° C. La piastra è stata lavata quattro volte con PBS-Tw (50 mM di potassio fosfato 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) con una Wellwash AC (Thermo scientific c).

I siti di legame aspecifici sono stati bloccati con 300 µl/pozzetto di BSA 0,5% (w/v) in PBS per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo l'aspirazione, i campioni e gli standard sono stati diluiti con TBS (0,05 mM Tris-HCl, 0,15 mM NaCl, pH 7,6 contenente 0,1% BSA (w/v) e Tween 20 allo 0,1%) e sono stati predisposti in duplicato (100 µl/pozzetto). La piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo aver lavato quattro volte con 350 µl/pozzetto di PBS-Tw, è stato aggiunto l'anticorpo di rilevazione 100µl/pozzetto (0,2 µg/ml) e la piastra è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Seguono quattro lavaggi, streptavidina-HRP (streptavidina coniugato con rafano-perossidasi), diluita 1:200 in PBS, BSA 1% (w/v) è stato aggiunto (100 µl/pozzetto) e la piastra è stata incubata per

30 min a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio è stato aggiunto il substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) substrato (Sigma) (100 $\mu$ L/pozzetto) ed la piastra incubata per altri 4-6 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata con acido solforico 1 N, 100  $\mu$ L/pozzetto. Il colore sviluppato viene determinato con la lettura della piastra sul lettore Plate Reader Das (Das srl, Palombara Sabina, Italy) alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Gli standard sono preparati a concentrazioni di 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 ng/ml. Per la standardizzazione, abbiamo utilizzato un siero umano quantificato per l'Angptl3 con un kit disponibile in commercio da BioVendor (BioVendor, Repubblica Ceca seguendo le istruzioni del produttore. Il siero standardizzato è stato conservato a -80 ° C in piccole aliquote e per ogni misura una nuova aliquota è scongelata. I campioni di siero sono diluiti 50 volte. La curva standard è costruita tracciando la concentrazione (X) degli standard contro l'assorbanza media (Y) degli standard a 450 nm. Per calcolare la concentrazione del campione e adattarsi agli standars, viene utilizzata un'equazione polinomiale di secondo grado.

### 3.9 Profilo lipoproteico tramite Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

Sono state applicate ad una colonna per gel filtrazione Superose 6HR (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) aliquote di 100  $\mu$ l di siero ad un tasso di flusso di 0,3 ml/min in PBS contenente di EDTA 1mM. Dopo 20 minuti sono state raccolte 22 frazioni di 0,6 ml. Sulle frazioni sono state misurate le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi.

### 3.10 Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche di base sono state effettuate con il programma SPSS/WIN (SPSS, Chicago, IL). Il test  $\chi^2$  o di Fisher sono stati utilizzati per confrontare le differenze tra le variabili categoriche, mentre quelli tra le variabili continue sono state determinate mediante il *t* test di Student. I livelli di lipidi e lipoproteine tra mutati e non-carriers sono stati confrontati con il test Mann-Whitney. L'effetto dei genotipi mutanti sui lipidi plasmatici è stato valutato calcolando i residui dopo un aggiustamento per età, sesso e BMI. I soggetti non portatori della popolazione di

Campodimele sono stati utilizzati per calcolare i coefficienti di regressione. Tutti i dati sono presentati come media  $\pm$  DS. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## RISULTATI

## 4.1 Caratteristiche cliniche delle popolazione generale di Campodimele.

All'interno della popolazione residente a Campodimele sono stati reclutati 403 soggetti (189 maschi e 214 femmine) con un range di età compresa tra i 18 e i 96 anni.

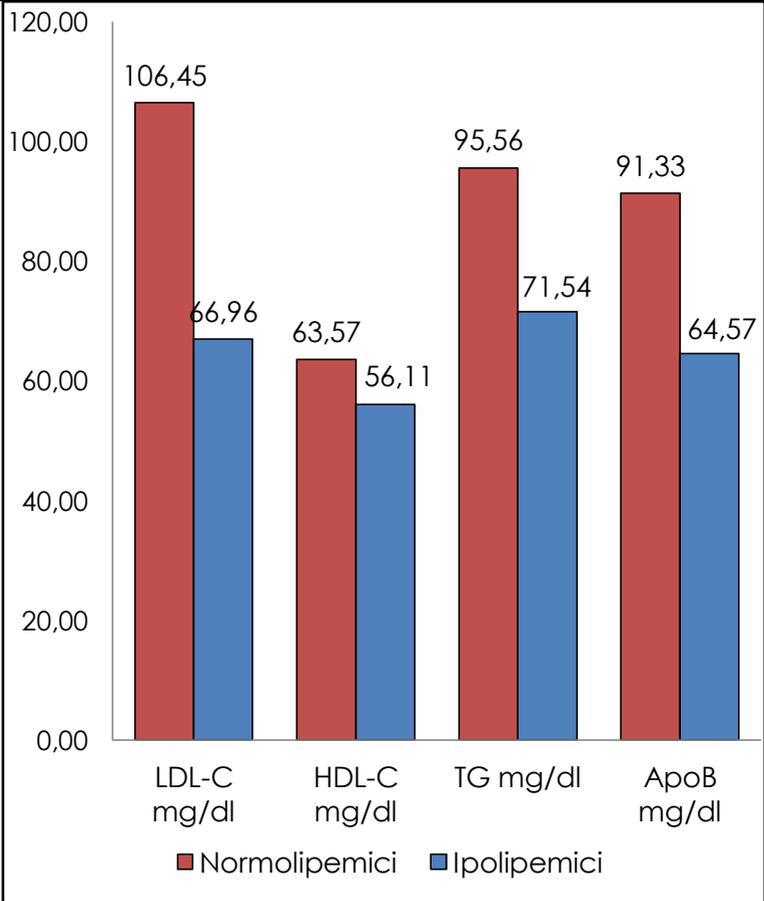
Le medie delle caratteristiche clinico-cliniche dei soggetti sono riassunte in tabella 4. Da una prima analisi su questi dati si evince che i livelli medi di colesterolo ma soprattutto di LDL-C sono al di sotto della media della popolazione generale italiana. Sono stati individuati 69 soggetti (16,3%) ipocolesterolemici (colesterolemia totale inferiore al 5° percentile sesso età specifico) di cui 36 femmine (54,5%) e 30 maschi (45,5%). (tabella 4)

Le analisi statistiche effettuate su questo primo gruppo di risultati hanno mostrato una elevata significatività nei livelli di tutti i lipidi tra normolipemici e ipolipemici come mostrato in figura 4.

*Tabella 4: Caratteristiche chimico cliniche dei residenti di Campodimele*

	Maschi	Femmine
Età	53.7 ± 21.3	63.3 ± 19.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 ± 3.7	28.6 ± 5.5
Circ. vita (cm)	91.2 ± 12.4	91.9 ± 14.0
Circ. fianchi (cm)	98.6 ± 8.5	103.9 ± 13.4
PAS (mmHg)	131.5 ± 17.4	134.3 ± 23.9
PAD (mmHg)	80.3 ± 8.4	80.5 ± 11.9
Colesterolo totale (mg/dl)	128.8 ± 20.2	139.6 ± 22.4
Colesterolo HDL (mg/dl)	51.2 ± 11.3	56.7 ± 18.7
Trigliceridi (mg/dl)	57.5 ± 31.8	66.9 ± 48.3
Colesterolo LDL (mg/dl)	66.1 ± 16.5	69.5 ± 18.1
Creatinina (mg/dl)	1.14 ± 0.18	1.08 ± 0.13
Glicemia (mg/dl)	104.1 ± 39.2	98.3 ± 22.8
GOT (UI/l)	36.4 ± 26.1	31.2 ± 9.4
GPT (UI/l)	37.0 ± 24.6	28.5 ± 12.2

Figura 4: Confronto dei lipidi sierici tra Normolipemici e Ipolipemici.



## 4.2 Rapporti steroli non-colesterolo tra ipocolesterolemici e normolipemici.

Le misurazioni tramite gas cromatografia degli steroli non-colesterolo potevano far individuare se il causa della ipocolesterolemia di Campodimele poteva risiede in un difetto nella sintesi o nell'assorbimento del colesterolo.

Le analisi statistiche effettuate tra ipocolesterolemici e normocolesterolemici hanno portato ad una conclusione non chiara come mostrato in tabella 5. Infatti si ha un significatività ( $p < 0.0001$ ) solo a livello delle concentrazioni del diidrolanosterolo, facendo ipotizzare un difetto nella sintesi del colesterolo.

