

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA APPLICATA**

-XXII CICLO-

**Nuove molecole per una originale terapia delle
malattie cardiovascolari causate da ridotta
efficienza del trasporto inverso del colesterolo**

Tutore

Prof. Paolo Abrescia

Candidato

Dr. Alfonso Salvatore

**Coordinatore
Prof. Ezio Ricca**

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	pag. 3
1.1 Premessa	pag. 3
1.2 Ruolo e regolazione del colesterolo intracellulare	pag. 4
1.3 HDL e trasporto inverso del colesterolo	pag. 7
1.4 Struttura e regolazione dell'enzima Lecitina-colesterolo acil-transferasi	pag. 10
1.5 L' Apolipoproteina AI	pag. 12
1.6 L' Apolipoproteina E	pag. 14
1.7 Ruolo del colesterolo nell'aterogenesi	pag. 17
1.8 L' Aptoglobina	pag. 23
1.9 Il peptide P2a	pag. 27
2. OBIETTIVI.....	pag. 29
3. MATERIALI E METODI.....	pag. 30
3.1 Materiali	pag. 30
3.2 Metodi	pag. 31
3.2.1 Elettroforesi.....	pag. 31
3.2.2 Procedimento ELISA: Valutazione dell'affinità di peptidi biotinilati ad Hpt o HDL immobilizzate su piastra.....	pag. 33
3.2.3 Sintesi dei peptidi.....	pag. 35
3.2.4 Procedimento ELISA : Spiazzamento di Hpt da HDL, Hb o Apo E immobilizzate su piastra con l'utilizzo di peptidi.....	pag. 35
3.2.5 Saggio dell'attività di LCAT.....	pag. 37
3.2.6 Preparazione del Peptidosoma	pag. 39
4. RISULTATI.....	pag. 41
4.1 Legame di Peptidi mimetici di Apo AI, con sequenze parziali di P2a, ad Hpt immobilizzata su piastra	pag. 41
4.2 Legame di Peptidi mimetici di Apo AI, modificati con introduzione di alanine (Ala-scan) nella sequenza di P2a, ad Hpt immobilizzata su piastra.....	pag. 42
4.3 Spiazzamento di Hpt da HDL immobilizzate su piastra, con peptidi contenenti Ala nella sequenza di P2a.....	pag. 43
4.4 Legame dei peptidi alle HDL.....	pag. 44
4.5 Stabilizzazione conformazionale di P2a.....	pag. 46
4.6 Legame di Apo-Aib a Hpt immobilizzata su piastra.....	pag. 47
4.7 Saggio dell'attività di LCAT in presenza di Apo-Aib e Hpt	pag. 48
4.8 Interferenza di Apo-Aib sul legame Hpt-Hb.....	pag. 49
4.9 Spiazzamento di Hpt da HDL con Apo-Aib.....	pag. 50
4.10 Spiazzamento di Hpt da HDL con Apo-Aib su liposoma.....	pag. 51
4.11 Legame di Hpt ad una specifica sequenza di Apo E : Taglio proteolitico con trombina	pag. 52
4.12 Legame di Hpt ad una specifica sequenza di Apo E : Taglio con CNBr.....	pag. 53
4.13 Legame di Hpt ad una specifica sequenza di Apo E: Uso di peptidi mimetici di Apo E per mappare il sito di legame tra le due proteine	pag. 55
5. DISCUSSIONE.....	pag. 57
6. PROSPETTIVE.....	pag. 62
7. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 63
ABBREVIAZIONI.....	pag. 72

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nei paesi industrializzati e sono all'origine del 40% circa dei decessi, per un totale di 2 milioni all'anno. L'onere finanziario per i sistemi sanitari connesso con questo gruppo di patologie è stato stimato a poco meno di 110 miliardi di euro nel 2006. Ciò equivale ad un costo pro capite di 223 euro all'anno. Le malattie cardiovascolari sono inoltre una delle principali cause di infermità di lunga durata e di abbandono del mercato del lavoro. Esiste un grande bisogno insoddisfatto in campo medico di nuove terapie che siano in grado di curare le malattie cardiovascolari. Stime future indicano che la mortalità causata da questo tipo di malattie aumenterà del 90% nel 2020 rispetto al 1990.

