

## **1 INTRODUZIONE**

<i>1.1 Il colesterolo</i>	<i>pag 3</i>
<i>1.2 Biosintesi del colesterolo</i>	<i>pag 4</i>
<i>1.3 Sindrome di Smith-Lemli-Opitz (SLOS)</i>	<i>pag 7</i>
<i>1.4 Desmosterolosi</i>	<i>pag 8</i>
<i>1.5 Condrodisplasia puntata X2-linked</i>	<i>pag 8</i>
<i>1.6 CHILD</i>	<i>pag 9</i>
<i>1.7 Sindrome di Greenberg</i>	<i>pag 9</i>
<i>1.8 Sindrome di Antley-Bixtler</i>	<i>pag 10</i>
<i>1.9 Latosterolosi</i>	<i>pag 10</i>
<i>1.10 La nutrizione parenterale</i>	<i>pag 11</i>
<i>1.11 I fitosteroli</i>	<i>pag 13</i>

## **2 OBIETTIVO DEL LAVORO** *pag 15*

## **3 MATERIALI E METODI**

<i>3.1 Campioni per latosterolosi</i>	<i>pag 16</i>
<i>3.2 Campioni per diagnosi dei difetti della biosintesi del colesterolo</i>	<i>pag 16</i>
<i>3.3 Campioni per dosaggio degli steroli per pazienti sottoposti a NP</i>	<i>pag 16</i>
<i>3.4 Solventi e standards per l'analisi degli steroli</i>	<i>pag 17</i>
<i>3.5 Analisi dei marcatori biochimici di colestasi</i>	<i>pag 18</i>
<i>3.6 Analisi degli steroli plasmatici</i>	<i>pag 18</i>
<i>3.7 Analisi degli steroli cellulari</i>	<i>pag 18</i>
<i>3.8 Analisi degli steroli fecali</i>	<i>pag 19</i>
<i>3.9 Gas cromatografia/Spettrometria di massa</i>	<i>pag 19</i>

<i>3.10 Mezzi di coltura</i>	<i>pag 21</i>
<i>3.11 Ceppo di lievito per lo studio dell'enzima SC5D wild tipe e delle sue forme mutate SC5D 632 e SC5D 86</i>	<i>pag 21</i>
<i>3.12 Metodo di isolamento dei microsomi</i>	<i>pag 22</i>
<i>3.13 Metodo per l'analisi delle proteine</i>	<i>pag 23</i>
<i>3.14 Attività enzimatica di SC5D e delle due forme mutate</i>	<i>pag 24</i>
<i>3.15 Analisi dei prodotti</i>	<i>pag 24</i>
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	
<i>4.1 Western blotting</i>	<i>pag 26</i>
<i>4.2 Attività enzimatica di SC5D e delle sue forme mutate</i>	<i>pag 27</i>
<i>4.3 Steroli plasmatici nella latosterolosi</i>	<i>pag 30</i>
<i>4.4 Steroli fecali nella latosterolosi</i>	<i>pag 32</i>
<i>4.5 Livelli dei marcatori biochimici di colestasi</i>	<i>pag 35</i>
<i>4.6 Steroli plasmatici ed ematici in pazienti sottoposti a NP</i>	<i>pag 35</i>
<b>5 CONCLUSIONI</b>	<i>pag 43</i>
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag 44</i>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Il colesterolo

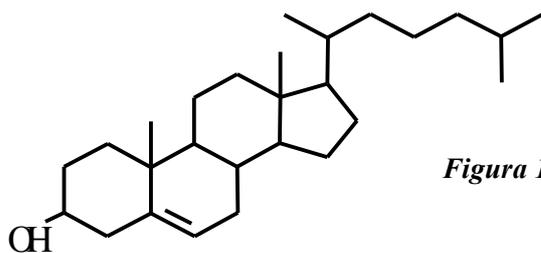
Il colesterolo è un lipide costituito da 27 atomi di carbonio uniti in una struttura ciclofenantrenica con una catena alifatica laterale, un doppio legame in posizione 5 ed un gruppo ossidrilico in posizione 3 (desinenza olo). Il nome deriva dal greco coles (bile) e steros (solido). Nonostante la sua presenza fosse già stata riscontrata nei calcoli della cistifellea alla fine del 18° secolo, la struttura spaziale del colesterolo fu determinata nel 1975 dal premio nobel Cornforth.

Il colesterolo è un costituente fondamentale della membrana cellulare di tutte le cellule animali nelle quali svolge un importante ruolo di regolazione della fluidità: infatti, inserendosi fra i due strati di fosfolipidi si orienta con il gruppo ossidrilico vicino alle teste polari dei fosfolipidi, diminuendo così la fluidità del mosaico ma aumentando la stabilità meccanica e la flessibilità delle cellule.

La crescita e la divisione cellulare non sono possibili senza colesterolo.

Il colesterolo è la sostanza base per la sintesi degli ormoni steroidei come progestinici, glucocorticoidi, mineralcorticoidi, estrogeni, androgeni.

Il colesterolo prodotto nel fegato viene, in buona parte, escreto con la bile.

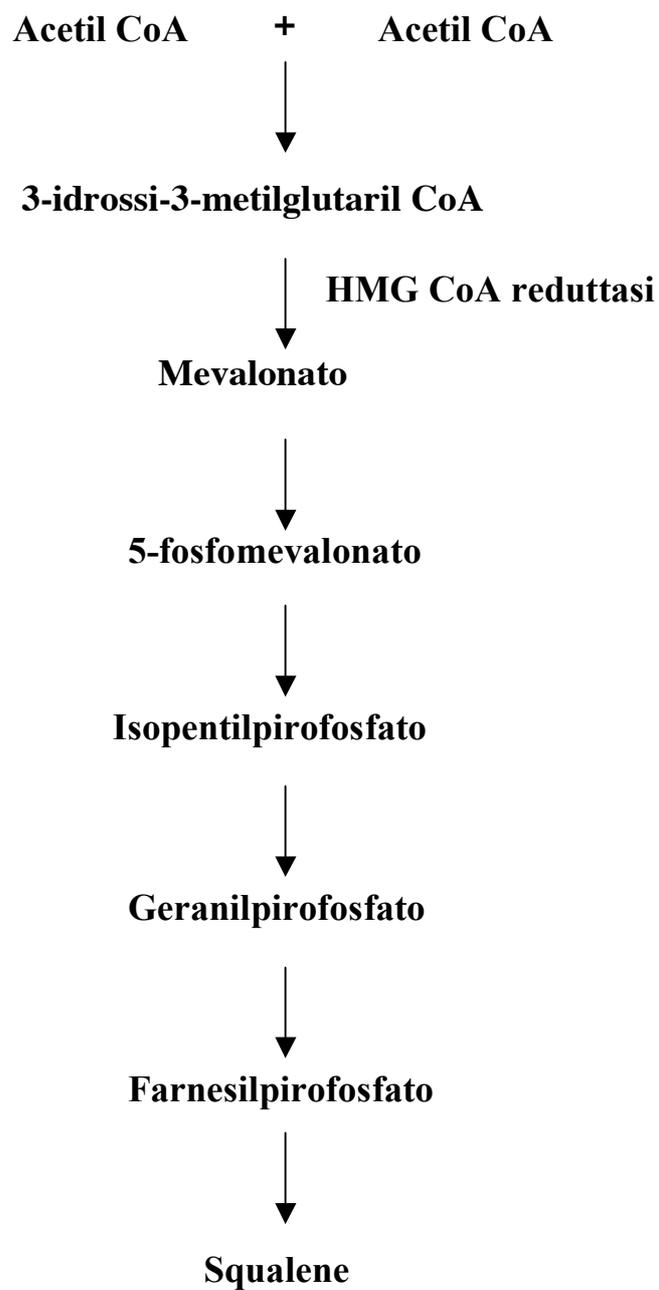


*Figura 1:* struttura chimica del colesterolo.

## 1.2 Biosintesi del colesterolo

La biosintesi del colesterolo è molto complessa, include circa 30 steps enzimatici e si divide in 2 fasi: sintesi pre-squalenica e sintesi post-squalenica. I 27 atomi di carbonio del colesterolo derivano tutti dall'acetil coenzima A (acetil CoA); la prima reazione è una condensazione di due molecole di acetil CoA con la formazione di acetoacetil CoA (enzima tiolasi). Il passaggio successivo è la condensazione di un'altra molecola di acetil CoA con formazione del 3 $\beta$  idrossimetilglutaril CoA (3HMG CoA; enzima 3HMG CoA sintasi); la prima tappa di regolazione della biosintesi del colesterolo è la riduzione del 3HMG CoA a mevalonato (enzima 3HMG CoA reduttasi). Dopo la trasformazione del mevalonato (C6) a isopentil pirofosfato (C5) hanno inizio una serie di condensazioni testa-coda di unità isopreniche che portano alla formazione di geranyl pirofosfato (C10) e farnesil pirofosfato (C15); infine, la condensazione coda-coda di due farnesil pirofosfato porta alla formazione dello squalene con la quale termina la prima fase della biosintesi (figura 2).

La fase post-squalenica richiede, a differenza della precedente, ossigeno molecolare che porta alla formazione dello squalene ossido e poi, in seguito ad una ciclizzazione, al lanosterolo (C30). Il lanosterolo subisce una riduzione del doppio legame sul C24, una demetilazione in posizione 14, una doppia demetilazione del C4 ed infine con una migrazione del doppio legame dal C8 al C7 si arriva al latosterolo. La migrazione del doppio legame in 7 del latosterolo avviene mediante la formazione di un diene coniugato C5, C7 (7 deidrocolesterolo) ed infine con la riduzione del doppio legame in 7 si arriva al colesterolo (figura 3).



**Figura 2:** biosintesi pre-squalenica: la prima tappa di regolazione della biosintesi del colesterolo è la trasformazione dell' idrossimetilglutarilCoA a mevalonato.



### **1.3 Sindrome di Smith Lemli Opitz (SLOS)**

Negli ultimi 15 anni 7 sindromi malformative umane sono state associate a difetti della biosintesi del colesterolo (Kelley 2000, Porter 2002, Waterham 2002, Herman 2003).

La sindrome di **Smith-Lemli-Opitz** (SLOS) è stata la prima in cui è stato descritto un difetto della biosintesi del colesterolo nell'uomo. E' la sindrome più conosciuta e più comune con un'incidenza che varia da 1/40000 a 1/50000 nuovi nati negli USA, fu descritta nel 1964 come sindrome malformativa autosomica recessiva da Smith, Lemli ed Opitz i quali descrissero tre pazienti maschi che presentavano lo stesso fenotipo: dismorfismo facciale, microcefalea, ritardo mentale, sviluppo incompleto dei genitali. Solo nel 1993 Tint et al. associarono tale sindrome ad un difetto della biosintesi del colesterolo in quanto rilevarono nel plasma dei pazienti affetti da SLOS bassi livelli di colesterolo associati ad alti livelli di 7 deidrocolesterolo. Questa osservazione suggerì che potesse esserci un difetto dell'enzima 7 deidrocolesterolo reduttasi (DHCR7). Il gene (DHCR7) è stato clonato nel 1998, l'enzima è una proteina di membrana integrale con 9 domini transmembrana, sono stati identificati circa 80 alleli mutati, il più frequente dei quali è IVS8-1G-C: questa mutazione è associata ad una inserzione di 147 bp di sequenza intronica sul mRNA. La severità clinica della SLOS è calcolata in base alle caratteristiche fenotipiche su 10 organi. Non esiste una correlazione diretta tra il genotipo e la severità clinica della sindrome mentre il rapporto tra il colesterolo e gli steroli totali sembra essere un utile marcatore di severità. In generale, a bassi livelli di colesterolo corrisponde una maggiore severità della sindrome. Storicamente esistono 2

forme di SLOS denominate di tipo I e di tipo II. La SLOS di tipo I è caratterizzata da malformazioni leggere, inoltre i pazienti presentano livelli di colesterolo normali o moderatamente bassi. Nella SLOS di tipo II le malformazioni sono molto severe, c'è un'incidenza di mortalità molto elevata ed, inoltre, i livelli di colesterolo sono molto bassi (< 10 mg/dL) (Tint 1995).