*Tabella5: Steroli non-colesterolo in Ipocolesterolemici vs. Normocolesterolemici*

	Markers	Soggetti Ipocolesterolemici	Controlli	p
Assorbimento del colesterolo	Colestanolo	1.13 ± 0.65	1.24 ± 0.60	0.231
	Campesterolo	1.13 ± 0.65	1.24 ± 0.61	0.231
	Sitosterolo	1.49 ± 0.74	1.58 ± 0.74	0.555
	Brassicasterolo	0.039 ± 0.02	0.045 ± 0.03	0.179
	Stigmasterolo	0.043 ± 0.02	0.047 ± 0.02	0.922
	Avenasterolo	13.37 ± 6.94	13.25 ± 5.98	0.722
	Sistesi del colesterolo	Lanosterolo	0.15 ± 0.06	0.14 ± 0.08
Desmosterolo		0.85 ± 0.23	0.87 ± 0.32	0.860
Latosterolo		1.14 ± 0.46	1.25 ± 0.72	0.442
Diidrolanosterolo		0.13 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.0001

### 4.3 Genotipizzazione del polimorfismo dell'ApoE

Il polimorfismo dell'ApoE è stato genotipizzato in tutta la popolazione generale. L'86,8 % del campione totale mostra un genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , il 6,2% mostra un genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 2$  o  $\epsilon 3/\epsilon 4$ , tre soggetti (0,2%) mostrano un genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$  e  $\epsilon 2/\epsilon 4$  rispettivamente. Nel sottogruppo dei soggetti ipocolesterolemici non si hanno evidenze significative per affermare che i ridotti livelli lipidici siano dovuti agli alleli dell'ApoE.

Infatti il 71% mostra genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , il 21% ha il  $\epsilon 3/\epsilon 2$ , il 6% è  $\epsilon 4/\epsilon 3$  e l'1,5% ha genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  (un solo soggetto). In figura 5 sono riportati in dati sopra descritti.

### 4.4 Studio familiare

Nove individui ipocolesterolemici fanno parte di nove famiglie selezionate poiché rispecchiavano i criteri diagnostici di inclusione nello studio familiare:

1. presenza di un caso indice con valori di LDL-C inferiori al 5° percentile sesso/ età specifico della popolazione generale,
2. presenza in famiglia di almeno un consanguineo con fenotipo FHLB, e

3. nessuna evidenza di cause secondarie di ipolipidemia.

Le caratteristiche biochimico-cliniche di questi soggetti sono riportate in tabella 6.

Figura 5: Distribuzione del genotipo dell'ApoE nella popolazione generale di Campodimele e nel sottogruppo degli ipocolesterolemici

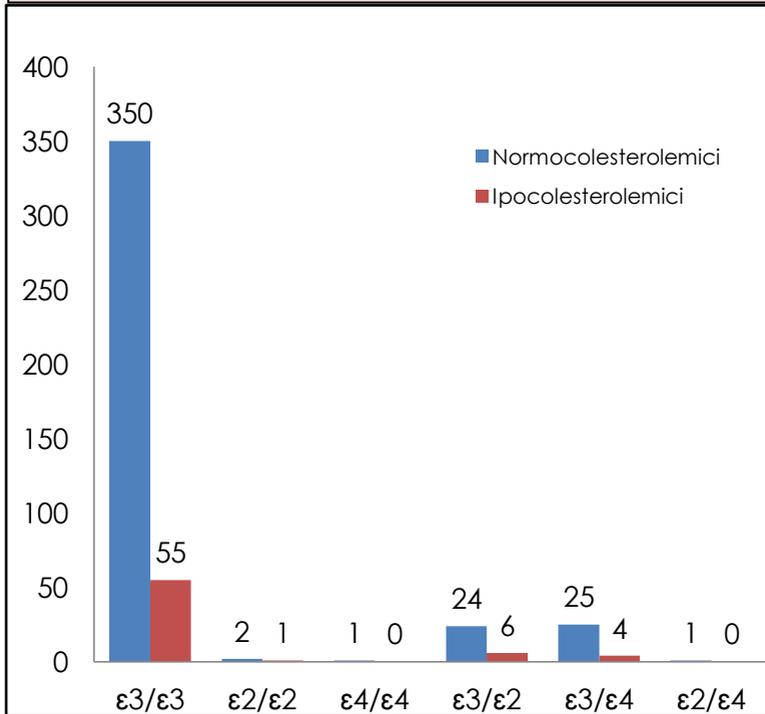


Tabella 6: Caratteristiche biochimico-cliniche dei soggetti appartenenti alla famiglie											
soggetto	età	BMI	TC mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	TG mg/dl	GOT UI/L	GPT UI/L	ApoB mg/dl	Creat mg/dl	Gluc. mg/dl
#1-I1	89	23,8	139	53	76	51	31	31	91	1,05	94
#1-I3	81	32,3	202	65	125	58	34	29	99	1,43	111
#1-II1	61	25,8	219	48	162	46	33	25	96	1,14	100
#1-II2	55	33,3	159	52	95	58	32	28	73	1,2	89
#1-II3	53	26,5	211	55	140	81	24	39	113	1,28	132
#1-II4	49	25,4	235	66	159	51	32	34	97	1,30	115
#1-III1	25	27,5	151	47	90	68	27	27	79	1,38	90
#1-III2	23	24,8	101	35	60	32	28	36	48	1,53	81
#1-III3	21	27,1	136	48	81	36	24	24	62	1,35	97
#2-II1	54	nd	109	43	57	44	37	44	59	0,82	66
#2-II2	54	27,7	72	45	21	31	35	38	28	1,18	86
#2-II3	46	nd	258	71	155	158	22	11	121	0,73	78
#2-II4	57	25,5	84	30	47	36	33	36	49	1,02	81
#2-III1	22	22,5	151	53	86	60	17	12	80	0,78	72
#2-III2	20	21,6	144	59	73	61	40	38	63	1,19	82
#3-I3	85	nd	88	35	41	58	21	18	48	0,60	72
#3-II1	60	28,6	136*	52	70*	71	28	41	70	1,44	111
#3-II2	57	33,3	140	51	79	52	25	17	87	0,91	117
#3-III1	30	26,3	118	47	63	39	26	29	78	1,26	101
#3-III2	28	25,5	131	63	56	61	27	28	55	1,12	98
#3-III3	21	27,7	129	52	63	70	31	22	75	1,25	92
#4-II2	76	21,4	228	48	165	75	28	22	108	1,23	107
#4-II3	78	30,6	99	27	64	40	26	16	51	1,18	95
#4-III2	49	28,6	90	27	58	24	29	38	51	1,20	87
#4-III4	41	25,6	243	40	187	81	33	45	123	1,10	86

Tabella 6: continua											
soggetto	età	BMI	TC mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	TG mg/dl	GOT UI/L	GPT UI/L	ApoB mg/dl	Creat mg/dl	Gluc. mg/dl
#4-III4	41	25,6	243	40	187	81	33	45	123	1,10	86
#4-III5	38	25,0	139	69	63	35	22	19	54	1,16	82
#5-I1	54	24,9	176	71	97	40	31	34	82	0,93	78
#5-I2	66	nd	139	44	82	67	27	41	77	1,08	98
#5-II1	29	23,2	131	47	74	48	31	35	61	0,88	83
#5-II2	27	19,3	82	34	42	31	23	27	39	0,98	83
#5-II4	37	24,6	185	50	121	69	30	33	99	1,27	84
#5-II5	35	20,9	183	80	93	49	52	20	76	0,87	78
#6-I1	81	29,5	164	50	98	82	32	22	79	0,94	93
#6-II1	70	24,6	193	51	131	57	26	26	74	1,20	83
#6-II2	60	32,4	231	50	170	56	19	35	102	0,99	82
#6-II3	57	26,2	181	54	114	66	25	31	76	1,48	99
#6-III1	36	25,4	193	63	119	56	28	34	83	1,20	82
#7-I1	63	35,1	161	65	83	64	18	12	69	0,99	92
#7-I2	63	28,3	143	67	68	40	29	15	72	1,01	105
#7-II2	41	25,0	204	73	114	85	18	13	111	0,81	82
#7-II5	37	23,9	144	79	56	47	30	34	56	1,03	89
#8-II3	43	nd	140	47	85	38	21	20	56	1,05	89
#8-II4	49	29,4	180	57	107	81	24	32	129	1,28	106
#8-III1	19	45,1	127	49	65	63	35	73	53	1,39	93
#9-I1	78	33,8	174	60	86	139	31	30	71	0,94	99
#9-I4	76	34,8	203	45	137	107	30	39	131	1,02	172
#9-II2	52	36,6	190	68	103	97	22	13	88	1,03	102
#9-II3	48	28,0	187	43	125	95	34	40	114	1,00	100
#9-II4	40	25,0	141	40	94	33	24	24	82	1,03	108
#9-III1	26	31,2	198	52	110	180	27	22	105	0,95	91
#9-III2	26	27,5	204	43	116	225	47	63	121	1,07	109
#9-III3	22	22,2	139	52	76	53	24	20	73	1,09	88