La salute del cuore dipende fortemente dai comportamenti e dagli stili di vita. Per poter essere efficaci, le strategie di prevenzione devono pertanto concentrarsi su fattori chiave come il consumo di tabacco e alcol, l'alimentazione, l'attività fisica e lo stress psicosociale. Molti studi sono ancora da fare e da verificare sull'aterosclerosi, ma un ruolo fondamentale viene svolto dai meccanismi di controllo dei livelli di colesterolo plasmatico e cellulare. La loro compromissione, per cause genetiche o per infiammazioni croniche o acute può essere tanto l'evento scatenante di un ateroma quanto un suo aggravante. Nella maggior parte dei casi le malattie cardiovascolari sono causate da un eccesso di colesterolo nel sangue. Esistono molti farmaci che hanno la potenzialità di abbassare i livelli di colesterolo nel sangue. I più efficaci ed utilizzati sono le statine, molecole che inibiscono la sintesi cellulare del colesterolo, delle quali in Italia ne vengono

commercializzati sei tipi diversi. Si tratta di farmaci ben tollerati, ma con un ampio spettro di sintomi collaterali.

Il nostro lavoro sperimentale si inserisce nel contesto della ricerca di nuove molecole che possano funzionare nel prevenire o curare le malattie del sistema cardiocircolatorio dovute ad eccesso di colesterolo nel plasma. L'approccio da noi utilizzato, deriva da uno studio approfondito del problema biologico e dalla messa a punto di metodiche biotecnologiche indispensabili per testare il funzionamento delle molecole individuate.

1.2 Ruolo e regolazione del colesterolo intracellulare.

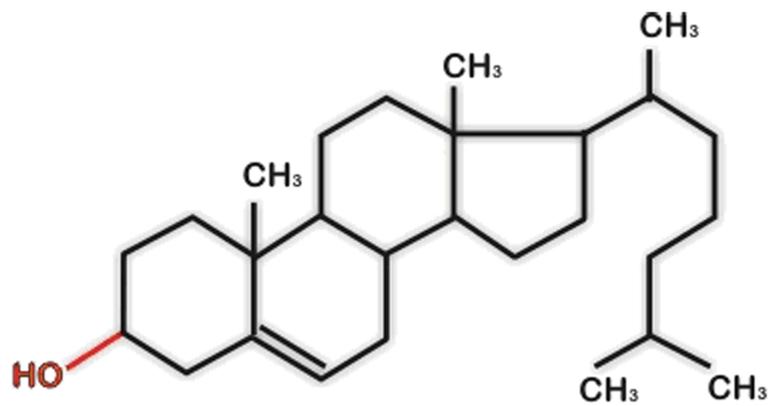


Fig. 1: Struttura della molecola del colesterolo

Il colesterolo (C) (Fig.1) è una sostanza che si trova nei fluidi corporei e in tutte le cellule di un organismo animale, poiché costituisce parte integrante di membrane e lipoproteine. Si tratta di un composto a 27 atomi di carbonio, la cui lunga via biosintetica è finemente regolata, onde mantenere un equilibrio ottimale tra la forma cellulare endogena e quella esogena, di origine alimentare. È compito del fegato e dell'intestino regolare la sintesi di questa molecola. Parimenti, anche lo smaltimento è compito di questi due organi. Gli altri tessuti, infatti, pur avendo una bassa capacità di sintetizzare *ex novo* il C, sono incapaci di degradarlo.

La rilevanza biologica di questo lipide è legata al fatto che, oltre ad essere il precursore di molecole importanti quali vitamina D, sali biliari e ormoni steroidei (aldosterone, cortisolo, progesterone, androgeni ed estrogeni), è un importante costituente della membrana plasmatica. Questa, essendo l'interfaccia tra l'ambiente cellulare e quello extracellulare, svolge funzioni vitali di omeostasi, di trasporto, selezione, trasduzione del segnale e, infine, di riconoscimento e stabilizzazione di interazioni con matrice extracellulare o altre cellule.