#### **1.4 Desmosterolosi**

È una sindrome autosomica recessiva dovuta ad un difetto dell'enzima  $3\beta$  idrossi sterolo  $\Delta^{24}$  reduttasi. Sono stati descritti solo due casi, per cui è abbastanza difficile caratterizzarne il fenotipo, in generale le caratteristiche morfologiche dei due pazienti ricordavano molto quelle tipiche della SLOS (Clayton 1996). Da un punto di vista biochimico l'analisi degli steroli plasmatici ha rilevato un'alta quantità di desmosterolo. Esperimenti condotti su colture di linfoblasti cresciuti in mezzo delipidato hanno confermato un accumulo di desmosterolo (Waterham 2001).

#### **1.5 Condrodisplasia puntata 2 X-Linked (CPDX2)**

La condrodisplasia puntata è un difetto caratterizzato da calcificazioni puntiformi delle ossa. Si manifesta con malformazioni scheletriche, oculari (principalmente cataratta) e della pelle.

La forma più conosciuta e meglio caratterizzata è la CPDX2 nota anche come la sindrome di Conradi-Hunermann. L'analisi degli steroli in 5 pazienti affetti, effettuata da Kelley et al. nel 1999, rilevò un'alta quantità di 8 deidrocolesterolo e 8(9) colesstenolo nel plasma e nei tessuti dei pazienti

suggerendo un difetto dell'enzima  $3\beta$  idrossisterolo  $\Delta^{8,7}$  isomerasi. Il gene fu identificato sempre nel 1999 e chiamato EBP. Ad oggi, sono state riportate circa 60 mutazioni e non è stata osservata nessuna correlazione tra genotipo e fenotipo (Derry 1999, Braverman 1999).

### **1.6 CHILD (Congenital Hemidysplasia with ichthyosi-form erythroderma or nevus and limb defect)**

E' una sindrome molto simile alla CDPX2 dalla quale si differenzia per la distribuzione unilaterale delle lesioni della pelle che, inoltre, persistono per molto più tempo; le anomalie degli arti sono più severe, mentre c'è assenza di cataratta. L'analisi del plasma di un paziente affetto ha mostrato un aumento dei livelli di 8 deidrocolesterolo e 8(9) colesterolo suggerendo un blocco dell'enzima  $3\beta$  idrossisterolo  $\Delta^{8,7}$  isomerasi (Grange 2000).

### **1.7 Sindrome di Greenberg**

E' una displasia scheletrica descritta per la prima volta da Greenberg nel 1988 in un neonato e successivamente in un feto consanguineo. La sindrome prenatale è in molti casi letale. Il fenotipo comprende uno sviluppo incompleto degli arti, nanismo con una disorganizzazione marcata della cartilagine e delle ossa. L'analisi degli steroli estratti dalla cartilagine dei feti ha mostrato alti livelli di colest-8,14,24-trien- $3\beta$ -olo e colest-8,14-dien- $3\beta$ -olo suggerendo un blocco dell'enzima  $3\beta$  idrossi sterolo  $\Delta^{14}$  reductasi.

### **1.8 Sindrome di Antley-Bixler**

E' una sindrome malformativa molto eterogenea con dimorfismi craniofacciali e arti anomali. E' stata suggerita una certa ereditarietà vista la parentela di alcuni pazienti affetti; la quota di mortalità è molto alta tra i 50 casi riportati fino ad ora.

Dall'analisi degli steroli di linee di fibroblasti di un paziente, coltivati in mezzo delipidato, sono stati riscontrati alti livelli di lanosterolo e deidrolanosterolo suggerendo un blocco dell'enzima che catalizza la demetilazione sul carbonio 14, tuttavia l'analisi del gene non ha mostrato mutazioni. Una possibile spiegazione proposta per questo anomalo profilo sterolico potrebbe essere ricercato nell'espressione di una proteina regolatrice della demetilazione sul carbonio 14 (Kelley 2002).

### **1.9 Latosterolosi**

La latosterolosi è un difetto congenito della biosintesi del colesterolo, dovuto al deficit della 3-beta-idrossisterolo- $\Delta^5$ desaturasi (SC5D), associato a malformazioni, ritardo mentale ed epatopatia. La latosterolosi è stata osservata in due pazienti. Il primo caso era una bambina con anomalie congenite multiple, compresa la microcefalia, dismorfismi facciali, polidattilia postassiale al piede sinistro, sindattilia tra il II, III e IV dito del piede, ritardo psicomotorio grave, ipotonia assiale ed epatopatia. La paziente è tuttora vivente (Brunetti 2002, Rossi 2007). Il secondo caso è stato identificato retrospettivamente attraverso una analisi biochimica su colture di fibroblasti di un paziente deceduto. Il paziente presentava opacità corneali, ipertrofia gengivale, polidattilia postassiale bilaterale, sindattilia tra il II e il

III dito del piede, epato-splenomegalia e anomalie dei genitali, associati a sintomatologia neurologica, comprese le mioclonie, la demielinizzazione della sostanza bianca e le calcificazioni cerebrali (Krakowiak 2003 ). Nel primo caso, l'analisi degli steroli, eseguita mediante gas cromatografia e spettrometria di massa, ha mostrato alti livelli di latosterolo nel plasma e nei tessuti. Lo studio della biosintesi del colesterolo nei fibroblasti coltivati, ha dimostrato un blocco metabolico nella conversione del latosterolo in 7-deidrocolesterolo. L'attività enzimatica di SC5D misurata nei fibroblasti con un metodo radiometrico era circa il 10% rispetto ai controlli. L'analisi del gene ha mostrato la presenza di due mutazioni missenso: la 86 G→A che cambia l'arginina con una glutamina nell'esone 1 (R29Q) e la 632 G→A che sostituisce la glicina con l'acido aspartico nell'esone 4 (G211D).

### **1.10 La nutrizione parenterale totale**

La nutrizione parenterale (NP) è un approccio nutrizionale che si basa sulla perfusione di soluzioni che soddisfano i fabbisogni idro-elettrolitici, energetici, azotati, vitaminici e di oligoelementi di un individuo.

E' una terapia salvavita indispensabile per pazienti che non possono essere nutriti per via enterale (Wilmore 1968, Irving 2000, Naber 2005). Le principali indicazioni in età pediatrica sono:

- a) neonato pretermine non in grado di assumere, per via enterale, un adeguato apporto calorico e azotato;
- b) necessità di mettere a riposo in maniera prolungata il tratto gastroenterico per ridurre al minimo le secrezioni digestive;

c) malassorbimento incompatibile con la vita per significativa riduzione della superficie assorbitiva da resezione chirurgica (per enterite post chemio e/o radio-terapia addominale, diarrea severa protratta, diarrea congenita intrattabile);

d) situazioni di grave dismotilità intestinale (pseudo-ostruzione intestinale cronica, peritonite, paziente ustionato, paziente politraumatizzato, malnutrizione severa).

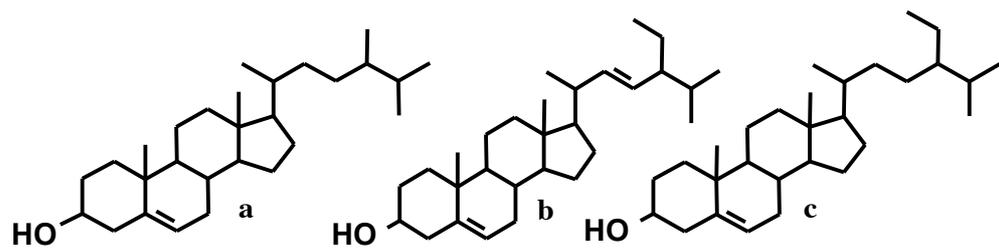
I lipidi sono somministrati sottoforma di emulsioni, con un contenuto in grassi che va dal 10% al 30%; la frazione lipidica deriva dall'olio di oliva o di soia ed è costituita principalmente da trigliceridi, fosfolipidi ed in quantità variabili da colesterolo e fitosteroli. La nutrizione parenterale però comporta una serie di complicanze epatiche che negli adulti si manifestano soprattutto con steatosi, mentre nei neonati la colestasi rappresenta il disagio maggiore (Kelly 1998). La durata della terapia è un fattore molto importante per lo sviluppo di tali complicanze (Colomb 2000, Colomb 2007). La colestasi grave, con sabbia o calcoli nei dotti biliari (Clayton, 1998), può progredire verso la fibrosi portale, la cirrosi e l'insufficienza epatica; per questo motivo, in tali pazienti, è spesso necessario il trapianto di intestino-fegato per la loro sopravvivenza. Inoltre, la colestasi dovuta a NP può essere associata alla drammatica riduzione del circolo enteroepatico, in seguito alla riduzione dell'intestino, con un'incidenza pari al 40-60% dei neonati che richiedono NP a lungo termine (Postuma 1979, Balestrieri 1983). Nonostante sia ormai certa la correlazione tra colestasi e nutrizione parenterale (PNAC; parenteral nutrition-associated cholestasis), i meccanismi fisiopatologici non sono chiari. Lo sviluppo delle complicanze sembra essere di origine multifattoriale

ed i fattori di rischio sembrano essere la nascita prematura, sepsi, ridotta motilità intestinale, sindrome da intestino corto, durata della NP e composizione delle soluzioni impiegate (Koletzko 1995). Nel 1993, Clayton, osservò un'alta concentrazione di fitosteroli nel plasma di un bambino di tre anni affetto da una severa colestasi associata a NP ed ipotizzò una relazione fitosteroli-colestasi.

### **1.11 I fitosteroli**

I fitosteroli sono composti molto simili chimicamente al colesterolo dal quale differiscono per i sostituenti sulla catena laterale. In natura esistono un gran numero di fitosteroli ma i più comuni, e legati in qualche maniera all'uomo, sono il campesterolo, lo stigmasterolo ed il sitosterolo e i loro analoghi saturi vale a dire il campestanolo ed il sitostanolo (figura 4).

I fitosteroli non sono sintetizzati dall'uomo ma vengono assunti dalla dieta, gli oli (oliva, girasole e soia) contengono una grande quantità di fitosteroli, essi sono presenti anche nel grano e nel fagiolo. Nonostante il notevole apporto giornaliero, i fitosteroli sono presenti solo in tracce nel plasma e nei tessuti in quanto il loro assorbimento intestinale è notevolmente ridotto grazie ad un meccanismo di escrezione cellulare mediato da trasportatori specifici di membrana, meccanismo che viene espresso anche a livello del sistema escretorio epatico (Ling 1995, Ellegard 2007, Ostlund 2002, Bjorkhem I 1995). I fitosteroli potenzialmente sono pericolosi in quanto è stato dimostrato che inibiscono l'enzima colesterolo 7  $\alpha$  idrossilasi che catalizza la conversione del colesterolo in acidi biliari (Arnon 1998, Shefer 1988 Setchell 1998)



**Figura 4:** i tre fitosteroli più presenti in natura differiscono dal colesterolo per i sostituenti sulla catena laterale: il campesterolo (a) presenta un metile in posizione 24, lo stigmasterolo (b) ha un doppio legame in 22 e un etile in 24, il sitosterolo (c) ha un etile in posizione 24.

## **2 OBIETTIVO DEL LAVORO**

Durante il periodo di dottorato mi sono occupato dello studio della latosterolosi, caratterizzando, in maniera più completa, il profilo biochimico della paziente affetta attraverso la messa a punto di un metodo di analisi degli steroli che vede l'impiego la gas cromatografia/ spettrometria di massa (GC/MS). Tale metodo ha permesso l'identificazione e la quantizzazione di tutti i metaboliti anomali presenti in questa sindrome. Sono stati analizzati gli steroli della paziente partendo da campioni di sangue intero e da campioni di feci, ma il metodo è applicabile all'analisi di tutti i liquidi biologici.

Inoltre, è stata studiata l'attività dell'enzima SC5D e delle sue forme mutate (SC5D 632 e SC5D 86) mediante l'espressione del gene in un organismo eucariotico ospite rappresentato da un ceppo di lievito *Saccharomyces Cerevisiae* mancante del gene SC5D (ceppo erg3).

Infine, nell'ultima parte del lavoro abbiamo studiato il profilo degli steroli, nel plasma e nelle membrane eritrocitarie, di neonati sottoposti ad un breve periodo di nutrizione parenterale totale; lo scopo è quello di comprendere e di individuare l'eventuale ruolo degli steroli e dei fitosteroli nello sviluppo delle epatopatie indotte dalla NP.