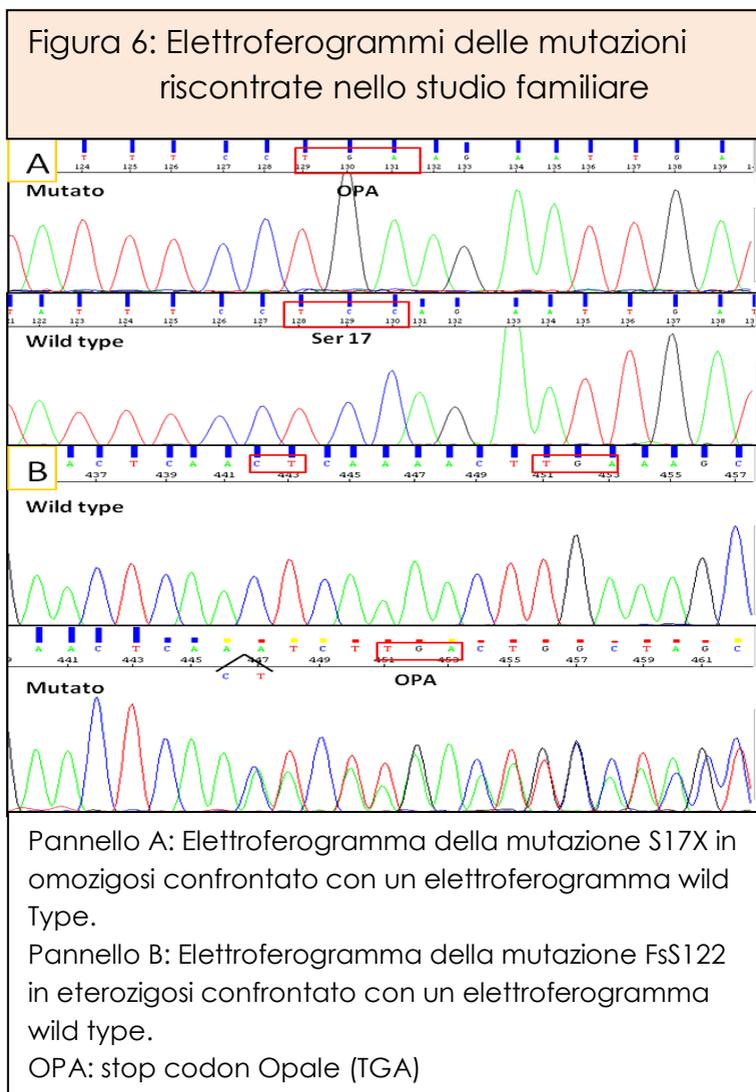
Ventitré membri delle famiglie sono stati classificati come ipocolesterolemici (LDL-C medio  $71,7 \pm 23,43$  mg/dl) e 29 come normocolesterolemici (LDL-C medio  $113,6 \pm 36,3$  mg/dl).

Confrontati con i normocolesterolemici, gli ipocolesterolemici hanno un'età più elevata ( $45,7 \pm 19,7$  vs.  $50,9 \pm 20,7$  anni, rispettivamente;  $p=0,311$ ) e presentano ridotti livelli plasmatici di HDL-C ( $55,89 \pm 10,80$  vs.  $47,74 \pm 13,30$  mg dl, rispettivamente;  $p=0,027$ ) e di trigliceridi ( $80,80 \pm 44,61$  vs.  $48,35 \pm 16,45$  mg/dl, rispettivamente;  $p<0,001$ ).

Lo screening dei geni MTP, PCSK9, NPC1L1 e ANXA2 nei soggetti III2, II2, III1 e II2 appartenenti alle famiglie #1, #2, #3 e #5 rispettivamente, (*figura3*) ha individuato variazioni di sequenza non-sinonime note, ma nessuna di queste segregava con il fenotipo ipocolesterolemico all'interno delle famiglie, permettendo così la loro esclusione come mutazioni causali del fenotipo FHLB.

Di contro, lo screening del gene ANGPTL3 ha portato all'identificazione, di un cambiamento di due paia di basi al nucleotide 50 (c.50 CC>GA) dell'esone 1 in tutti i probandi (7 eterozigoti e 2 omozigoti) (*Figura 6A*). Questa variante introduce una mutazione non-

senso al codone 17 (S17X). All'interno delle nove famiglie sono stati individuati 20 ulteriori individui portatori della mutazione S17X (4 omozigoti e 16 eterozigoti) (Figura 7).



è stata riscontrata una diversa variazione: una delezione di due paia di basi (c.363del CT) nell'esone 1.

Questa mutazione è presente in condizione di eterozigosi e produce un frame-shift al codone 122 (FsS122) (figura 6B). Sfortunatamente, non è stato possibile determinare la segregazione di questa variante con il tratto fenotipico, poichè non è stato reclutato suo figlio di 10 anni.

In conclusione all'interno delle famiglie sono stati individuati:

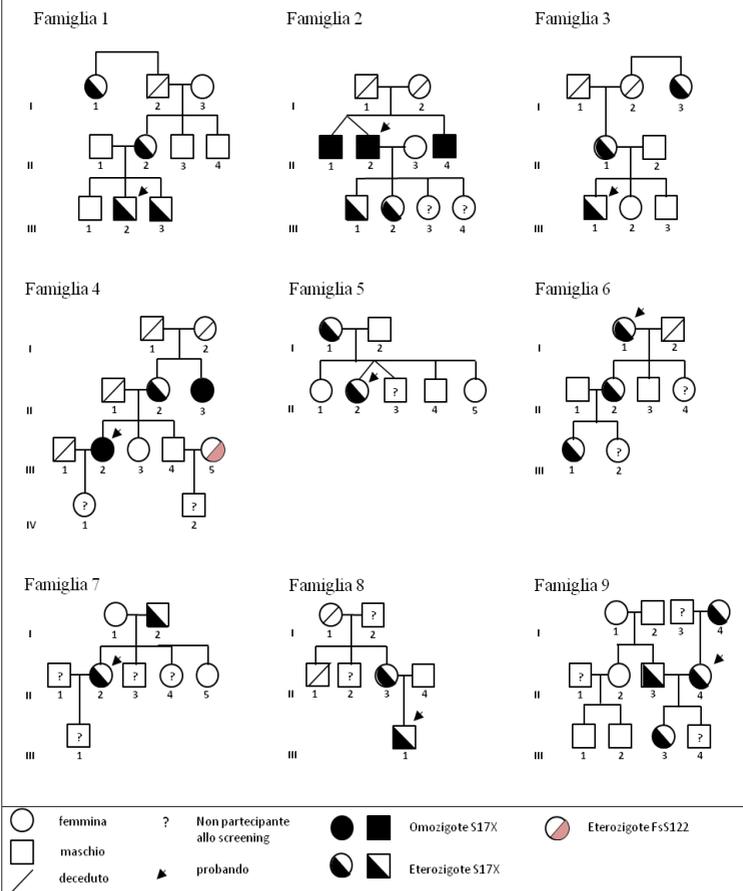
6 omozigoti per la mutazione S17X,  
24 eterozigoti per la mutazione S17X,  
1 eterozigote per la mutazione FsS122. (figura 7)

Confrontati con non-carriers ed eterozigoti, gli omozigoti ANGPTL3 tendono ad avere un età più avanzata e mostrano livelli plasmatici ridotti di colesterolo totale (-50%), LDL-C (-55,6%), Apob (-43,4%), trigliceridi - 53,5%) e HDL-C (-39,5%). Si è notato inoltre una interessante diminuzione di Glucosio rispetto ai non-carriers ( $p < 0,005$ ). Al contrario, le concentrazioni di proteine plasmatiche dei soggetti eterozigoti appartenenti alle nove famiglie, non mostrano differenze significative in confronto ai soggetti non carriers.

Con l'eccezione di un solo individuo, (Famiglia #4, III5) che ha genotipo dell'apoE ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ), tutti i membri delle famiglie hanno genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ .

Non si hanno differenze nel consumo di alcolici, mentre dal questionario compilato dai soggetti, si evidenzia una prevalenza di patologie epatiche o fattori di rischi cardiovascolari classici e transaminasi sieriche tra carriers e non carriers delle varianti del gene ANGPTL3.

Figura 7: Alberi genealogici delle famiglie con genotipo ANGPTL3



I simboli quadrati indicano i soggetti maschi, e i simboli circolari i soggetti femmine. La barra diagonale indica persone decedute e le frecce i probandi.