La membrana non potrebbe svolgere in modo ottimale i suoi molteplici compiti se fosse troppo fluida o troppo rigida: è qui che entra in gioco il C, che, per la sua rigidità strutturale, crea disordine tra i fosfolipidi e impedisce che la membrana assuma una struttura paracristallina (in caso di abbassamento della temperatura) mentre ne ostacola l'eccessiva fluidità (in caso di innalzamento della temperatura), aggregando i fosfolipidi grazie alla sua apolarità. Si può facilmente arguire, quindi, come, in caso di eccesso di questo lipide nel doppio strato lipidico, la membrana plasmatica divenga più rigida (e, quindi, più fragile) e la cellula possa andare incontro a necrosi,

scatenando fenomeni infiammatori (essenzialmente per l'esposizione di antigeni non-self e la liberazione di enzimi litici).

La quantità di C nelle cellule è regolata attraverso tre meccanismi: regolazione dell'attività e dei livelli dell'enzima microsomiale 3, idrossi-3,metilglutaril-CoAreduttasi(HMGCoA-reduttasi);

esterificazione del C libero, intracellulare, in eccesso per mezzo dell'enzima microsomiale acil-CoA:colesterolo aciltransferasi (ACAT);

regolazione dei livelli plasmatici del colesterolo attraverso controllo dei livelli di lipoproteine circolanti a bassa (LDL) ed alta (HDL) densità.

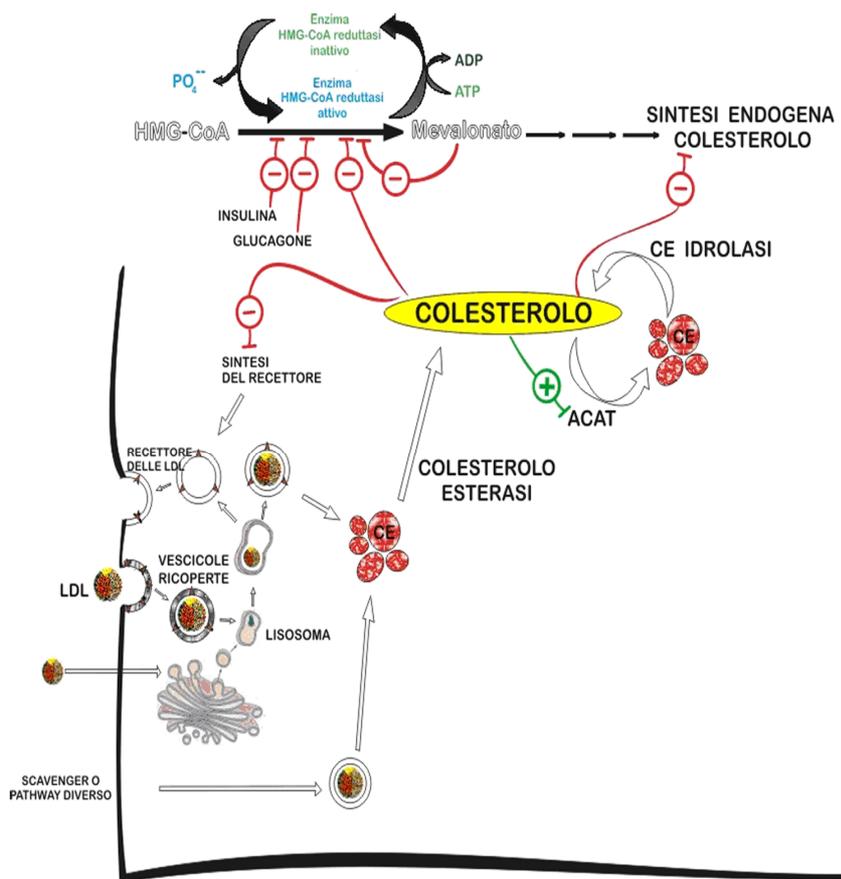


Fig. 2 : Regolazione dei livelli cellulari del colesterolo.