### **3 MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Campioni per la latosterolosi**

Durante un periodo di tre anni (2003-2006) sono stati raccolti periodicamente campioni di feci e campioni di sangue intero della paziente affetta da latosterolosi. I campioni sono stati forniti dall'Ospedale di Modena e dal Dipartimento di Pediatria del Policlinico di Napoli, Università "Federico II". Lo stesso Dipartimento di Pediatria ha fornito, durante questo periodo, alcuni campioni di feci di controllo di bambini sani e di bambini affetti da colestasi.

#### **3.2 Campioni per diagnosi di difetti della biosintesi del colesterolo**

I campioni dei pazienti provenivano dal Dipartimento dal Dipartimento di Pediatria del Policlinico di Napoli, Università "Federico II", dalla Pediatria della Seconda Università di Napoli e da altre strutture ospedaliere nazionali. I pazienti erano selezionati in base a segni e sintomi clinici riscontrabili nelle malattie causate da deficit enzimatici della biosintesi del colesterolo.

#### **3.3 Campioni per il dosaggio degli steroli nei pazienti sottoposti a NP**

I campioni di sangue intero sono stati forniti dall'Ospedale "Fatebenefratelli" di Napoli. I pazienti studiati (n=22) erano neonati di età compresa tra 1 e 46 giorni che ricevevano NP per almeno 3 giorni, la durata del trattamento era compresa, infatti, tra 3 e 15 giorni durante i quali sono stati somministrati da 0,5 a 2,7 g lipidi/kg peso/die, il prelievo del campione è stato effettuato dopo almeno 12-24 ore di sospensione della NP. Il gruppo dei controlli era rappresentato da neonati sani (n=15) di un giorno di vita ed, in parte, dagli stessi pazienti (n=11) a cui è stato prelevato un campione di sangue prima del

trattamento con NP. Le caratteristiche dei gruppi sono riportate nella tabella 1. Tra i due gruppi studiati non ci sono differenze statisticamente significative delle caratteristiche cliniche.

**Tabella 1: caratteristiche cliniche della popolazione studiata.**

	<b>NP</b>	<b>controlli</b>
	<b>(n=22)</b>	<b>(n=15)</b>
<b>Età gestazionale (settimane)</b>	34.0 ± 3,8	35,2 ± 3,6
<b>Peso alla nascita (grammi)</b>	2223 ± 965	2531 ± 982
<b>Maschi/Femmine</b>	12m \ 10f	7m\ 8f
<b>Giorni di vita (range)</b>	gen-46	0 - 1
<b>Giorni di terapia (range)</b>	feb-43	-
<b>Lipidi somministrati (g/kg/d range)</b>	0,5 - 2,7	-
<b>Colesterolo somministrato (mg/kg/d range)</b>	0,63 - 3,43	-
<b>Fitosteroli somministrati (mg/kg/d range)</b>	0,86 - 4,62	-

### **3.4 Solventi e standards per l'analisi degli steroli**

I reagenti ed i solventi utilizzati per l'analisi degli steroli sono stati acquistati dalla Sigma (St. Louis USA). Gli steroli usati come standards puri sono stati acquistati dalla Sigma e dalla Steraloids (Newport, USA) e sono stati preparati in soluzioni stock 1mg/ml utilizzando una miscela di solventi Cloroformio/Metanolo (2:1) e conservate in provette di vetro opache a 4° C.

### **3.5 Analisi dei marcatori biochimici di colestasi**

L'analisi della bilirubina totale, gammaglutamilpeptidasi (GGT), alanina transaminasi (ALT) è stata eseguita con una strumentazione automatica che utilizza micrometodi standards (Modular; Roche CH).

### **3.6 Analisi degli steroli plasmatici**

Dal sangue intero, in provetta con EDTA, dopo centrifugazione a 1500g per 5 minuti sono stati isolati plasma, buffy coat e globuli rossi. Per l'analisi degli steroli plasmatici, 50  $\mu$ l di plasma sono stati aggiunti a 2 ml di una soluzione di KOH 1 N in etanolo. Dopo incubazione a 80/85 °C per 1 h, sono stati aggiunti 2 ml di H<sub>2</sub>O distillata. L'estrazione è stata effettuata per 3 volte con 3 ml di esano agitando su vortex per almeno 30 secondi e recuperando la fase organica. Ogni volta l'esano è stato allontanato con un leggero flusso di azoto ad una temperatura di 40 °C. Per l'analisi in gas cromatografia/spettrometria di massa, gli steroli estratti devono essere derivatizzati con una miscela di 100  $\mu$ l di Bis trimetil silil trifluoracetamide (BSTFA), un reagente sililante, e di piridina (70:30, v/v) a 80 °C per 20 minuti, 1-2  $\mu$ l della miscela viene iniettato.

### **3.7 Analisi degli steroli cellulari**

La procedura di estrazione degli steroli dalle membrane delle emazie prevede il lavaggio dei globuli rossi con soluzione fisiologica in modo da eliminare residui di plasma, successivamente le cellule sono lisate con acqua distillata e tecniche meccaniche (congelamento-scongelo, sonicazione) alternando lavaggi con acqua distillata e centrifugazione a 3000g per 15 min per allontanare l'emoglobina. Le membrane sono state omogenate manualmente, sul campione così preparato è stato eseguito il dosaggio delle proteine totali (metodo Bradford) e su un'aliquota di omogenato, pari ad 0.5 mg di proteine totali, è stata effettuata l'estrazione degli steroli. Al pellet di cellule sono stati

aggiunti 2 ml di KOH in etanolo e gli steroli sono stati estratti con la stessa procedura descritta in precedenza per il plasma.

### **3.8 Analisi degli steroli fecali**

Al campione di feci (5-10 g) è stata aggiunta una soluzione di KOH 1 N in etanolo (10-20ml). La sospensione è stata omogenata mediante riscaldamento a 50° per 1 ora sotto agitazione elettromagnetica, seguita da agitazione per 10 ore a 4° C.

Dopo l'aggiunta di un volume uguale di acqua distillata, il campione è stato diviso in aliquote da 5 ml in provette di vetro ed estratto con 5 ml di esano tenendo il campione sotto agitazione per 30 min a 4° C. Dopo centrifugazione circa 2000 rpm per circa 15 minuti, la fase organica è stata recuperata e portata a secco con un leggero flusso di azoto.

### **3.9 Gas cromatografia/spettrometria di massa**

E' stato utilizzato un gas cromatografo/spettrometro di massa (GC/MS): modello GC 8000 series/ MD 800 della Fisons equipaggiato con una colonna HP-MS (lunghezza 25m x 0,2 mm diametro x 0,33 µm di film adesivo al capillare) (Guzzetta 2006). La temperatura dell'iniettore e del detector erano a 280° C. La temperatura iniziale del forno partiva da 275° C ed aumentava di 1° C al minuto fino ad una temperatura finale di 300° C. La durata dell'intera corsa cromatografia era di 25 minuti. L'Elio, erogato come gas di trasporto, era regolato ad un flusso di 20 ml al minuto con una velocità in colonna di 45 cm al secondo.

Lo spettrometro di massa accoppiato al GC è dotato di una sorgente ad impatto elettronico con una corrente di 70 eV ed analizzatore quadrupolare, la temperatura della sorgente è 200° C.

Il nostro laboratorio dispone di un metodo qualitativo e quantitativo per l'analisi degli steroli mediante GC/MS (Gazzetta 1996) che è impiegato per la diagnosi biochimica dei pazienti affetti da difetti della biosintesi del colesterolo (SLOS, latosterolosi, CDPX, desmosterolosi). Il metodo permette di ottenere un'attendibile e riproducibile separazione degli steroli, il programma dello spettrometro di massa accoppiato al gas cromatografo permette di eseguire l'analisi sia nella modalità SCAN ossia con una scansione completa di tutti gli ioni di frammentazione compresi tra i 50 *m/z* ed i 500 *m/z*, sia nella modalità SIM utilizzando solo pochi ioni scelti in base alla loro specificità e abbondanza. L'analisi qualitativa e quantitativa degli steroli viene effettuata mediante una doppia corsa cromatografica: la prima corsa viene effettuata utilizzando il programma a scansione ionica completa che permette l'identificazione del composto mediante l'interpretazione dello spettro di massa o per confronto dello spettro con una libreria di spettri di massa e/o di standards. La seconda corsa cromatografica è effettuata in modalità SIM monitorando, per ogni analita, solo pochi ioni caratteristici, scelti in base alla loro abbondanza ed alla loro specificità.

Sono state eseguite curve di calibrazioni sia in modalità SCAN sia in modalità SIM per i seguenti steroli: colesterolo, latosterolo, 7 deidrocolesterolo e sitosterolo utilizzando come standard interno il 5 $\alpha$  colestano (50  $\mu$ l di una soluzione di 50  $\mu$ g/ml); gli steroli per i quali non è stato possibile costruire le curve di calibrazione sono stati quantizzati

mediante il rapporto delle aree totali dei picchi cromatografici acquisiti in SCAN.

### **3.10 Mezzi di coltura**

I mezzi di coltura utilizzati per la crescita batterica sono stati:

- LB-agar: agar 1,5% (p/v), estratto di lievito 0,5% (p/v), caseina 1%(p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,2;
- LB: estratto di lievito 0,5% (p/v), caseina 1%(p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,2.

I mezzi di coltura per la crescita dei lieviti sono stati:

- YPD: estratto di lievito 1% (p/v), destrosio 2% (p/v), bacto peptone 2% (p/v), per le piastre agar 2% (p/v);
- SC Minimal Medium: estratto di lievito 0,67% (p/v) senza aminoacidi, glucosio 2% (p/v), aminoacidi 0,01% (arginina, cistina, leucina, lisina, treonina, triptofano), adenina 0,01%, aminoacidi 0,005 (aspartato, istidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tiroxina, valina), per le piastre agar 2% (p/v).

### **3.11 Ceppo di lievito per lo studio dell'enzima SC5D wild tipe e delle sue forme mutate SC5D 632 e SC5D 86**

I plasmidi contenenti il gene SC5D ed utilizzati negli esperimenti sono: pYes SC5D col gene wild-type umano della SC5D; pYes SC5D 86 col gene recante la mutazione 86 G→A; pYes SC5D 632 col gene recante la mutazione 632 G→A e sono stati ottenuti mediante clonaggio del frammento di cDNA di

interesse nel plasmide pYes 2 (Invitrogen) il quale consta di 5856 nucleotidi e contiene:

- ♣ promotore GAL 1 che consente di ottenere alti livelli di espressione della proteina nel lievito mediante stimolazione con galattosio;
- ♣ promotore T7 che permette la trascrizione in vitro con orientazione senso;
- ♣ sito multiplo di clonaggio polilinker che permette l'inserzione del gene;
- ♣ CYC1 per una efficiente terminazione trascrizionale del mRNA;
- ♣ URA 3 gene per la selezione delle cellule di lievito trasformate cresciute in mezzo privo di uracile;
- ♣ amp<sup>r</sup> che conferisce la resistenza all'ampicillina per la selezione dei trasformanti in E.Coli.

Con i suddetti costrutti sono state trasformate le cellule di lievito *Saccharomyces Cerevisiae* appartenenti ad un ceppo mancante del gene SC5D (ceppo erg3) secondo il protocollo consigliato dal produttore (Invitrogen pYes2 catalogo n° V825-20).

### **3.12 Metodo di isolamento dei microsomi**

Le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 10 min a 4° C, il pellet è stato lavato con 30 ml di un tampone contenente KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 4 + 1,5 mM glutazione ridotto + 30 mM nicotinamide. Dopo aver recuperato il pellet si centrifuga a 1500 rpm per 10 min a 4° C.

Per isolare i microsomi si risospende il pellet in 20 ml di un tampone contenente KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,4 + 1,5 mM glutazione ridotto + 30 mM

nicotinamide. Le cellule sono state lisate mediante French Press, il campione è stato centrifugato a 7956 rpm per 30 min a 4°C, il surnatante si ultracentrifuga a 45000 rpm per 1h e 45 min, il pellet viene recuperato e risospeso in 1,5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH 7,4 + 3 mM glutatione ridotto + glicerolo 20%, infine il campione, contenente i microsomi, è stato omogenato manualmente con potter di vetro.