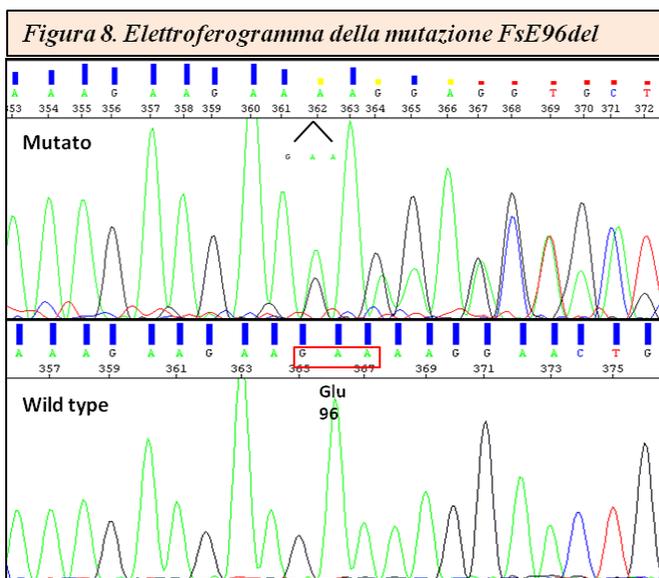
I numeri romani alla sinistra degli alberi genealogici mostrano la generazione e il numero arabo il alto a sinistra di ogni simbolo indicano il singolo componente della famiglia.

Per il genotipo ANGPTL3 la X indica uno stop codon.

## 4.5 Studio della popolazione

Nella popolazione restante sono stati individuati 46 soggetti (13,1%) ipocolesterolemici ( LDL-C  $66,80 \pm 16,60$  mg/dl). Questi individui confrontati con i normocolesterolemici presentavano bassi livelli di HDL-C ( $p=0,01$ ) e di TG ( $p<0.001$ ).

Il sequenziamento del gene ANGPTL3 nei soggetti ipocolesterolemici ha portato all'identificazione di 6 carriers della mutazione S17X (4 eterozigoti e 2 omozigoti) e un carriers in eterozigosi di una mutazione nuova sull'esone 1 causata dalla delezione di tre nucleotidi alla posizione 286 (c.286del GAA). Questa mutazione produce la delezione dell'aminoacido alla posizione 96. (FsE96del). Sfortunatamente, non si può stabilire la cosegregazione fenotipica dei livelli lipidici con il genotipo all'interno della famiglia dell'individuo portatore dell'allele (*figura 8*). Comunque un'analisi con il programma PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) ha indicato una qualsiasi variante in quella posizione aminoacidica come "possibly damaging".



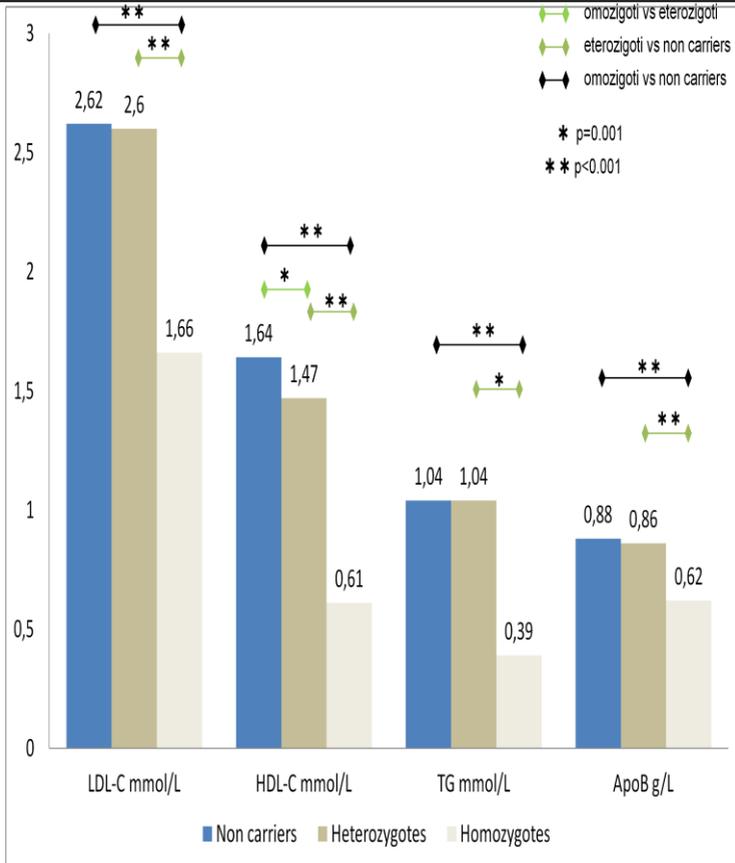
Per quanto riguarda i restanti 39 soggetti ipocolesterolemici non sono state individuate mutazioni del gene ANGPTL3.

Dall'analisi svolta sulle nove famiglie era emerso che i carriers eterozigoti potevano mostrare livelli lipidi plasmatici nella norma, quindi la soluzione di screenare tramite sequenziamento tutta la popolazione ha portato all'individuazione di ulteriori 26 individui eterozigoti per la mutazione S17X.

In conclusione nella popolazione non appartenente alle famiglie scelte sono stati individuati 33 carriers della mutazione S17X (31 eterozigoti e 2 omozigoti) e un carrier eterozigote della mutazione FsE96del.

Il risultato del confronto statistico tra carriers (omozigoti ed eterozigoti) e non-carriers è molto simile a quello riscontrato nello studio familiare. (Figura 9).

Figura 9: Confronti tra il livelli dei lipidi sierici tra carriers e non carriers nella popolazione



## 4.6 Caratteristiche biochimico-cliniche dei portatori delle mutazioni del gene ANGPTL3

Si è proceduto ad una analisi statistica di tutta la popolazione (403 soggetti) che ha partecipato allo screening. In primo luogo si è proceduto grazie alle risposte del questionario sottoposto al momento del reclutamento, al confronto delle caratteristiche demografiche e dei livelli plasmatici nei carriers e non carriers delle mutazioni nel gene ANGPTL3.

Non si hanno differenze significative nel livello di adiposità tra i tre gruppi (omozigoti, eterozigoti e non carriers). Gli omozigoti tendono ad essere più vecchi di eterozigoti e non carriers, ma la differenza non è significativa a livello statistico (*Tabella 7*).

*Tabella 7: Prevalenza dei fattori di rischio, malattie epatiche e cardiache tra carriers e non carriers delle mutazioni in ANGPTL3*

Variables	Carriers (n =63)		Non-carriers (n = 341)
	Homozygous (n = 8)	Heterozygous (n = 55)	
Età (anni)	64.8 ± 14.2	49.8 ± 20.4	57 ± 20.0
Sex (M/F)	4/4	24/31	1/180
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	29.4 ± 6.2	28.7 ± 5.1	28.1 ± 4.9
Menopause , n(%)	3 (37.5)	16 (29.1)	10 (27.9)
Fasting Blood Glucose (mmol/L)	4.6 ± 0.5**†	5.5 ± 1.5	5 ± 1.3
Systolic Blood Pressure (mmHg)	135.5 ± 30.5	129.9 ± 20.9	128.5 ± 19.7
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	81.2 ± 9.8	81.3 ± 10.3	80.5 ± 10.0
Smokers, n (%)	2 (25.0)	12 (21.8)	10 (20.5)
Alcohol consumption, n (%)			
Moderate drinkers	6 (75.0)	37 (67.3)	10 (62.5)
Abstainers	2 (25.0)	18 (32.7)	10 (37.5)
Hypertension, n(%)	2 (25.0)	15 (27.3)	10 (24.9)
Diabetes, n (%)	-	4 (7.3)	10 (10.0)
Coronary Heart Disease, n (%)	-	5 (9.1)	10 (4.7)
Cerebro Vascular Disease, n (%)	-	4 (7.3)	10 (7.0)
Liver disease, n (%)			
Hypertransaminasemia	2 (25.0)	7 (12.7)	10 (17.4)
Cholelithiasis	-	-	10 (3.5) *
Chronic Hepathitis	-	-	10 (0.9)
Cirrhosis	-	1 (1.8)	-

L'ipertransaminasemia è stata definita come concentrazione plasmatica di GOT e/o GPT > 40 U/L. La diagnosi di diabete di tipo 2 è stata basata sulla storia medica, sul trattamento con farmaci ipoglicemizzanti e/o concentrazione di glucosio plasmatico a digiuno >126 mg/dl e quella di ipertensione sulla presenza di pressione arteriosa sistolica (>140 mm Hg) e/o diastolica (>90 mm Hg) e/o uso corrente di di antiipertensivi.

La distribuzione dei fattori di rischio coronarico non differisce tra i due gruppi ad eccezione della concentrazione del glucosio nel sangue, che ha valori significativamente ridotti ( $p < 0,05$ ) negli omozigoti rispetto ai non-carriers. Nessun portatore in omozigosi mostra diagnosi di diabete, mentre il 10% del non-carriers ha il diabete mellito. Inoltre la presenza della mutazione non-senso S17X non è associata a enzimi epatici o presenza o storia clinica di colelitiasi. Nessun omozigote riporta malattie cardiovascolari presenti o pregresse.

Inoltre come analisi puramente speculativa, sono stati stimati i tassi di mortalità standardizzati (SMRs) per cardiopatia ischemica (IHD) e cancro nella popolazione di Campodimele. Anche se non sono significativamente statistici, i tassi di mortalità standardizzati sembrano essere più bassi nei carriers delle mutazioni, soprattutto nel sottogruppo maschile (*Figura 10*). Questo suggerisce che l'alta prevalenza di ipolipidemia in questa comunità può essere associata ad un basso tasso di mortalità.