L'accumulo di C nella cellula, può provocare necrosi (e, quindi, la comparsa di lesioni tissutali) sia causando fratture nel doppio strato lipidico superficiale, sia formando cristalli all'interno della cellula.

Le lesioni dell'endotelio vasale, provocate dalla forza di taglio del flusso ematico su membrane plasmatiche rigide, sono una delle maggiori cause dell'infiltrazione di LDL, insieme alla rottura delle giunzioni intercellulari (con risultante permissività di diapedesi). Queste, se precedentemente ossidate fuori dal vaso (ox-LDL), possono essere captate dai macrofagi e dalle cellule muscolari lisce che le accumulano a dismisura. E' così che si trasformano in cellule schiumose (*foam cells*), suscitando la deposizione di collagene dai fibroblasti nella matrice extracellulare e la proliferazione dei miociti perivascolari, che migrano dalla regione avventizia all'intima e, circondando i macrofagi, contribuiscono alla formazione di un cappuccio fibroso. Questo fenomeno è alla base della formazione di placche ateromatose ("ateromi"). Poiché le cellule periferiche (cioè quelle destinate al colesterolo epatico ma, nel contesto sopra descritto, quelle macrofagiche) non sono in grado di degradare l'eccesso di C (dal momento che solo il fegato è deputato al suo smaltimento), è essenziale, per l'omeostasi cellulare, un meccanismo mediante il quale le molecole intatte di C possano essere rimosse dalle cellule (Ginsberg et al., 1998).

Questo meccanismo, finalizzato al recupero epatico di C periferico in eccesso, è detto "trasporto inverso di C" (RCT: *Reverse Cholesterol Transport*).

1.3 HDL e trasporto inverso del colesterolo.

Glomset fu il primo a riconoscere alle HDL e all'enzima

essenzialmente, da fosfolipidi e apolipoproteine (Apo AI, Apo E, Apo AII e, in minor parte, Apo C). Esse svolgono una funzione di supporto del metabolismo delle altre lipoproteine, scambiando con esse apolipoproteine, fosfolipidi e CE. L'avidità delle HDL per il C è legata, in massima parte, proprio alle proteine che espongono in superficie. Ricordiamo, infatti, che LCAT utilizza come cofattori Apo AI e Apo E per esterificare il C e permetterne l'inclusione (come CE) nel nucleo lipidico delle HDL. Durante il loro metabolismo, quindi, le HDL subiscono delle grandi modificazioni nelle percentuali lipidiche, dipendenti, in massima parte, dall'eccesso o dalla richiesta cellulare di C. Infatti, le HDL, man mano che internalizzano il C, passano dalla forma immatura bilamellare (detta pre- β , preferita da LCAT come substrato) a forme sferiche via via più grandi e leggere (HDL₃ → HDL₂ → HDL₁). Il percorso di trasformazione è invertito nel caso in cui le HDL forniscono CE alle cellule steroidogeniche.

Il risultato netto del ciclo delle particelle HDL è, pertanto, quello di aumentare la velocità di rimozione dei trigliceridi dal plasma e regolare la quantità ed il rapporto plasmatico tra C e CE.

Benché, a seconda delle cellule e delle condizioni sperimentali, sia stato evidenziato che il trasferimento del C, dalle HDL alle cellule periferiche, possa avvenire sia per diffusione in fase acquosa (Rothblat et al., 1992) sia per interazione con recettori specifici di membrana (Oram et al., 1996), è sempre più chiaro il ruolo svolto da un tipo particolare di recettore che riconosce con alta affinità le HDL. Questo recettore, presente su alcuni tipi cellulari, fa parte della famiglia degli SR (*Scavenger Receptor*: Recettore Spazzino) e può mediare la rimozione del C dalle cellule (Wang et al., 2000) proprio favorendo il riconoscimento di lipoproteine "navetta" tra cellula e cellula. E' denominato SR-BI (SR di classe B e di tipo I).

Recenti studi hanno evidenziato il ruolo svolto da un altro recettore scavenger, HDL-binding protein (HB2), nell'insorgenza prematura dei danni aterosclerotici.