### **3.13 Metodi per l'analisi delle proteine**

La concentrazione delle proteine è stata determinata con il metodo di Bradford, utilizzando il kit BIO-RAD Protein Assay come reagente e l'albumina di siero bovina come standard di calibrazione. Il controllo della trasformazione è avvenuto mediante Western blotting. I campioni proteici sono stati risospesi in 25 mM Tris HCl, pH 8,8, contenente SDS 1% (p/v), 0,7 M  $\beta$ -mercaptoetanololo, glicerolo 5% (v/v) e bromofenolo blu 0,01% (p/v) e poi bolliti 5 minuti prima di essere caricati sul gel, secondo la procedura descritta da Laemmli (1970). Per la determinazione della massa molecolare dei campioni analizzati sono state impiegate le seguenti proteine di riferimento: transferrina (80 kDa), albumina di siero bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrasi carbonica (29 kDa) e citocromo *c* (12 kDa).

Per l'analisi mediante Western blotting, i campioni proteici separati mediante SDS-PAGE sono stati trasferiti su membrana Immobilon P (Millipore) mediante il sistema Mini Trans Blot (Bio-Rad) in tampone Tris-HCl 20mM, glicina 160mM, pH 8,3, contenente metanolo 10% (v/v). Il filtro è stato incubato prima per 1 ora a temperatura ambiente in tampone PBS contenente latte in polvere 5% (p/v), e poi per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo

policonale anti SC5D (PRIMM), diluito 1:3000 in PBS contenente latte 2% (p/v). Il filtro poi è stato lavato con PBS contenente Tween-20 0,005% (v/v) ed, infine, incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario ( diluizione 1:30000, di goat anti-rabbit, IgG-HRP, Santa Cruz). Il segnale di chemoluminescenza è stato visualizzato mediante il Kit SuperSignal West Pico (Pierce).

### **3.14 Attività enzimatica di SC5D e delle due forme mutate**

Per i saggi di attività enzimatica, sui microsomi preparati, sono state utilizzate aliquote pari ad 1 mg di proteine microsomiali. La reazione avviene in provette di vetro da 15 ml avvolte in carta argentata per evitare la degradazione del prodotto da parte della luce, alle provette si aggiungono 0,4 ml di latosterolo (1g/l), si porta a secco con azoto e si aggiungono 50 µl di Tween 80 (15g/L), la soluzione viene sonicata per 10 minuti. Un'aliquota di microsomi pari ad 1 mg di proteine viene aggiunta alla soluzione e portata ad un volume di 0,5 ml con il tampone di reazione (tampone fosfato 0,1 M + glutatione ridotto 1,5 mM + nicotinamide 30 mM). La reazione inizia con l'aggiunta di NADH (500µM), l'incubazione avviene a 30° C per 60 min agitando ogni 5 minuti. La reazione è bloccata con 3 ml di KOH/ETOH 1 N, si aggiunge poi un uguale volume di acqua e si procede all'estrazione degli steroli con esano (3x 5ml) secondo il protocollo descritto in precedenza.

### **3.15 Analisi dei prodotti**

Per l'analisi quantitativa del 7 deidrocolesterolo (7 dhc) e dell'ergosterolo è stato utilizzato un metodo cromatografico in HPLC (modello Series 4;

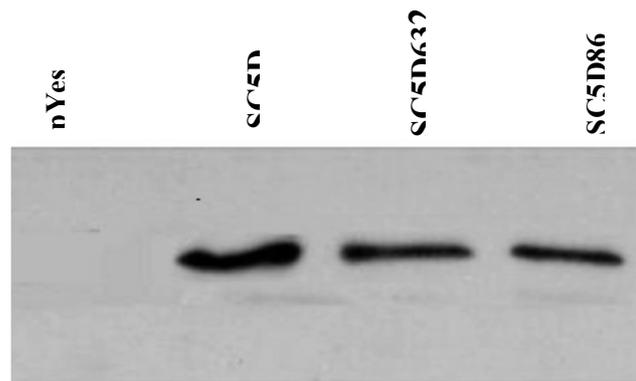
Perkin-Elmer) con una colonna Hypersil C18 a fase inversa (Phenomenex 150mm x 4,6 mm), la fase mobile è costituita da metanolo/acqua (99,7/0,3). Il flusso è di 0,5 ml/min per 5 minuti per la fase di equilibrio mentre durante la corsa il flusso è di 1 ml al minuto, il rivelatore UV è stato settato a 282 nm cioè ad una lunghezza d'onda selettiva per 7 dhc e dell'ergosterolo (doppio legame coniugato). La pressione massima impostata è 17,5 MPa.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 Western blotting

I campioni dei microsomi dei ceppi pYes, SCD, SCD-632 ed SCD-86 sono stati analizzati mediante Western blotting per controllare l'efficacia della trasformazione. La figura 5 mostra che il campione contenente il vettore vuoto pYes non presenta segnale mentre è presente la banda del segnale negli altri tre campioni. (SC5D, SC5D 632, SC5D 86).

I risultati del Western blotting sono stati, in seguito, confermati dai saggi di attività enzimatica.

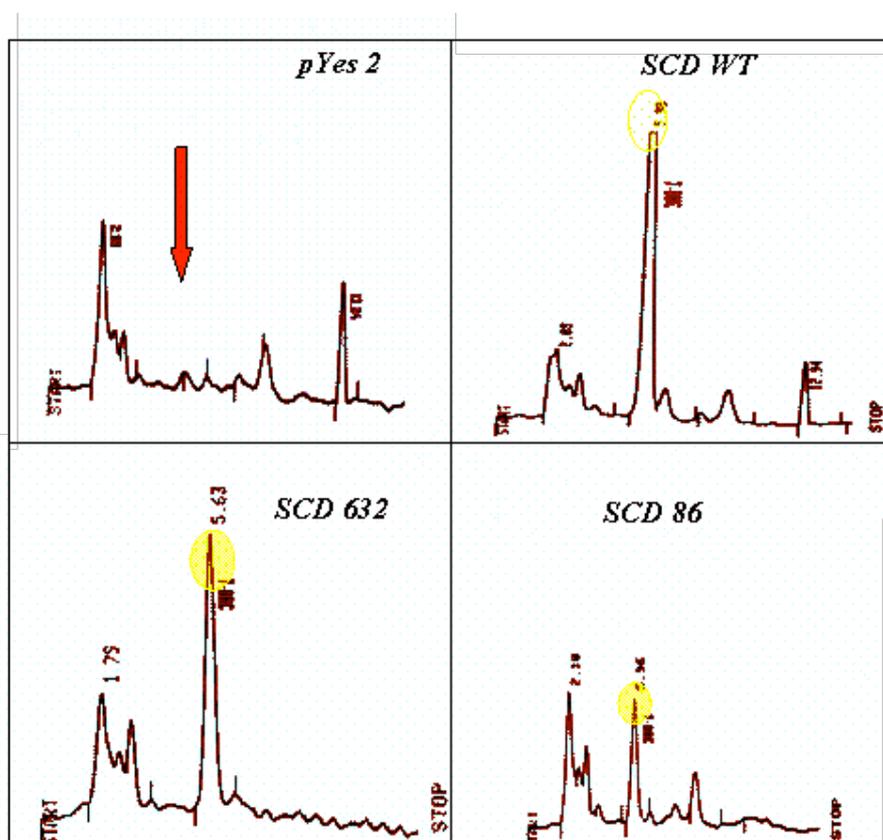


**Figura 5:** analisi Western blotting, il segnale anti SC5D non è presente nel vettore pYes.

#### 4.2 Attività enzimatica dell' enzima SC5D delle sue forme mutate

Sono stati eseguiti determinazioni di attività enzimatica sia *in vivo* andando a valutare il contenuto di ergosterolo dei vari ceppi cellulari, sia andando a valutare la quantità di ergosterolo e 7 dhc *in vitro*, dopo aver inoculato per 1h e 30' i microsomi dei vari ceppi in presenza di latosterolo.

La figura 6 mostra i cromatogrammi in HPLC degli steroli estratti dai microsomi dei ceppi pYes, SC5D, SC5D 632 e SC5D 86.

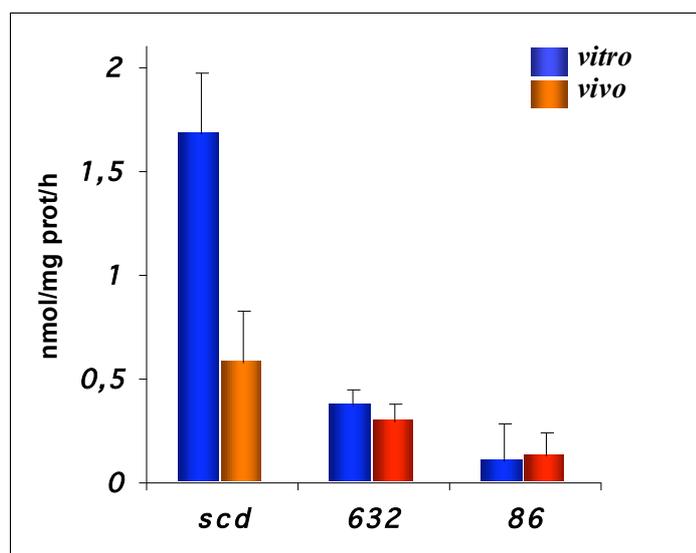


**Figura 6:** analisi in HPLC dell'ergosterolo estratto dai microsomi dei 4 ceppi di lievito trasformati, l'assenza del picco nel ceppo pYes conferma il risultato del Western blotting.

Il picco dell'ergosterolo è presente nell'estratto SC5D e, in maniera meno intensa, negli estratti microsomiali delle due forme mutate, mentre nell'estratto pYes (vettore mancante SC5D) non è presente l'ergosterolo.

Le quantità di ergosterolo prodotte *in vivo* e di ergosterolo + 7 deidrocolesterolo prodotte *in vitro* sono confrontate nell'istogramma riportato nel grafico in figura 7.

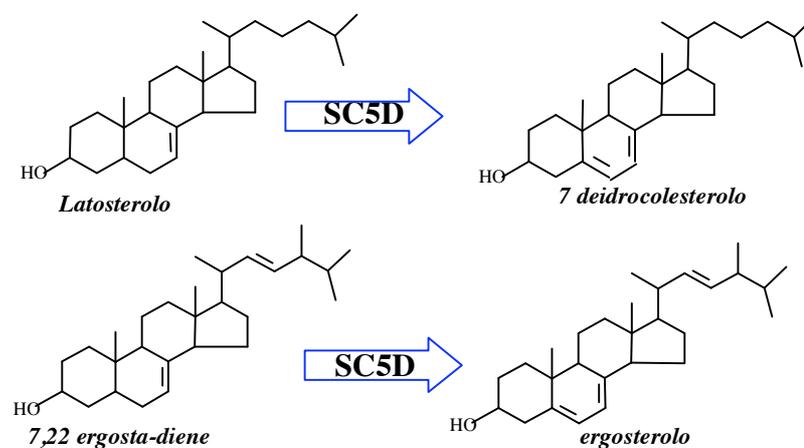
In *vivo*, le cellule di lievito trasfettate con il gene SC5D producevano ergosterolo in quantità maggiori ( $0,58 \pm 0,25$  nmol/mg-prot/ora) rispetto alle cellule trasfettate con i geni SC5D 86 e SC5D 632 ( $0,13 \pm 0,09$  nmol/mg-prot/ora e  $0,29 \pm 0,11$  nmol/mg-prot/ora rispettivamente); *in vitro* l'attività di SC5D della frazione microsomiale di erg3 è pari a  $1,68 \pm 0,29$  nmol/mg-prot/ora mentre nelle cellule trasfettate con SC5D 86 e SC5D 632 le attività sono rispettivamente  $0,10 \pm 0,08$  nmol/mg-prot/ora e  $0,37 \pm 0,18$  nmol/mg-prot/ora.



**Figura 7:** quantità di ergosterolo prodotto *in vivo* (blu) ed *in vitro* (rosso) espresso in nmol/mg prot/ora.

I risultati dimostrano che le attività residue delle due mutazioni sono significativamente più basse rispetto a SC5D sia *in vivo* che *in vitro* e sono anche differenti fra loro. L'attività enzimatica di SCD-632 è rispetto a SCD wt circa il 50% *in vivo* e circa il 22% *in vitro*, mentre per quanto riguarda SCD-86 l'attività enzimatica rispetto a SCD wt è circa il 22% *in vivo* e circa il 6% *in vitro*.