Solamente i portatori omozigoti mostrano una riduzione globale delle lipoproteine plasmatiche (tutte con  $p < 0,001$ ), mentre gli eterozigoti presentano una diminuzione

significativa limitata ai livelli di trigliceridi e HDL-colesterolo. Questo è stato osservato negli individui identificati all'interno delle famiglie e nella popolazione e successivamente confermato tramite analisi dei residui lipidici, in cui i valori sono stati aggiustati per sesso, età e BMI (Figura 11).

Gli individui con due alleli ANGPTL3 mutati, ma non i soggetti con un solo allele, confrontati con i non portatori di mutazioni,

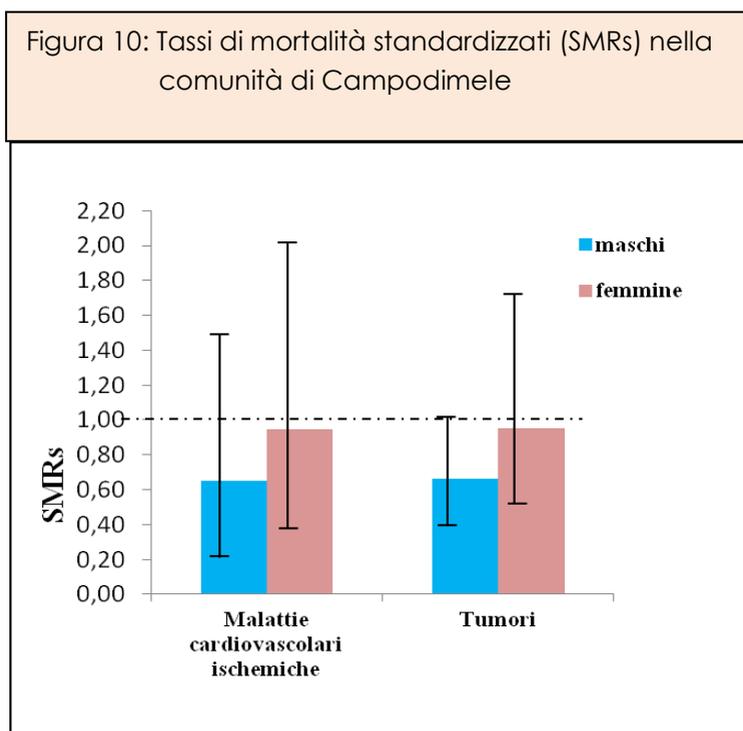


Figura 11: Residui dei lipidi plasmatici, in base al numero di alleli, aggiustati per età, sesso e BMI

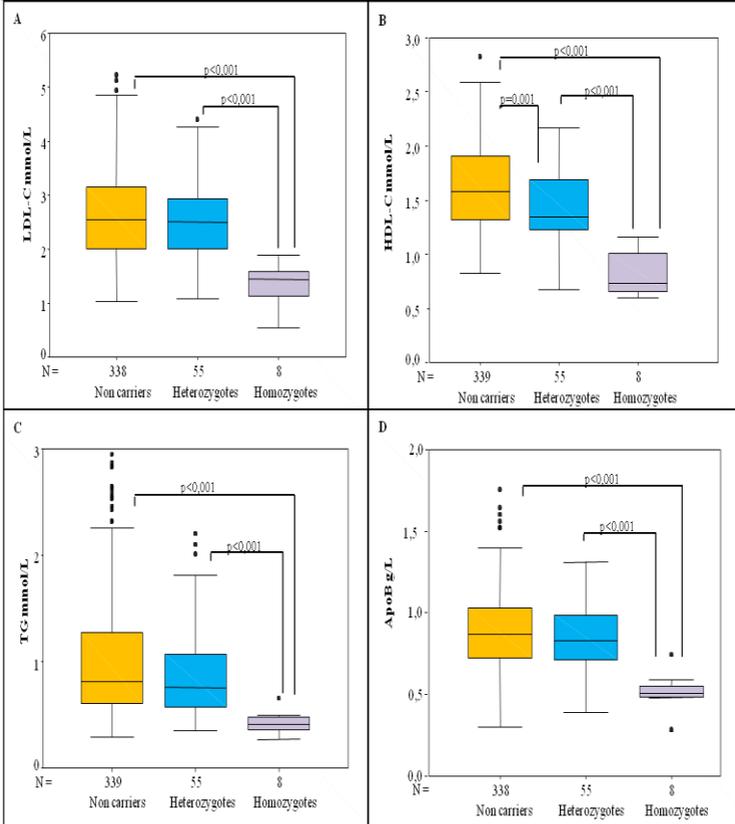


Figura 11: In figura sono mostrati i livelli dei residui di LDL-C (A), Trigliceridi (B), HDL-C (C) e apolipoproteina B (D) raggruppati in base al genotipo ANGPTL3. I residui sono aggiustati per età, sesso e BMI. Il grafico a scatole fornisce le indicazioni di livelli mediani (linea orizzontale dentro ogni box), i range interquartili (delineati da la linea superiore e inferiore di ogni scatola) e dei valori anomali al disotto del 5° percentile o sotto il 95° percentile (punti sotto o sopra le linee verticali rispettivamente)

mostrano una riduzione combinata dei lipidi plasmatici. Quindi in questa coorte si può stimare l'effetto netto prodotto dalla presenza di due alleli mutati del gene ANGPTL3: riducono del 48% i livelli di LDL-C, del 62% i livelli di trigliceridi, del 46% i livelli di HDL-C e del 44% i livelli di ApoB.

L'analisi tramite FPLC ha confermato il profilo lipidico gravemente disturbato degli omozigoti S17X rispetto ai non-portatori della mutazione (*Figura 12, Pannello A*). Inoltre, a differenza dei non carriers, gli omozigoti mostrano ridotti livelli di TG soprattutto nelle VLDL e nelle HDL e in misura minore nelle particelle LDL (*Figura 12, Pannello B*). Inoltre è stata osservata una riduzione nella dimensione delle HDL degli omozigoti.

Figura 12: Profili delle lipoproteine sieriche per non carriers e portatori omozigoti della mutazione S17X.

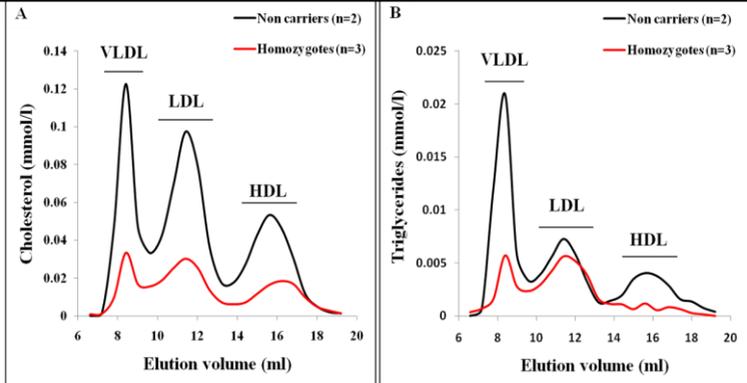


Figura 12: Medie dei profili di eluizione tramite Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) per 3 soggetti non carriers e 3 soggetti omozigoti, valutati tramite concentrazione di colesterolo (pannello A) e Trigliceridi (pannello B).

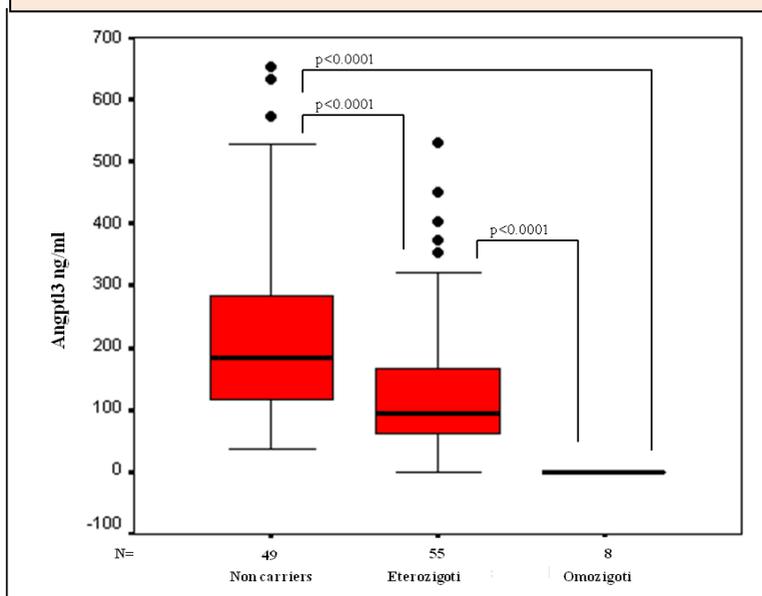
#### 4.7 Concentrazioni della proteina Angptl3 in base ai genotipi

Le concentrazioni medie della proteina Angptl3 sono riportate in grafico in *figura 13*. Confrontati con i non-carriers, gli eterozigoti mostrano una riduzione significativa dei livelli di Angptl3 ( $228 \pm 159$  ng/mL vs.  $133 \pm 116,9$  ng/mL, rispettivamente;  $p < 0,0001$ ). Nello specifico, i valori di Angptl3 dei portatori eterozigoti delle mutazioni FsS122 e FsE96del, sono stati 25,6 ng/mL e 530,3 ng/mL, rispettivamente.