Come vedremo, però, alcune delle attività protettive svolte dalle HDL vengono a mancare con l'insorgenza di fenomeni infiammatori. Questo deficit lascia campo libero alla nascita o alla progressione di un ateroma ed è negativamente correlato all'incidenza di danni cardiovascolari (Miller e Miller, 1975; Gordon e Rifkin, 1989).

1.4 Struttura e regolazione dell'enzima Lecitina-colesterolo acil-transferasi.

L'enzima LCAT, originato dal fegato, è presente nel plasma di tutte le specie di mammiferi. Esso contiene, all'incirca, il 25% di carboidrati e ha un peso molecolare, stimato per elettroforesi, in un intervallo compreso tra 66 e 68 kDa (Fielding, 1986).

Come precedentemente accennato, questo enzima esterifica il C (rimosso dalla superficie cellulare) con un acido grasso, rimosso dalla posizione 2 del glicerolo della fosfatidilcolina presente sulle HDL. Questa attività non è limitata all'esterificazione del C cellulare, ma anche a quella del C delle HDL.

LCAT è dotato di due distinte attività catalitiche: un'attività fosfolipasica (basata su un sito contenente un gruppo alcolico serinico) che stacca l'acido grasso dalla fosfatidilcolina e un'attività transacetilasi (basata su un sito la cui struttura dipende da un gruppo tiolico vicinale) che esterifica il C con l'acido grasso. Queste due attività rappresentano la causa principale della formazione di CE nel plasma umano.

Bisogna, però, aggiungere che, seppur con minore efficienza, LCAT

esterifica anche altri steroli e ossisteroli, alcuni dei quali hanno come precursore lo stesso C (Szedlaczek et al., 1995).

LCAT è influenzato dai prodotti dello stress ossidativo. In particolare, l'enzima può essere inibito da agenti ossidanti, come è stato dimostrato dal trattamento con ioni rame (Bielicki et al., 1995 (a)) o con estratti acquosi di fumo di sigaretta (Bielicki et al., 1995 (a), 1995 (b); McCall et al., 1995). L'enzima può essere, inoltre, inibito dall'incubazione con perossinitrito (Graham et al., 1998), da idroperossidi (Bielicki et al., 1999; Davit-Sproul et al., 1999), da radicali perossidici (Chen e Loo, 1995) o per ossidazione dei residui di cisteina vicini al sito attivo (Bielicki et al., 1995 (b); Wang et al., 2000). E' noto, inoltre, che le mm-LDL (*minimally oxidized* LDL), un prodotto intermedio dell'ossidazione delle LDL, sono potenti inibitori dell'attività di LCAT. Le condizioni redox del plasma influenzano in maniera significativa RCT; in particolare, gli antiossidanti prevengono le modificazioni ossidative strutturali e funzionali, indotte dai ROS (specie reattive dell'ossigeno) e dalle ox-LDL. E' stato, infatti, dimostrato che l'attività enzimatica di LCAT è positivamente correlata con alti livelli di vitamina C (ascorbato) e di vitamina E (α -tocoferolo) (Cigliano et al., 2002).

LCAT rappresenta un enzima dalle spiccate proprietà antiaterogeniche. Infatti, conigli transgenici, in cui è stata indotta una superespressione di LCAT e che sono stati sottoposti ad una dieta ricca di colesterolo, hanno mostrato, rispetto ai controlli, un aumento significativo nelle concentrazioni plasmatiche di Apo AI e di colesterolo delle HDL: questo profilo lipoproteico è stato trovato associato ad una diminuzione significativa delle lipoproteine cosiddette "aterogeniche" (VLDL e LDL) (Hoeg et al.(a), 1996). Inoltre, la superespressione di LCAT ha portato ad una riduzione

dell'aterosclerosi in questi animali, poiché l'analisi dell'aorta ha rivelato che essi avevano una riduzione dell'86% della dimensione della lesione di placca aterosclerotica rispetto ai controlli.

Questi risultati indicano che la regolazione dell'attività LCAT gioca un ruolo chiave nell'omeostasi cardiovascolare in termini di prevenzione dell'aterosclerosi e rappresenta un nuovo bersaglio per lo sviluppo di strategie terapeutiche, farmacologiche e geniche (Hoeg et al.(b), 1996).