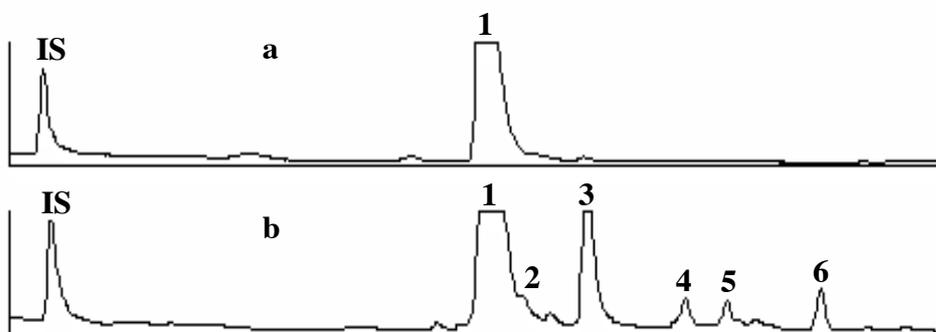
Inoltre il gene umano SC5D corregge il difetto metabolico di *erg3*, ovvero agisce in maniera aspecifica sul substrato vegetale (7,22 ergosta-diene-3 $\beta$ -olo) contenuto in *erg3*. Il substrato vegetale presenta rispetto al latosterolo un doppio legame in posizione 22 e un metile sul carbonio 24.



**Figura 8:** L'enzima SC5D catalizza la trasformazione del latosterolo a 7 deidrocolesterolo mediante la formazione di un doppio legame in posizione 5; esperimenti su ceppi di lievito hanno dimostrato che l'enzima utilizza anche il substrato vegetale (7,22 ergosta-diene) trasformandolo in ergosterolo (5,7,22 triene).

### 4.3 Steroli plasmatici nella Latosterolosi

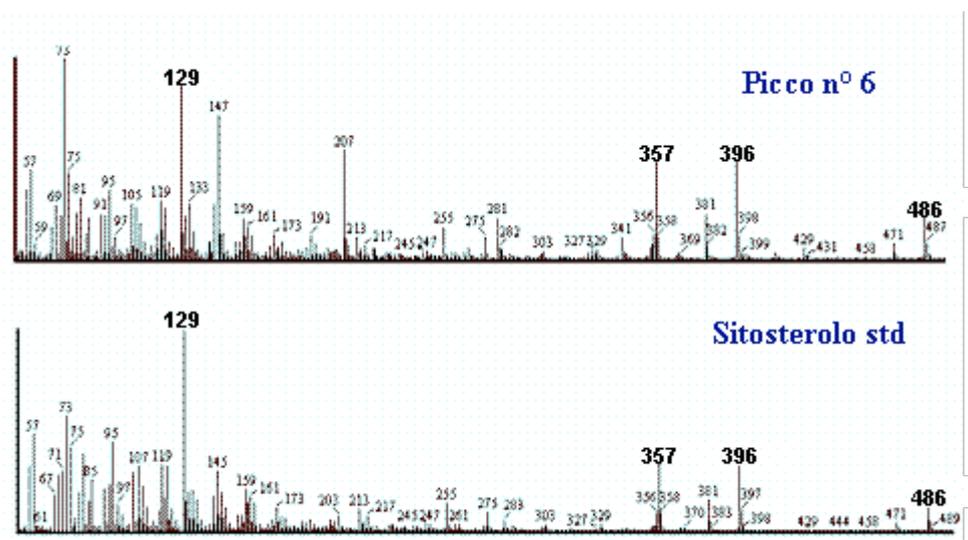
Il profilo degli steroli plasmatici della paziente affetta da latosterolosi è riportato nella figura 9. Il cromatogramma è confrontato con quello di un controllo sano, il cromatogramma è normalizzato sull'abbondanza dello SI. E' possibile notare che nella paziente è presente, oltre il colesterolo (1), il picco del latosterolo (3) più una serie di altri picchi meno intensi (4,5,6) mentre il soggetto sano presenta solo il picco del colesterolo.



**Figura 9:** il profilo GC/MS degli steroli plasmatici della paziente (b) confrontato con un controllo (a); nella latosterolosi oltre al colesterolo (1) sono presenti il latosterolo (3) ed altri 3 picchi (4,5,6).

Lo spettro di massa del composto n°6 è riportato nella figura 10 ed è confrontato con lo spettro di massa ricavato da uno standard puro di sitosterolo.

La presenza di tutti gli ioni caratteristici in entrambi gli spettri ( $m/z$  129, 357, 396, 486) permette di identificare il composto n°6 come il sitosterolo, uno sterolo vegetale. In particolare la presenza del frammento a  $m/z$  129 è tipico del meccanismo di frammentazione di tutti gli steroli con un doppio legame in posizione 5. Allo stesso modo i picchi 4 e 5 sono stati identificati come campesterolo e stigmasterolo.



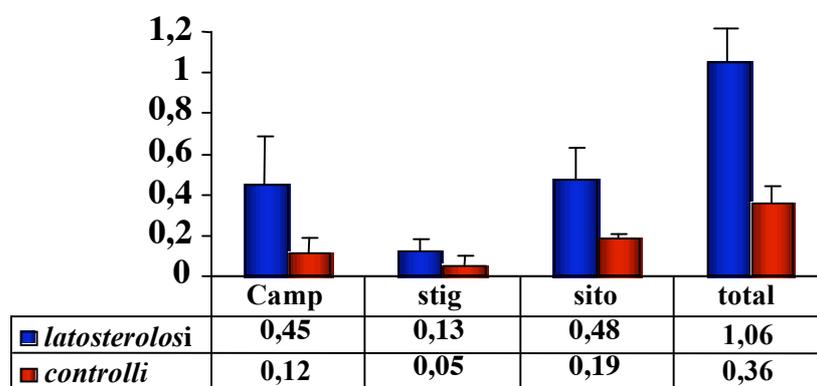
**Figura 10:** lo spettro di massa del picco n°6 confrontato con il sitosterolo standard; entrambi sono esterificati con TMS.

La paziente affetta da latosterolosi presenta valori di colesterolo nella norma mentre la percentuale di latosterolo plasmatico è molto più alta rispetto ai valori di riferimento: infatti è mediamente pari 9,5 % degli steroli totali contro lo 0,12 % dei valori di riferimento. Inoltre, durante un periodo compreso tra il 2003 ed il 2006, la percentuale di latosterolo è rimasta costante, come riportato nella tabella 2.

**Tabella 2: percentuale di colesterolo e latosterolo 2002-06.**

CAMPIONE	% Colesterolo	% Latosterolo
2003	87,4	10,8
2004	90,9	7,9
2005	89,4	9,6
2006	88,9	9,7
<b>Media</b>	<b>89,15 ± 1,44</b>	<b>9,5 ± 1,2</b>
<b>CONTROLLI (n=28)</b>	<b>99,45 ± 0,17</b>	<b>0,12 ± 0,07</b>
<i>*test t di student tra campioni e controlli per dati non appaiati</i>	<i>*p 0,001</i>	<i>*p 0,001</i>

Nella paziente, oltre all'aumento di latosterolo, si osserva un incremento dei livelli di tre fitosteroli (campesterolo, stigmasterolo, sitosterolo). La loro percentuale totale è circa tre volte maggiore rispetto ai valori di riferimento (fig 11). In altri pazienti affetti da altri difetti della biosintesi del colesterolo, (es. pazienti SLOS), l'analisi degli steroli plasmatici ed ematici effettuata nel nostro laboratorio è sempre risultata negativa per la presenza dei fitosteroli.

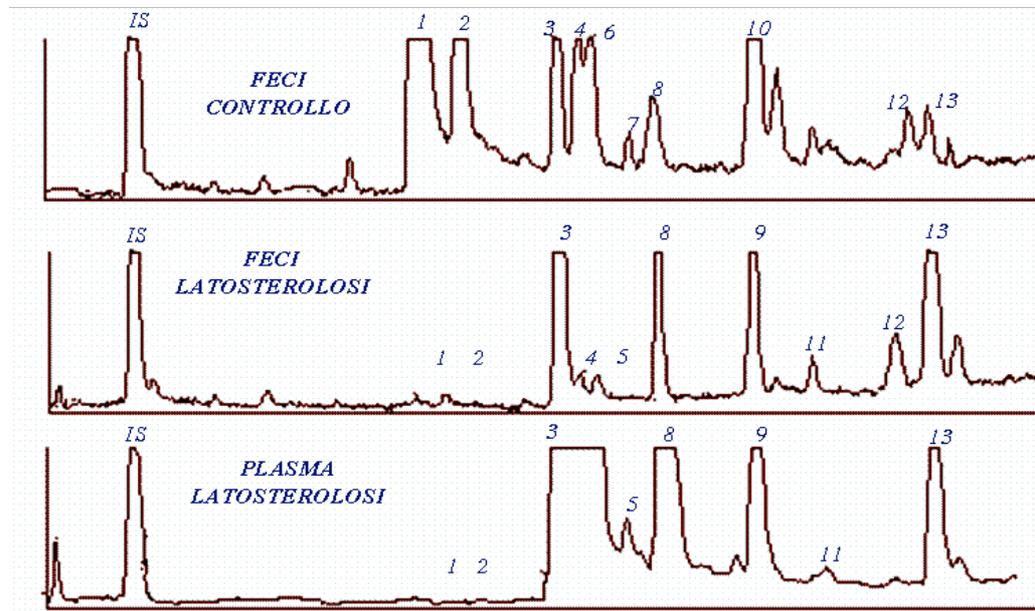


*Figura 11:* confronto dei livelli plasmatici dei fitosteroli.

#### 4.4 Steroli fecali nella latosterolosi

La figura 12 mostra il confronto tra il profilo degli steroli fecali dei controlli ed i profili degli steroli plasmatici e fecali della paziente. Nella latosterolosi, i profili degli steroli plasmatici e fecali sono perfettamente sovrapponibili come numero di steroli presenti. Il profilo degli steroli fecali della paziente affetta da latosterolosi differisce, in maniera netta, dal profilo degli steroli fecali dei controlli sia per la quantità totale che per numero di steroli escreti; nella latosterolosi ritroviamo principalmente 4 picchi mentre nei controlli i picchi più abbondanti sono 13. L'analisi quantitativa è mostrata nella tabella 3; la quantità totale di steroli estratti dalle feci della paziente affetta da latosterolosi è più bassa rispetto ai controlli sani ed ai controlli con colestasi. I

principali steroli escreti nella latosterolosi sono il colesterolo (circa il 50% degli steroli totali escreti), il latosterolo, il campesterolo ed il sitosterolo; le quantità escrete di questi tre steroli sono molto più elevate rispetto sia ai soggetti sani che ai soggetti con colestasi. Nella latosterolosi sono totalmente assenti il coprostanolo ed il coprostanone che invece rappresentano circa il 60% degli steroli escreti nei controlli. Il coprostanolo ed il coprostanone sono due prodotti di degradazione del colesterolo che si formano a livello intestinale grazie all'azione di enzimi batterici che catalizzano la reazione di riduzione del doppio legame in 5 e l'ossidazione del gruppo OH in 3 del colesterolo. L'assenza di questi composti nelle feci della paziente potrebbe essere dovuta ad un maggior assorbimento intestinale del colesterolo che, essendo prodotto dall'organismo in quantità minori, a causa del deficit enzimatico, viene sottratto all'azione degli enzimi batterici.



**Figura 12:** profili degli steroli normalizzati con lo standard interno (IS) eseguiti in GC/MS: IS: 5 $\alpha$  colestano (rrf:1), 1: coprostanolo (1,401), 2: coprost-3-one (1,460), 3: colesterolo (1,595), 4: uk 1 (1,624), 5: zimosterolo (1,648), 6: uk 2(1,708), 7: uk 3 (1717), 8: latosterolo (1,728), 9: campesterolo (1,865), 10: uk 4 (1,868), 11: stigmasterolo (1,946), 12: lanosterolo (2,077), 13: sitosterolo (2,114).