Negli omozigoti, al contrario, non si hanno valori rilevabili di questa proteina nel siero.

Poiché tutti gli omozigoti individuati sono portatori della sola variante S17X, questi dati indicano chiaramente che questa mutazione quando presente allo stato omozigote causa l'assenza totale della produzione di Angptl3 da parte del fegato.

Figura 13: Livelli di proteina Angptl3 in base al numero di alleli mutati del gene ANGPTL3.



Il grafico a scatole indica i livelli medi (linea orizzontale in ogni scatola), i ranges interquartili (raffigurati da la linea superiore e inferiore di ogni box), e i valori anomali inferiori al 5° percentile e superiori al 95° percentile (punti sopra o sotto le linee verticali).

## 4.8 Associazione tra mutazioni del gene ANGPTL3 e steroli non colesterolo

Il confronto statistico dei rapporti steroli/colesterolo totale tra portatori omozigoti ed eterozigoti della mutazione S17X e non-carriers non ha individuato differenze significative tra i gruppi in tutti gli indici di sintesi o assorbimento del colesterolo e metabolismo degli acidi biliari, con l'eccezione di alti valori del rapporto lanosterolo/TC nei carriers omozigoti.

Complessivamente questi dati suggeriscono che i livelli notevolmente ridotti di lipidi plasmatici negli omozigoti S17X non sono attribuibili a alterazioni dei markers del metabolismo del colesterolo.

## CONCLUSIONI

Durante i tre anni di dottorato ho accuratamente studiato la comunità di Campodimele e sono giunta alla individuazione di alcune famiglie con ipolipidemia combinata, in cui la maggior parte (87%) degli individui affetti sono portatori della mutazione non-senso S17X nel gene ANGPTL3. Questa mutazione, riportata già da Musunuru *et al.*,<sup>29</sup> è inoltre comune nel 13% dei 46 individui non consanguinei della popolazione generale che mostrano un fenotipico ipolipidemico.

Nel gruppo degli ipolipidemici sono stati individuati ulteriori due alleli mutati, FsS122 e FsE96del, il primo dei quali già noto <sup>46</sup> e il secondo è di nuova identificazione e sembra essere funzionale. La mutazione S17X è stata inoltre riscontrata nel 9,4% degli individui che non mostravano bassi livelli di colesterolo totale, aumentando così la questione di come queste varianti possano contribuire alla variabilità dei lipidi plasmatici.

Grazie al confronto dei dati lipidici nei carriers e non carriers, ho riscontrato che solamente i soggetti che presentano due alleli S17X hanno livelli di lipidi plasmatici significativamente bassi. Sulla base dell'analisi dei residui lipidici aggiustati per sesso, età e

BMI, ho potuto stimare che il genotipo X17X è in grado di determinare una netta riduzione del 50% nelle concentrazioni plasmatiche di LDL-C, HDL-C, TG e apoB. Al contrario gli eterozigoti mostrano una riduzione significativa solo nei livelli di TC e HDL-C. Questi risultati sono coerenti sia nello studio familiare che nello studio di popolazione e suggeriscono in maniera forte che mutazioni in ANGPTL3 possono causare un fenotipo ipolipidemico combinato con trasmissione dominante a penetranza incompleta.

Tutto ciò è in contrasto con quanto osservato nelle famiglie descritte dal gruppo di Musunuru,<sup>29</sup> in cui le mutazioni nel gene ANGPTL3 influenzano il fenotipo in maniera co-dominante. La ragione di questa discrepanza non è stata ancora dimostrata e può essere ipotizzato che ci siano altre differenze ambientali o genetiche tra gli individui studiati.

Poiché tra gli ipolipidemicici di Campodimele sono stati individuati soprattutto portatori dell'allele S17X, è possibile che questa variante, quando presente in una condizione di eterozigosi, abbia solo un'influenza parziale sui livelli lipidici nel plasma. D'altra parte, si può notare che gli individui eterozigoti mostrano solo una parziale, ma comunque

statisticamente significativa, riduzione dei livelli sierici della proteina Angptl3 rispetto ai non carriers. Dunque è possibile postulare che una moderata diminuzione di questa proteina può influenzare solo le concentrazioni di CT e HDL-C, mentre la completa assenza determina una riduzione globale dei lipidi plasmatici, favorendo così la completa espressione del fenotipo ipolipidemico.

La conoscenza del ruolo fisiologico della proteina Angptl3 può aiutare nella comprensione di questi risultati.

La proteina Angptl3 è un membro delle proteine Angiopietina-like. È prodotta soprattutto nel fegato, rilasciata nel circolo sanguigno e la sua espressione non varia durante la fase prandiale.

La Angptl3 è codificata dal gene ANGPTL3 localizzato sul cromosoma 1 (1p31.1-p22.3). Il gene si compone di 7 esoni per un totale di 2805 bp.

Il ruolo principale della proteina Angptl3 è la parziale inibizione della Lipoprotein Lipasi (LPL) durante la fase prandiale.<sup>47</sup> La LPL è un enzima essenziale che catalizza l'idrolisi dei trigliceridi trasportati dai chilomicroni e dalle VLDL per generare acidi grassi liberi e monoacilgliceroli. La proteina angiopietina-

like 3 ha un'omologia di sequenza del 31% con la proteina Angptl4, è composta da un dominio N-terminale con una regione coiled-coil e un dominio fibrinogeno like C-terminale che è tagliato *in vivo*.<sup>48</sup>

Ono et al hanno dimostrato che il dominio N-terminale 17-207 ha la capacità di regolare il metabolismo lipidico.<sup>47</sup>

È stato riportato che la overespressione della proteina ricombinante nel fegato murino aumenta i livelli di trigliceridi e di colesterolo totale nel plasma, mentre una inattivazione mirata della Angptl3 li riduce.<sup>49-50</sup>

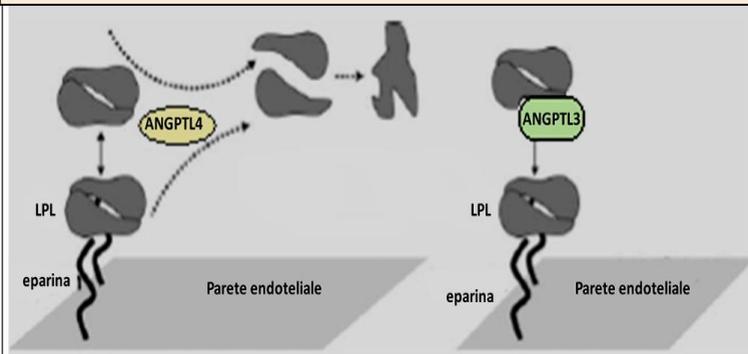
L'esatto meccanismo con cui Angptl3 sopprime l'azione della LPL rimane ancora da chiarire. La LPL purificata esiste in due forme: monometrica e dimerica. Il dimero è l'unica forma funzionale. Uno studio ha dimostrato che la Angptl4 è capace di accelerare la dissociazione dei dimeri di LPL attivi in monomeri e quindi ridurre l'azione della Lpl.<sup>47</sup>

La Lpl viene ancorata tramite una forte interazione delle cariche polianioniche dell'eparina con i clusters positivamente carichi della superficie della Lpl stessa.<sup>51</sup> L'affinità dell'eparina è molto più forte per i dimeri di Lpl attivi rispetto ai monomeri o aggregati inattivi. Oltre a presentare la Lpl

attiva alle particelle lipoproteiche in entrata, non è noto se l'eparina gioca un ruolo nella stabilizzazione della Lpl o nel ritardare la sua inattivazione. L'eparina ha effetti diversi sull'azione della Angptl4 e della Angptl3, infatti può salvare la Lpl dall'inattivazione della Angptl3, perché la proteina non accelera significativamente l'inattivazione della Lpl, mentre non è in grado di invertire gli effetti della Angptl4 sulla Lpl (figura 14).<sup>52</sup>

Inoltre è stato dimostrato che il dominio di legame putativo con l'eparina da 61-66 della Angptl3 è importante per l'attività inibitoria della proteina <sup>47</sup>

Figura 14: Rappresentazione schematica del possibile scenario di interazione che coinvolge Lpl, eparina e Angptl4 o Angptl3



Tratto da: Shan L et al. *J Biol Chem.* 2009; 284:1419-24.