**Tabella 3: analisi quantitativa degli steroli fecali (mg/g feci fresche).**

	<b>Latosterolosi (n=4)</b>	<b>Controlli (n=3)</b>	<b>Colestasi (n=3)</b>
<b>Estratto totale</b>	6022 ± 60	9243 ± 2192	16533 ± 3325
<b>Coprostanolo</b>	0,61 ± 0,71	5875 ± 2531	3627 ± 6281
<b>Coprostanone</b>	0,70 ± 0,68	436 ± 292	11,8 ± 19,2
<b>Colesterolo</b>	2763 ± 315	928 ± 628	3830 ± 3351
<b>Uk 1</b>	15,4 ± 21,5	98 ± 57	43 ± 71
<b>Zimosterolo</b>	42,3 ± 24,9	14,9 ± 28,8	15 ± 22
<b>Uk 2</b>	26,2 ± 47,8	201 ± 208	1,3 ± 1,5
<b>Uk 3</b>	0,70 ± 0,68	7,4 ± 16,8	1,5 ± 1,3
<b>Latosterolo</b>	723 ± 236	161 ± 114	160 ± 182
<b>Campesterolo</b>	600 ± 207	0,50 ± 0.43	127 ± 118
<b>Uk 4</b>	5,01 ± 12,3	1302 ± 720	298 ± 503
<b>Stigmasterolo</b>	127,5 ± 36,5	56,2 ± 72,5	112 ± 39
<b>Lanosterolo</b>	16,0 ± 18,7	42,9 ± 11,6	20 ± 11
<b>Sitosterolo</b>	1685 ± 190	327 ± 259	490 ± 295

In conclusione di questa prima parte possiamo affermare che, nella latosterolosi, gli alti livelli di latosterolo nelle feci confermano ulteriormente il difetto enzimatico, i metaboliti anomali presenti sia nel plasma che nelle feci sono stati identificati come fitosteroli: in particolare campesterolo, stigmasterolo e sitosterolo; gli elevati livelli di fitosteroli plasmatici potrebbero essere dovuti ad una alterazione del circolo e/o del metabolismo entero-epatico degli steroli. Gli elevati livelli di fitosteroli nel plasma e nei tessuti della paziente affetta da latosterolosi potrebbero concorrere allo sviluppo della colestasi. La relazione tra livelli di fitosteroli e lo sviluppo della colestasi è stato al centro di molti studi riguardanti, in particolare, i neonati sottoposti a terapia parenterale totale (NP). Nell'ultima parte del mio dottorato è stato eseguito un lavoro di monitoraggio degli steroli plasmatici ed ematici in pazienti (neonati) sottoposti a NP ed in un gruppo di pazienti

sani nel 1° giorno di vita. Ad 11 pazienti del gruppo NP è stato eseguito anche un prelievo basale.

#### 4.5 Livelli dei marcatori biochimici di colestasi

Per i pazienti sottoposti a NP e per i due gruppi dei controllo sono stati determinati i valori di bilirubina totale, ALT, e GGT, ovvero dei marcatori biochimici di colestasi. I valori medi dei tre gruppi non hanno mostrato differenze significative tranne per la bilirubina, la cui concentrazione è circa il doppio rispetto ai controlli (tabella 4).

**Tabella 4: confronto dei marcatori biochimici di colestasi.**

	<b>Controlli (n=15)</b>	<b>Pazienti t 0 (n=11)</b>	<b>Pazienti NP (n=22)</b>
<b>Bil Totale</b>	1,6 ± 0,7	3,5 ± 2,0*	3,73 ± 3,2*
<b>GGT</b>	72 ± 19	143 ± 100	122 ± 99
<b>ALT</b>	10,0 ± 4,2	15,9 ± 15,4	20,8 ± 25,1

*\*Valori statisticamente significativi rispetto ai controlli (p<0.005)*

#### 4.6 Steroli plasmatici ed ematici in pazienti sottoposti a NP

Nella tabella 5 sono riportati i valori di colesterolo e dei fitosteroli (phy) nel plasma dei pazienti in NP che risultano statisticamente differenti da quelli dei controlli e quelli dei pazienti nello stato basale. In particolare, i valori plasmatici di sitosterolo e campesterolo sono rispettivamente sei e tre volte maggiori rispetto ai due gruppi di controllo. Anche la percentuale dei fitosteroli totali (la somma di sitosterolo, stigmasterolo e campesterolo) sul totale degli steroli plasmatici nei pazienti è circa 3-4 volte maggiore rispetto ai controlli.

**Tabella 5: steroli in plasma (mg/dl).**

	<b>controlli</b>	<b>Prima NP</b>	<b>dopo NP</b>
	<b>(n=13)</b>	<b>(n=11)</b>	<b>(n=22)</b>
<b>Colesterolo</b>	74,3 ± 20,4	80,1 ± 20	115 ± 21 °*
<b>7 dhc + desmosterolo</b>	0,06 ± 0,06	0,04 ± 0,03	0,09 ± 0,07
<b>Latosterolo</b>	0,24 ± 0,22	0,28 ± 0,26	0,20 ± 0,28
<b>Campesterolo</b>	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,24	0,50 ± 0,46 °*
<b>Stigmasterolo</b>	0,09 ± 0,07	0,14 ± 0,19	0,35 ± 0,32 °*
<b>Sitosterolo</b>	0,16 ± 0,19	0,19 ± 0,20	1,07 ± 0,84 °*
<b>Phy Totali</b>	0,36 ± 0,30	0,52 ± 0,45	2,30 ± 1,57 °*
<b>(Camp+Stig+Sito)</b>			
<b>Phy Total</b>	0,49 ± 0,34	0,66 ± 0,53	2,02 ± 1,33 °*
<b>(% steroli totali)</b>			
<b>°p&lt; 0,05 vs controlli</b>			
<b>*p&lt; 0,05 vs tempo 0</b>			

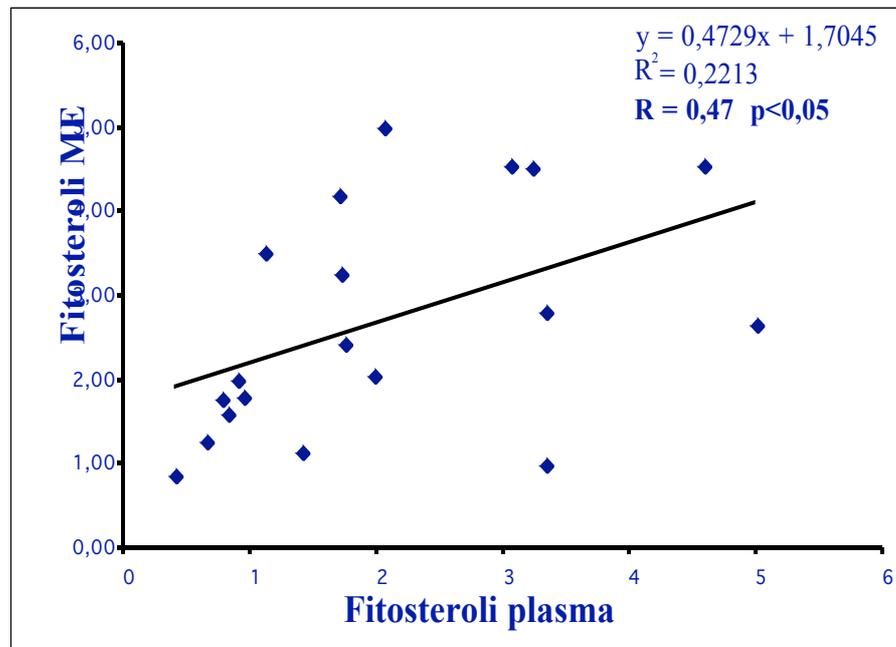
Nelle membrane eritrocitarie (ME) i valori di phy sono statisticamente differenti tra pazienti e controlli. Nei pazienti, il sitosterolo è circa nove volte più abbondante rispetto ai controlli mentre la quantità di campesterolo è circa tre volte maggiore, infine la percentuale di phy totali sugli steroli totali è circa cinque volte maggiore (tabella 6).

**Tabella 6: steroli nelle ME (mg/g di proteine).**

	<b>controlli</b>	<b>Prima NP</b>	<b>dopo NP</b>
	<b>(n=13)</b>	<b>(n=11)</b>	<b>(n=22)</b>
<b>Colesterolo</b>	124 ± 39	126 ± 20	119 ± 91
<b>7 dhc + desmosterolo</b>	0,09 ± 0,11	0,10 ± 0,13	0,15 ± 0,18
<b>Latosterolo</b>	0,57 ± 0,29	0,35 ± 0,17°	0,34 ± 0,35°
<b>Campesterolo</b>	0,33 ± 0,52	0,28 ± 0,23	0,98 ± 0,77 °*
<b>Stigmasterolo</b>	0,10 ± 0,04	0,16 ± 0,14	0,77 ± 0,80 °*
<b>Sitosterolo</b>	0,13 ± 0,19	0,24 ± 0,20	1,81 ± 1,18 °*
<b>Phy Totali</b>	0,54 ± 0,63	0,64 ± 0,54	3,42 ± 1,84 °*
<b>(Camp+Stig+Sito)</b>			
<b>Phy Total</b>	0,43 ± 0,40	0,51 ± 0,37	2,50 ± 1,33 °*
<b>(%steroli totali)</b>			
<b>°p&lt; 0,05 vs controlli</b>			
<b>*p&lt; 0,05 vs tempo 0</b>			

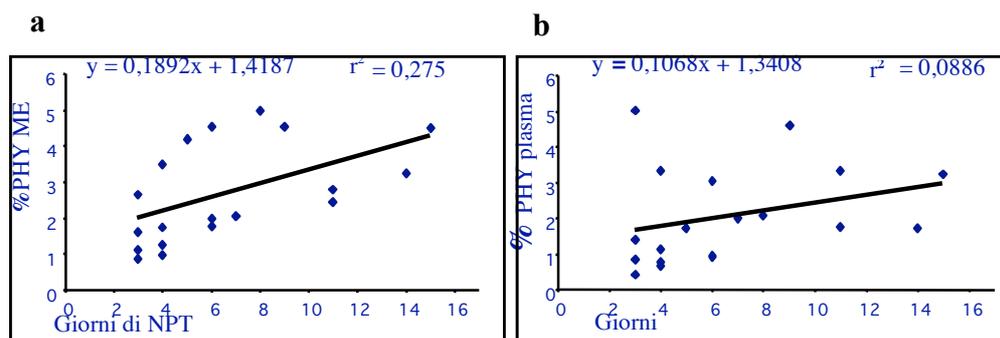
Nei pazienti, i valori dei fitosteroli totali (espressi come percentuale degli steroli totali) sono stati correlati mediante la correlazione di Pearson.

Si osserva una correlazione positiva e statisticamente significativa tra i valori di phy dei pazienti nel plasma e nelle emazie ( $r=0.47$ ;  $p< 0.05$ ) (figura 13).



**Figura 13:** correlazione tra la percentuale di phy nelle ME e nel plasma.

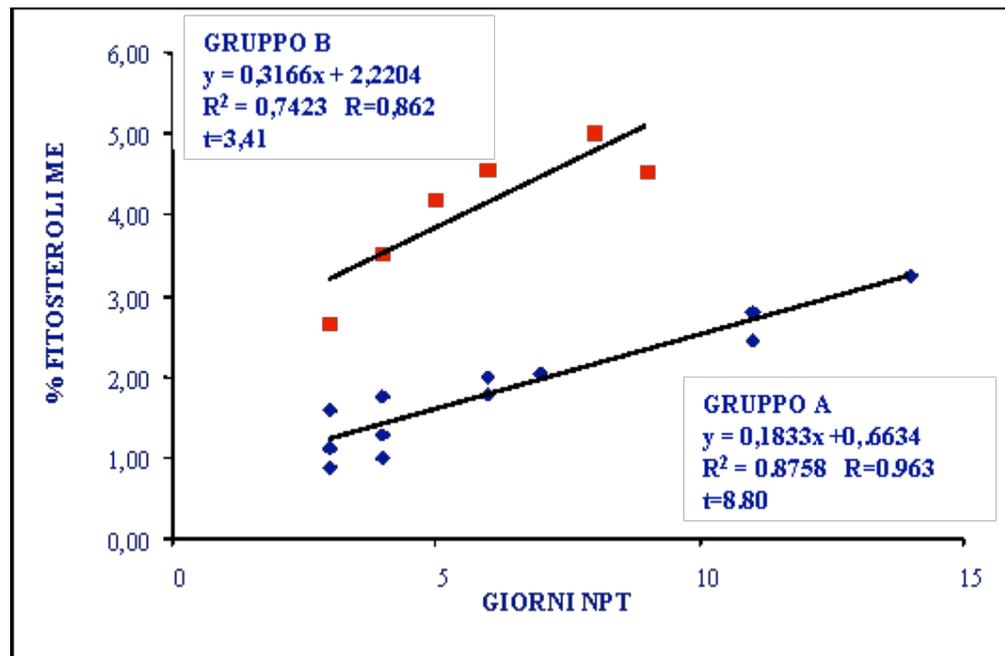
In questo studio i valori di phy nelle ME e nel plasma sono stati correlati con una serie di parametri. La durata della terapia (giorni) con la percentuale di fitosteroli nelle ME mostra una correlazione positiva e statisticamente significativa ( $r=0,52$ ;  $p< 0.05$ ) mentre nel plasma la correlazione è positiva ma non statisticamente significativa (figura 14a e 14b). Sono in accordo con questi risultati anche le correlazioni tra il carico totale dei lipidi (espresso in g totali di lipidi infusi) e le percentuali di phy: nelle ME la correlazione è positiva e statisticamente significativa ( $r=0,45$ ;  $p< 0.05$ ), nel plasma la correlazione è positiva ma non significativa ( $p=0,10$ ) (figura non mostrata).



**Figura 14:** incremento della percentuale di phy nelle ME (a) e nel plasma (b) rispetto ai giorni di terapia.

Osservando la figura 14a ed in parte anche la figura 14b è possibile notare che alcuni pazienti presentano un accumulo di fitosteroli, sia nel plasma che nelle ME, molto più elevato rispetto alla media sebbene trattati allo stesso modo. In effetti, il gruppo dei pazienti sottoposti a NP può essere suddiviso in due sottogruppi a seconda della loro posizione al di sotto ed al di sopra della linea di tendenza.

In figura 15 sono riportate le correlazioni tra i giorni di terapia ed il livello di phy (%) nelle ME, considerando in maniera indipendente i due sottogruppi. Le due rette hanno un coefficiente angolare molto diverso fra loro (0,18 per il sottogruppo A e 0,32 per il sottogruppo B); sia il sottogruppo A che il sottogruppo B presentano correlazioni positive e statisticamente significative (sottogruppo A:  $r=0,963$ ;  $p<0,01$ ; sottogruppo B:  $r=0,867$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 15:** correlazione % phy nelle ME dei due sottogruppi.

Le caratteristiche cliniche dei due sottogruppi sono riportate nella tabella 7.

Non ci sono differenze statisticamente significative tra l'età gestazionale, il peso alla nascita, il carico di lipidi e la durata della terapia dei due gruppi, mentre presentano un accumulo di fitosteroli diverso; in particolare i valori medi delle percentuali dei fitosteroli sia nel plasma che nelle ME del sottogruppo B sono circa il doppio rispetto ai valori del sottogruppo A.

**Tabella 7: confronto dei parametri tra gruppo A e gruppo B.**

	<b>Gruppo A</b>	<b>Gruppo B</b>
	<i>(n=11)</i>	<i>(n=6)</i>
<b>Età gestazionale (settimane)</b>	<b>33,91 ± 4,46</b>	<b>30,21 ± 3,27</b>
<b>Peso alla nascita (gr)</b>	<b>2345 ± 1189</b>	<b>2165 ± 1006</b>
<b>Giorni di terapia (range)</b>	<b>3-14</b>	<b>3-9</b>
<b>Lipidi totali somministrati (g/kg)</b>	<b>10,7 ± 10,2</b>	<b>8,9 ± 7,8</b>
<b>% fitosteroli totali in ME</b>	<b>1,72 ± 0,62</b>	<b>3,59 ± 0,87*</b>
<b>% fitosteroli totali nel plasma</b>	<b>1,34 ± 0,83</b>	<b>2,63 ± 1,58</b>

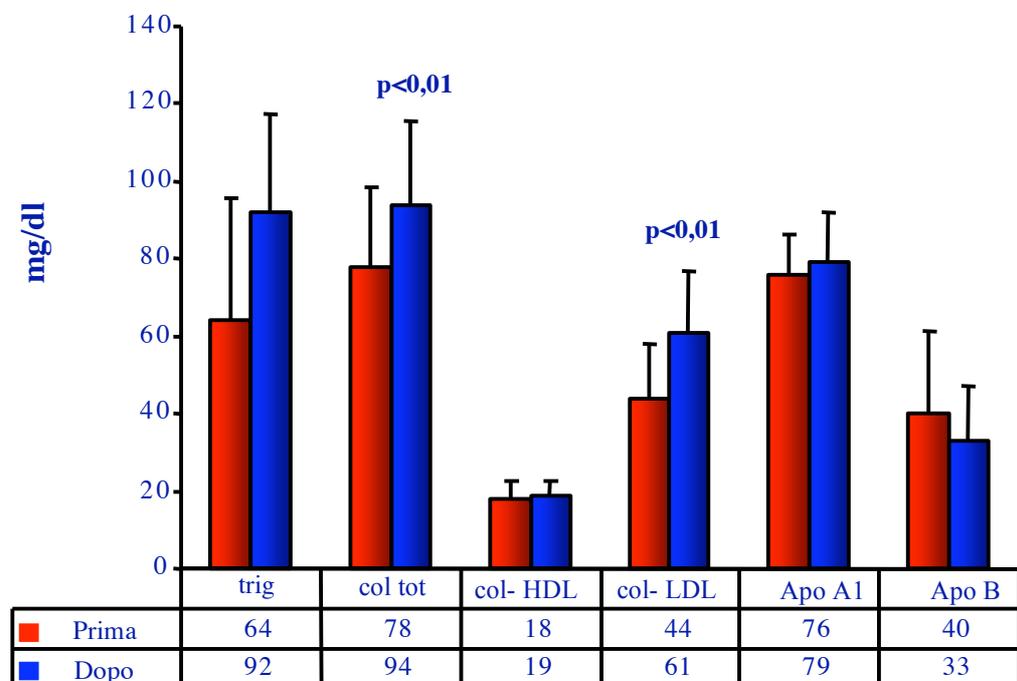
*Valori statisticamente significativi rispetto ai controlli (p<0.005)*

Le differenti quantità di phy nel plasma e nelle membrane dei due sottogruppi può essere il risultato di una differente risposta metabolica di ogni individuo alla NP in generale, o ai lipidi infusi e quindi ad una differente clearance dei fitosteroli. I meccanismi di clearance dei fitosteroli sono da ricercare nei normali meccanismi di clearance del colesterolo e, dunque nell'espressione e nella regolazione di tutte le proteine coinvolte nell'assorbimento e nel metabolismo degli steroli (Berge 2000, Lu 2001, Tilvis 1986, von Bergmann 2005, Sudoph 2002). I principali fattori che regolano l'assorbimento, il metabolismo e l'escrezione degli steroli sono:

- i recettori sistemici ed epatici delle lipoproteine;
- i livelli delle apoproteine APO A1, APO B e APO E;
- i livelli del trasportatore NPC1L1 a livello epatico;
- Livelli dei trasportatori ABCG5 e ABCG8 a livello epatico;
- gli enzimi intracellulari coinvolti nell'assemblaggio degli steroli delle lipoproteine (ACAT);
- l'attività della lipasi endoteliale ed epatica.

In questo lavoro ci siamo limitati, per il momento, a confrontare i valori di colesterolo e di alcune lipoproteine (col-HDL, col-LDL, APO A1 e APO B) nel gruppo dei pazienti prima e dopo la terapia. Il confronto è riportato in figura 16.

Non si osservano differenze statisticamente significative ad eccezione del colesterolo totale e del col-LDL il cui aumento può essere comunque imputato al carico di colesterolo infuso oppure ad interferenze sui meccanismi recettoriali epatici e sistemici.



**Figura 16:** livelli plasmatici di trigliceridi, colesterolo, col-HDL, col-LDL, APO A1, APO B nei pazienti prima e dopo la terapia.

I valori di phy molto più alti nel sottogruppo B rispetto agli altri (sottogruppo A) potrebbero essere dovuti all'influenza dei phy sui meccanismi di trasporto ed escrezione epatica che, nel complesso, potrebbero condurre ad una ridotta clearance dei phy in alcuni pazienti.

Pertanto bisognerebbe indagare anche le APO E, oppure i recettori ABCG5 e ABCG8 e NPC1L1. I dati ottenuti, anche se preliminari, sono sufficienti per indirizzare le ricerche future verso un approfondimento delle influenze dei lipidi della NP su questi meccanismi.

## 5 CONCLUSIONI

1. Il metodo analitico in GC/MS permette di diagnosticare i difetti della biosintesi del colesterolo mediante lo studio dei profili degli steroli plasmatici, delle membrane cellulari e delle feci; può trovare applicazione anche per diagnosi prenatali mediante lo studio degli steroli del liquido amniotico.
2. La paziente affetta da latosterolosi presenta mutazioni che non influiscono severamente sul fenotipo clinico, questo è dimostrato anche dalla loro residua attività enzimatica.
3. Nella latosterolosi si osserva un aumento significativo di alcuni fitosteroli (campesterolo, stigmasterolo e sitosterolo) nei materiali biologici analizzati, che potrebbe essere dovuto ad alterazioni dei meccanismi di assorbimento/escrezione di queste molecole.
4. I fitosteroli potrebbero essere la causa dello sviluppo della colestasi in bambini trattati con NP. Questo studio ha dimostrato un accumulo di fitosteroli nel plasma e nelle membrane dei pazienti, ma non è stata trovata nessuna correlazione tra essi e la colestasi.
5. In questo studio abbiamo osservato una differenza interindividuale nel metabolismo dei fitosteroli probabilmente dovuta ad interferenze sui meccanismi di assorbimento e/o di clearance degli steroli.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Arnon R, Yoshimura T, Reiss A, Budai K, Lefkowitz JH, Javitt NB. Cholesterol 7-hydroxylase knockout mouse: a model for monohydroxy bile acid-related neonatal cholestasis. *Gastroenterology*. 1998;115:1223-28.
2. Balistreri WF, Heubi JE, Suchy FJ. Immaturity of the enterohepatic circulation in early life: factors predisposing to “physiologic” maldigestion and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:346-54.
3. Beath SV, Davies P, Papadopoulou A, Khan AR, Buick RG, Corkery JJ, Gornall P, Booth IW. Parenteral nutrition-related cholestasis in postsurgical neonates: multivariate analysis of risk factors. *J Pediatr Surg*. 1996;31:604-06.
4. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, 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;290:1709-11.
5. Berger A, Jones PJ, Abumweis SS. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis*. 2004;3:5.
6. Bjorkhem I, Boberg KM (1995) Inborn errors in bile acid biosynthesis and storage of sterols other than cholesterol. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D.) 2073–2102.
7. Braverman N, Lin P, Moebius FF, Obie C, Moser A, Glossmann H, Wilcox WR, Rimoin DL, Smith M, Kratz L, Kelley RI, Valle D. Mutations in the gene encoding 3 beta-hydroxysteroid-delta 8, delta 7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome. *Nat Genet*. 1999;22:291-4.
8. Brunetti-Pierri N, Corso G, Rossi M, et al (2002) Lathosterolosis, a novel multiple-malformation/mental retardation syndrome due to deficiency of 3beta-hydroxysteroid-delta5-desaturase. *Am J Hum Genet* 71: 952-958.
9. Clayton P, Mills K, Keeling J, FitzPatrick D. Desmosterolosis: a new inborn error of cholesterol biosynthesis. *Lancet*. 1996
10. Clayton PT, Mills KA, Massoud A, Casteels M, Milla PJ. Phytosterolemia in children with parenteral nutrition-associated cholestatic liver disease. *Gastroenterology*. 1993;105:1806-13.
11. Clayton PT, Whitfield P, Iyer K. The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parenteral nutrition. *Nutrition*. 1998;14:158-64. Review.
12. Colomb V, Dabbas-Tyan M, Taupin P, Talbotec C, Revillon Y, Jan D, De Potter S, Gorski-Colin AM, Lamor M, Herreman K, Corriol O, Landais P, Ricour C, Goulet O. Long-term outcome of children receiving home parenteral nutrition: a 20-year single-center experience in 302 patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44:347-53.
13. Colomb V, Jobert-Giraud A, Lacaille F, Goulet O, Fournet JC, Ricour C. Role of lipid emulsions in cholestasis associated with long-term