Figura 14: Angptl4 è raffigurata principalmente come inattivatore della LPL, mentre Angptl3 come inibitore. L'attività della Angptl4 è ostacolata dalla eparina, mentre l'attività della Angptl3 può essere ostacolata a basse concentrazioni di eparina.

Successivi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la Angptl3 potrebbe agire come inibitore della lipasi endoteliale (EL), un enzima che idrolizza i fosfolipidi delle HDL e promuove il catabolismo di queste lipoproteine.<sup>53</sup>

La sequenza aminoacidica della Lipasi Endoteliale è per il 44% identica a quella della LPL, in particolare i cluster carichi positivamente coinvolti nel legame con l'eparina sono conservati sia nella EL che nella LPL,<sup>54</sup> suggerendo che la Angptl3 potrebbe influenzare l'attività della EL, perché inibisce l'attività LPL.

Complessivamente questi dati indicano che normalmente l'attività della proteina angiopoietina-like 3 è quella di aumentare i livelli di trigliceridi e di HDL-colesterolo. Questo ruolo è stato parzialmente confermato nell'uomo, dove polimorfismi o varianti loss-of-function rare nel gene ANGPTL3 sono stati associati con livelli ridotti di TG, ma non di HDL-C.<sup>47</sup>

Tuttavia, studi di misurazione delle concentrazioni plasmatiche della Angptl3 hanno recentemente riportato che i livelli ridotti di questa proteina predicono

significativamente bassi livelli di HDL-C nel plasma.<sup>53</sup>

In linea con le osservazioni sulla popolazione di Campodimele, che solo la totale assenza della proteina angiopoietin-like 3 produce una ipolipidemia completa, è possibile ipotizzare che è richiesto un deficit totale della Angptl3 per una down-regulation totale dell'attività enzimatica della LPL e della EL.

L'impatto del deficit della Angptl3 sulle concentrazioni di LDL-C e ApoB è molto difficile da spiegare. Nel Dallas Heart Study è stato dimostrato che i partecipanti volontari con mutazioni frame-shift nel gene avevano livelli di LDL-C più bassi rispetto al resto della coorte.<sup>46</sup> Inoltre in uno screening di genomewide association per varianti comuni in più di 100000 partecipanti, è stato trovato che polimorfismi vicini ad ANGPTL3 sono associati con alta significatività con i livelli di LDL-C.<sup>55</sup>

Studi *in vivo* sul metabolismo lipoproteico condotti da Musunuru *et al* in membri selezionati delle famiglie del suo studio, hanno indicato che i portatori di mutazioni nel gene ANGPTL3 hanno tassi di produzione di VLDL ridotti e aumentati tassi catabolismo frazionale di LDL.<sup>29</sup> Questo suggerisce che la Angptl3 può

agire direttamente anche nel fegato regolando la secrezione e la clearance epatocellulare delle lipoproteine, che differisce dal ruolo inibitorio della proteina sulla LPL e sulla EL nel circolo sanguigno.

In questo studio viene dimostrato che le mutazioni nel gene ANGPTL3 non hanno impatto sulla sintesi e sull'assorbimento del colesterolo o sulla sintesi degli acidi biliari, indicando che un deficit della proteina Angptl3 ha un effetto neutrale sull'omeostasi del colesterolo nell'organismo, in contrasto con altre forme di ipocolesterolemia.

Recentemente Noto *et al.* utilizzando misurazioni di steroli non-colesterolo nel plasma hanno osservato che la Hypobetalipoproteinemia primaria è caratterizzata da una normale sintesi del colesterolo e da un assorbimento di colesterolo con indici più alti nei portatori di grandi delezioni nel gene ApoB più lunghe di ApoB48, ma non nei portatori di grandi delezioni ApoB inferiori ad ApoB48.<sup>56</sup> Inoltre, studi condotti usando tecniche di equilibrio del colesterolo mostrano che pazienti con abetalipoproteinemia mostrano sintesi di colesterolo e tassi di turnover relativamente normali o solo moderatamente elevati.<sup>57</sup>

L'ampia collezione di pazienti con ipolipidemia combinata familiare di questo studio mi ha condotto a esplorare il potenziale clinico correlato a questa sindrome. I portatori dell'allele S17X in omozigosi sono caratterizzati dai più bassi livelli di glicemia e da assenza quindi di diabete mellito di tipo 2. Una osservazione simile è stata riportata dal gruppo di Romeo *et al.*: una maggiore prevalenza di variazioni non sinonime nel gene ANGPTL3 in soggetti con livelli di glicemia compresa nel quartile minore.<sup>46</sup>

Nel complesso questi risultati indicano che i soggetti deficitari di Angptl3 possono avere una più efficiente utilizzazione del glucosio. Anche se non sono disponibili dimostrazioni dirette per questo, va sottolineato che la proteina angiopoietina-like 3 stimola la lipolisi nel tessuto adiposo, facendo aumentare in questo modo i livelli di acidi grassi liberi (FFA) e di glicerolo nel plasma.<sup>58</sup> Poiché l'aumento di FFA è stato associato a una ridotta sensibilità all'insulina, si potrebbe ipotizzare che la mancanza di Angptl3 può migliorare la sensibilità dei tessuti all'insulina riducendo la disponibilità di FFA. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini su questo punto

Nel nostro campione non sono state riscontrate evidenze che la ipolipidemia combinata familiare (FHLB) sia associata ad anomalie epatiche. Questo concorda con altri studi che hanno dimostrato che variazioni nella sequenza di ANGPTL3 associate con basse concentrazioni di TG plasmatici non sono associate ad un aumento di adiposità nel corpo o nel fegato.

La mancanza di correlazione con l'adiposità epatica potrebbe essere una caratteristica della FHLB, mentre l'accumulo di grasso epatico è un tratto distintivo di altre forme di ipolipidemia.

Infine, si è potuto notare che, nonostante i valori molto bassi di HDL-C, i portatori delle varianti non senso del gene ANGPTL3 non hanno mostrato alcun rischio aumentato di malattia ischemica e cardiovascolare. Il basso numero di soggetti omozigoti previene ogni conclusione definitiva su questo aspetto, ma l'osservazione che anche il tasso di mortalità per CVD ischemica è molto basso nella comunità di Campodimele potrebbe supportare l'ipotesi che la FHLB è un fattore di protezione contro l'aterosclerosi. Questa conclusione è in accordo con l'osservazione sul topo: la riduzione dell'espressione di

ANGPTL3 protegge dall'aterosclerosi, anche in assenza di apoE, a causa del maggiore catabolismo e della clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi.<sup>59</sup>

Alcuni studi hanno suggerito che una riduzione marcata dei lipidi plasmatici, chiamati in generale colesterolo totale, possa aumentare il rischio di cancro.<sup>60</sup> All'interno della popolazione di Campodimele è stata osservato un basso tasso di incidenza di tumori, che raggiunge la significatività statistica negli uomini. Questa osservazione va contro l'ipotesi che questa forma di ipolipidemia possa essere associata a un aumento del rischio di neoplasie.

É da sottolineare che non sono state identificate mutazioni nel gene ANGPTL3 in 43 soggetti ipocolesterolemici. Questi individui potrebbero avere mutazioni in una regione non codificante del gene non sequenziata durante lo studio in questione. In alternativa si può ipotizzare che la loro ipocolesterolemia sia causata da un altro gene difettivo non conosciuto.

In conclusione, i miei dati dimostrano che la mutazione S17X nel gene ANGPTL3 è comune nella popolazione di Campodimele ed è associata a ridotte concentrazioni di proteina

Angptl3 nel plasma, che è quasi assente negli omozigoti. Anche se i lipidi plasmatici sono ridotti nei portatori delle mutazioni, il fenotipo ipolipidemico combinato è pienamente espresso solo nei soggetti omozigoti, suggerendo così una espressione dominante a penetranza incompleta della Ipolipidemia Familiare Combinata, dovuta a mutazioni in ANGPTL3. Sebbene siano necessari studi più approfonditi, questa analisi non ha fornito alcuna indicazione di associazione tra FHLB e variazioni del rischio di malattie epatiche, tumori o malattie cardiovascolari, permettendo così la conclusione che questo disturbo lipidico potrebbe essere una condizione benigna.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407: 233-241.
2. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:1819-1824.
3. Gordon DJ, Rifkind BM. High density lipoprotein-the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989; 321:1311-1316.
4. Steinberg D, Witztum JL in *Molecular basis of Cardiovascular Disease* (ed. Chien, KR) (Saunders, Philadelphia, 1999). p.458-475.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801-809.
6. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*. 2002; 8: 1218-1226.
7. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis the road ahead. *Cell*. 2001; 104: 503-516.
8. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of

atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis American Heart Association. *Circ.* 1995; 92:1355-1374.

9. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanism and disorders. *N Engl J Med* 1967, 276:273-281.
10. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 1964, 37:402-407.
11. Higgins MJP, Lecomwasam DS, Galton DJ. A new type of familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1975, 306:737-740.
12. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 2003; 34:154-156.
13. Zuliani G, Arca M, Signore A, Bader G, Fazio S, Chianelli M, Bellostà S, Campagna F, Montali A, Maioli M, Pacifico A, Ricci G, Fellin

- R. Characterization of a new form of inherited hypercholesterolemia: familial recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:802-809.
14. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin N V, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000, 290:1771-1775.
  15. Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K, Leijid B. Bile acid kinetics in relation to endogenous triglyceride metabolism in various types of hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res*, 1978, 19:1004-1016.
  16. Klein HG, Santamarina-Fojo S, Duverger N, Clerc M, Dumon MF, Albers JJ, Marcovina S, Brewer HB Jr. Fish eye syndrome: a molecular defect in the lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) gene associated with normal alpha-LCAT-specific activity. Implications for classification and prognosis. *J Clin Invest*. 1993; 92:479-485.
  17. Fredrickson DS, Gotto ANM, Levy RI. Familial lipoprotein deficiency (abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, tangier disease),

The Metabolic Basis of Inherited Disease, Third edition. Edited by JB Stanbury, JB Wyngaarden, DS Fredrickson. New York, McGraw-Hill Company, 1972; 493-530.

18. Vergani, C., and G. Bettale. Familial hypoalphalipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta.* 1981. 114:45-52.
19. Schonfeld G, Lin X, Yue P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. *Cell Mol Life Sci*, 2005; 62:1372-1378.
20. Hooper AJ, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2005; 42:515-545.
21. Kane JP, Havel RJ. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Vol. II, 8th ed. New York: McGraw Hill; 2001. p. 2717-2752.
22. Ledmyr H, McMahon AD, Ehrenborg E, Nielsen LB, Neville M, Lithell H, MacFarlane PW, Packard CJ, Karpe F; WOSCOPS executive. The microsomal triglyceride transfer protein gene-493T variant lowers

cholesterol but increases the risk of coronary heart disease. *Circ* 2004; 109:2279-2284

23. Di Leo E, Lancellotti S, Penacchioni JY, Cefalù AB, Averna M, Pisciotta L, Bertolini S, Calandra S, Gabelli C, Tarugi P. Mutations in MTP gene in abeta- and hypobeta-lipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2005, 180:311-318.
24. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 2003; 34:29-31.
25. Wu J, Kim J, Li Q, Kwok PY, Cole TG, Cefalu B, Averna M, Schonfeld G. Known mutations of apoB account for only a small minority of hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1999; 40:955-959.
26. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005; 37:161-165.

27. Maxwell KN, Breslow JL. Proprotein convertase subtilisin kexin 9: the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:167-172.
28. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, Horton JD. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:5374-5379.
29. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, Garimella KV, Fisher S, Abreu J, Barry AJ, Fennell T, Banks E, Ambrogio L, Cibulskis K, Kernytsky A, Gonzalez E, Rudzicz N, Engert JC, DePristo MA, Daly MJ, Cohen JC, Hobbs HH, Altshuler D, Schonfeld G, Gabriel SB, Yue P, Kathiresan S. Exome Sequencing, *ANGPTL3* Mutations, and Familial Combined Hypolipidemia. *N Engl J Med* 2010; 363:2220-2227.
30. Lee EC, Desai U, Gololobov G, Hong S, Feng X, Yu XC, Gay J, Wilganowski N, Gao C, Du LL, Chen J, Hu Y, Zhao S, Kirkpatrick L, Schneider M, Zambrowicz BP, Landes G, Powell DR, Sonnenburg WK. Identification of a new functional domain in angiopoietin-like

- 3 (ANGPTL3) and angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). *J Biol Chem*. 2009; 284:13735-13745.
31. Nakajima K, Kobayashi J, Mabuchi H, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Imamura S, Ai M, Otokozawa S, Schaefer EF. Association of angiopoietin-like protein 3 with hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase activities in human plasma. *Ann Clin Biochem*. 2010; 47:423-431.
32. Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Kono K, Shimizugawa T, Ando Y, Koishi R, Kohama T, Sakai N, Kotani K, Komuro R, Ishida T, Hirata K, Yamashita S, Furukawa H, Shimomura I. Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:366-372.
33. Giampaoli S, Buongiorno AM, Cinosi V, et al, e Gruppi di Ricerca dei Progetti MONICA e DISCO. Descrizione di un campione di popolazione con colesterolemia media desiderabile e contenente un cluster di ipocolesterolemia: il caso di Campodimele. *G Arterioscler* 1991; 16:31-37.

34. Cugini P, Leone G, Sepe FA, Morabito S, Pelosio A, Caparrelli T, Di Fonzo F, PannoZZo G, Verardi R, Zannella A, et al. A 24-hour blood pressure and heart rate pattern in healthy persons over 70 years of age. A Campodimele study. *Recenti Prog Med.* 1992; 83:275-281.
35. Cugini P, Leone G, Lucia P, Sepe FA, Pelosio A, Caparelli T, Verardi R, Zannella A, Zannella P, PannoZZo G, et al. Campodimele study: blood pressure and heart rate pattern in clinically healthy elderly subjects. *Chronobiol Int.* 1994; 11:381-392.
36. Cugini P, Sepe FA, Leone G, Pelosio A, Zannella FP, Di Fonzo F, Zannella P, PannoZZo G, Caparrelli T, Verardi R, Zannella A. Lower 24-h blood pressure regimen in subjects with a familial genealogy of longevity. *Clin Ter.* 1998; 149:419-423.
37. Menotti A. Epidemiology of lipids and lipoproteins as a guide to the detection of mutants. In: Sirtori CR, Nichols AV, Franceschini G, eds *Humans Apolipoprotein Mutants: Impact on Atherosclerosis and Longevity.* Milan: NATO ASI series, 1986; 51-54.

38. Fazio S, Sidoli A, Maietta A, Giampaoli S, Menotti A, Antonini R, Urbinat G, Baralle FE, Ricci G. A form of familial hypobeta-lipoproteinaemia not due to a mutation in the apolipoprotein B gene. *J Intern Med*. 1991; 229:41-7.
39. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25:1277-1294.
40. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8:1-21.
41. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1250-1255.
42. Miettinen T. A., Tilvis R. S., Kesämiemi Y. A. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am. J. Epidemiol.* 1990; 131:20-31.
43. Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density

- lipoprotein receptor levels. *J Biol Chem*. 2008; 283:31791-31801.
44. Weingärtner O, Lütjohann D, Böhm M, Laufs U. Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk. *Ather* 2010, 210:362-365.
  45. Robciuc MR, Tahvanainen E, Jauhainen M, Ehnholm C. Quantitation of serum angiopoietin-like proteins 3 and 4 in a Finnish population sample. *J Lipid Res* 2010; 51:824-831.
  46. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest* 2009; 119:70-79.
  47. Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, Yoshida K, Ando Y, Koishi R, Ueda K, Inaba T, Minekura H, Kohama T, Furukawa H. ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2002; 277:33742-33748.
  48. Ono M, Shimizugawa T, Shimamura M, Yoshida K, Noji-Sakikawa C, Ando Y, Koishi R, Furukawa H. Protein region important for regulation of lipid metabolism in

angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J Biol Chem* 2003; 278:41804-41809.

49. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:17450-17455.
50. Köster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, Li D, Qiu Y, Fraser CC, Yang DD, Heuer JG, Jaskunas SR, Eacho P. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* 2005; 146:4943-4950.
51. van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem*. 1994; 269:4626-4633.
52. Shan L, Yu XC, Liu Z, Hu Y, Sturgis LT, Miranda ML, Liu Q. The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein

lipase activity through distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 2009; 284:1419-1424.

53. Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H et al. Angiotensin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 366-372.
54. Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem.* 1999;274:14170 -14175.
55. Li, C. Genetics and regulation of angiotensin-like proteins 3 and 4. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17:152-156
56. Noto D, Cefalù AB, Barraco G et al. Plasma non-cholesterol sterols in primary hypobetalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2011; 216:409-413.
57. Goodman DS, Deckelbaum RJ, Palmer RH, Dell RB, Ramakrishnan R, Delpre G, Beigel Y, Cooper M. Cholesterol turnover and metabolism in two patients with abetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1983; 24:1605-1611.

58. Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111:121-124.
59. Ando Y, Shimizugawa T, Takeshita S, Ono M, Shimamura M, Koishi R, Furukawa H. A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Lipid Res* 2003; 44:1216-1223.
60. Jacobs D, Blackburn H, Higgins M, Reed D, Iso H, McMillan G, Neaton J, Nelson J, Potter J, Rifkind B, et al. Report of the conference on low blood cholesterol: mortality associations. *Circulation* 1992; 86:1046-1060.