- parenteral nutrition in children. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24:345-50.
14. Corso G, Rossi M, De Brasi D, Rossi I, Parenti G, Dello Russo A. Effects of sample storage on 7-and 8-dehydrocholesterol levels analysed on whole blood spots by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. *J Chromatogr B Anal Tech Biom Sciences* 2002;766: 365-370.
  15. Derry JM, Gormally E, Means GD, Zhao W, Meindl A, Kelley RI, Boyd Y, Herman GE. Mutations in a delta 8-delta 7 sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. *Nat Genet.* 1999;3:286-90.
  16. Ellegard LH, Andersson SW, Normen AL, Andersson HA. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. *Nutr Rev.* 2007;65:39-45.
  17. Grange DK, Kratz LE, Braverman NE, Kelley RI. CHILD syndrome caused by deficiency of 3beta-hydroxysteroid delta8, delta7-isomerase. *Am J Med Genet.* 2000 14;90:328-35.
  18. Greenberg CR, Rimoin DL, Gruber HE, DeSa DJ, Reed M, Lachman RS. A new autosomal recessive lethal chondrodystrophy with congenital hydrops. *Am J Med Genet.* 1988;29:623-32.
  19. Guzzetta V, De Fabiani E, Galli G, et al (1996) Clinical and biochemical screening for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Italian SLOS Collaborative Group Acta Paediatr* 85: 937-942.
  20. Herman GE (2003) Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Genet* 1:75-88 Review.
  21. Irving SY, Simone SD, Hicks FW, Verger JT. Nutrition for the critically ill child: enteral and parenteral support. *AACN Clin Issues.* 2000;11:541-58.
  22. Kelley RI, Hennekam RC (2000) The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 37: 321-335.
  23. Kelley RI, Herman GE. Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001;2:299-341.
  24. Kelley RI, Kratz LE, Glaser RL, Netzloff ML, Wolf LM, Jabs EW. Abnormal sterol metabolism in a patient with Antley-Bixler syndrome and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet.* 2002 15;110:95-102.
  25. Kelly DA. Liver complications of pediatric parenteral nutrition-epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1998;14:153-57.
  26. Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R; Parenteral Nutrition Guidelines Working Group; European Society for Clinical Nutrition and Metabolism; European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN); European Society of Paediatric Research (ESPR). Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41 Suppl 2:S1-87
  27. Krakowiak PA, Wassif CA, Kratz L et al (2003) Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency. *Hum Molec Genet* 12: 1631-1641.

28. Kubota A, Yonekura T, Hoki M, Oyanagi H, Kawahara H, Yagi M, Imura K, Iiboshi Y, Wasa K, Kamata S, Okada A. Total parenteral nutrition-associated intrahepatic cholestasis in infants: 25 years' experience. *J Pediatr Surg*. 2000;35:1049-51.
29. Ling WH, Jones PJ (1995) Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57: 195-206.
30. Liu XY, Dangel AW, Kelley RI, et al (1999) The gene mutated in bare patches and striated mice
31. Lu K, Lee MH, Hazard S et al (2001) Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* 69: 278-290.
32. Miettinen TA, Klett EL, Gylling H, Isoniemi H, Patel SB (2006) Liver transplantation in a patient with sitosterolemia and cirrhosis. *Gastroenterology* 130: 542-547.
33. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1990) Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 131: 20-31.
34. Naber AH, Rings EH, George E, Tolboom JJ, Jonkers C, Sauerwein HP. Treatment of intestinal failure by total parenteral nutrition at home in children and adults. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2005;149:385-90.
35. Ostlund RE Jr, McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, Spilburg CA. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:911-16.
36. Parnes S, Hunter AG, Jimenez C, Carpenter BF, MacDonald I (1990) Apparent Smith-Lemli-Opitz syndrome in a child with a previously undescribed form of mucopolidosis not involving the neurons. *Am J Med Genet* 35: 397-405.
37. Patel SB, Salen G, Hidaka H et al (1998) Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *J Clin Invest* 102: 1041-1044.
38. Porter FD. Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *J Clin Invest* 2002;110:715-724.
39. Postuma R, Trevenen CI. Liver disease in infants receiving total parenteral nutrition. *Pediatrics* 1979;63:110-115.
40. Rossi M, D'Armiento M, Parisi I, Ferrari P, Hall CM, Cervasio M, Rivasi F, Balli F, Vecchione R, Corso G, Andria G, Parenti G. Clinical phenotype of lathosterolosis. *Am J Med Genet A*. 2007 ;143(20):2371-81.
41. Rossi M, Vajro P, Iorio R, et al (2005) Characterization of liver involvement in defects of cholesterol biosynthesis: long-term follow-up and review. *Am J Med Genet* 132: 144-151.
42. Seidel C, Deufel T, Jahreis G. Effects of Fat-Modified Dairy Products on Blood Lipids in Humans in Comparison with Other Fats. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2005;49:42-48.
43. Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie Tyson R, Sokol RJ, Russell DW.

- Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 alpha-hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest*. 1998;102:1690-703.
44. Shefer S, Salen G, Nguyen L, Batta AK, Packin V, Tint GS, Hauser S. Competitive inhibition of bile acid synthesis by endogenous cholestanol and sitosterol in sitosterolemia with xanthomatosis. Effect on cholesterol 7alpha-hydroxylase. *J Clin Invest*. 1988;82:1833-39.
  45. Smith DW, Lemli L and Opitz JM. A newly recognized syndrome of multiple congenital abnormalities. *J Pediatr* 1964; 210-217.
  46. Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Luers C, Berthold HK, von Bergmann K. Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut*. 2002;51:860-63.
  47. Tilvis RS, Miettinen TA (1986) Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 43: 92-97.
  48. Tint GS, Salen G, Batta AK, Shefer S, Irons M, Elias ER, Abuelo DN, Johnson VP, Lambert M, Lutz R, et al. Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr*. 1995; 127(1):82-7.
  49. Tint GS. Cholesterol defect in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 1993; 47:573-4
  50. Vileisis RA, Inwood RJ, Hunt CE. Laboratory monitoring of parenteral nutrition-associated hepatic dysfunction in infants. *J Parenteral Enteral Nutr* 1981;5:67-69.
  51. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol*. 2005;96:10D-14D.
  52. Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJ. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 2001;69:685-94.
  53. Weihrauch JL, Gardner JM. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc*. 1978;73 :39-47.
  54. Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJ. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 2001;69: 685-94.
  55. Waterham HR. Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Clin Gen* 2002;61:393-403.
  56. Wilmore DW, Dudrick SJ. Growth and development of an infant receiving all nutrients exclusively by vein. *JAMA*. 1968;203:860-64.

## Riassunto

Negli ultimi 15 anni alcune sindromi malformative sono state associate a difetti di enzimi coinvolti nella biosintesi post-squalenica del colesterolo. Nel 2002 è stata descritta nell'uomo un nuovo difetto della biosintesi del colesterolo: la latosterolosi. È una sindrome clinico-metabolica dovuta al difetto della 3 $\beta$ -idrossisterolo-desaturasi (SC5D) con conseguente blocco della conversione di latosterolo in 7-deidrocolesterolo. La paziente affetta da latosterolosi presenta un fenotipo complesso che include anomalie congenite multiple, ritardo mentale ed epatopatia colestatica. Da un punto di vista biochimico la paziente presenta un accumulo di latosterolo nel plasma e nei tessuti. Il gene SC5D presenta due mutazioni missenso: la 86 G→A e la 632 G→A. Sono stati eseguiti esperimenti di espressione del gene SC5D e delle due forme mutate in un ceppo di *Saccharomyces Cerevisiae* difettivo per il gene SC5D (*erg3*). Risultati: I) in vivo, le cellule di lievito trasformate con il gene SC5D producevano ergosterolo in quantità maggiori rispetto alle cellule trasformate con i geni SC5D-86 e SC5D-632. Per il monitoraggio degli steroli plasmatici, cellulari e fecali della paziente affetta da latosterolosi è stato utilizzato un metodo basato su gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS). Lo studio dei profili sterolici plasmatici e cellulari ha evidenziato un accumulo di latosterolo, e la presenza di altri metaboliti. Nella latosterolosi l'escrezione fecale degli steroli differiva in maniera significativa sia dai controlli normali sia dai pazienti con colestasi, inoltre i metaboliti anomali presenti nelle feci, nel sangue e nei tessuti della paziente affetta da latosterolosi erano stati identificati come steroli vegetali (fitosteroli:phy): campesterolo (C 28) e sitosterolo (C 29). Utilizzando un metodo basato sulla GC/MS abbiamo valutato i profili sterolici di neonati sottoposti a nutrizione parenterale totale (NPT). La NP comporta alcune complicanze epatiche che negli adulti si manifestano con steatosi mentre nei bambini, in particolare nei neonati, la colestasi rappresenta il disagio maggiore. I pazienti trattati con NP ricevono per via endovenosa un significativo apporto calorico mediante somministrazione di glucidi, amminoacidi e lipidi; questi ultimi assunti sotto forma di emulsioni di origine vegetale in cui sono presenti quantità elevate di phy. È stato riportato che un uso prolungato di lipidi vegetali comporta un progressivo aumento di steroli

vegetali nel plasma. I pazienti studiati erano neonati di età compresa tra 1 e 46 giorni che ricevevano NP per almeno 3 giorni, il gruppo dei controlli era rappresentato da neonati sani di un giorno di vita ed, in parte, dagli stessi pazienti a cui è stato prelevato un campione di sangue prima del trattamento con NP. L'analisi quantitativa degli steroli ha mostrato che i livelli di PHY nel plasma e nelle membrane eritrocitarie (ME) dei pazienti sono legati tra loro da una relazione lineare statisticamente significativa. Inoltre sono stati correlati i livelli di PHY in funzione dei giorni di terapia parenterale ed è stato osservato che nelle membrane l'aumento dei livelli di PHY è proporzionale ai giorni di terapia ed è statisticamente significativa, nel plasma si osserva una correlazione positiva anche se non è significativa. La presenza di significative quantità di PHY potrebbe alterare la funzionalità delle membrane cellulari, come già ipotizzato da altri autori. Nei pazienti sottoposti a NP, tale alterazione a livello epatico potrebbe influire sui meccanismi di captazione/ escrezione degli steroli.

## Summary

Some malformative syndromes have been associated to defects of enzymes involved in to post-squalenic biosynthesis of cholesterol in last 15 years.

The lathosterolosis represents a new defect of cholesterol biosynthesis described in human in 2002. The clinical-metabolic syndrome is due to a reduced activity of the enzyme  $3\beta$ -hydroxysterol- $\Delta^5$ -desaturase (SC5D) that transforms lathosterol ( $\Delta^7$ ) into 7-dehydrocholesterol ( $\Delta^{5-7}$ ). Patient affected by lathosterolosis presents a fenotype that includes congenital anomalies of the limbs, mental delay, cholestasis and liver malformations Biochemical profiles are characterized by increased lathosterol in serum and tissue. The gene SC5D presents was two missense: la 86 G→A e la 632 G→A.

We have performed experiments of expression of the gene SC5D and of two mutated forms in yeast strain *Saccharomyces Cerevisiae* lacking of the gene SC5D (erg3). Results: *in vivo and in vitro* the yeasts trasformed with SC5D produced more ergosterol than the yeasts trasformed with SCD-86 and SCD 632.

The analisis of the sterols of plasma, cell membranes and feces of patient affected by lathosterolosis was performed using a gas cromatography/ mass spectrometry metod (GC/MS). The study of sterols profiles has shown increased levels of lathosterol, and the presence of two others sterols. In lathosterolosis fecal sterols excretion differed significantly from both normal controls and cholestasis controls; the anomalous metabolites, found in plasma, tissues and faeces has been identified as plant sterols (phytosterols; phy): campesterol (C 28) and sitosterol (C29).

We have evalueted sterols profiles of newborns receiving parenteral nutrition (NP). NP involves a series of hepatic complications that in the adults are manifested as steatosis while in children, in particular in new-borns, the cholestasis represents the major disease. Patients received for intravenous way a meaningful caloric load like lipid emulsions of plant origin. It has been reported that the long term use of plant lipid emulsions results in the progressive accumulation of serum plant sterols (phytosterols; phy). The patients of this study were neworns (range of days life 1-46) receiving NP for three days at least, controls were the same patients before to start the teraphy and normal controls. Quantitative analysis of sterols has shown, in patients an

increased levels of phy in plasma and membranes of red cells, the correlation of the values was positive and statistically significant. The comparison between the period of TPN therapy and the percentage of phytosterols in RBCM and in plasma showed a positive and significant correlation for RBCM and a positive although not significant correlation for plasma samples. The presence of high levels of phy could alterate the functions of cell membrane, as reported by others. In patients treated with NP, this alteration to liver could interfere on mechanisms of captation/excretion of sterols.