1.5 L' Apolipoproteina AI.

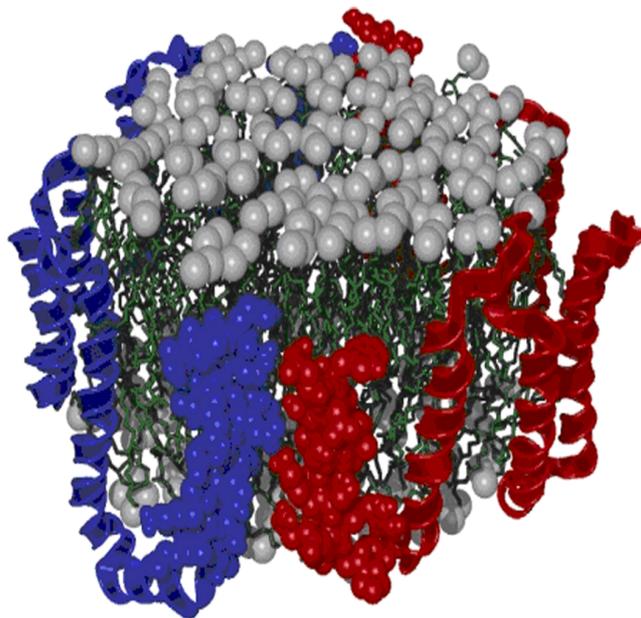


Fig. 4 : Struttura di Apo AI nelle HDL. Sono rappresentate due molecole di Apo AI (in rosso e in blu) le cui α -eliche sono orientate parallelamente alla struttura formata da colesterolo e fosfolipidi.

Apo AI, è la proteina più efficace nell'attivare LCAT ed è il principale costituente proteico delle HDL. Essa contiene 243 aminoacidi che formano una struttura disordinata ("random"), con 10

α -eliche anfipatiche (8 di 22 amminoacidi e 2 di 11) disposte in tandem, che costituiscono circa l'80% della massa totale della proteina.

Sono proprio questi domini ad α -elica ad essere responsabili sia dell'interazione dell'apolipoproteina con la componente lipidica che dell'attivazione di LCAT (Sorci-Thomas et al., 1997). Le α -eliche sono unite grazie a corte e flessibili anse, con struttura β , che di solito contengono un residuo di prolina. In più, Apo AI in forma libera (cioè non associata a lipidi) può funzionare da proteina segnale, poiché, con i siti di legame alla membrana plasmatica, avvia la mobilizzazione del colesterolo libero dalle membrane intracellulari e dagli esteri del colesterolo cellulari verso la membrana plasmatica. Successivamente, in seguito alla rimozione dei fosfolipidi, si producono HDL discoidali e povere di lipidi, già menzionate come pre- β HDL (Hara e Yokoyama, 1992; Fielding et al., 2000). Queste ultime, secrete dal fegato, sono poi convertite nelle HDL sferiche, mediante l'intervento di LCAT (Fielding e Fielding, 1995).

E' stato proposto che le eliche di Apo AI, nelle HDL sferiche, siano orientate parallelamente alla superficie del monostrato fosfolipidico, con i residui amminoacidici idrofobici incastrati nella regione lipidica apolare, mentre i residui idrofilici interagirebbero con i gruppi polari dei fosfolipidi e con la fase acquosa (Fig. 4), (Segrest et al., 1992). La flessibilità conformazionale di Apo AI può anche giocare un ruolo nell'interazione e nello scambio di lipidi delle HDL con le membrane plasmatiche. Sembra, infatti, che l'interazione delle HDL discoidali con le membrane plasmatiche possa avvenire tramite specifiche eliche di Apo AI, che, se non stabilizzate da un'adeguata massa lipidica, scivolerebbero dalla superficie delle HDL per inserirsi nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare, facilitando così

l'efflusso di C (Johnson, 1991).

La stimolazione di Apo AI su LCAT non solo è molto forte, poiché l'attività enzimatica è molto ridotta in sua assenza, ma sembra ben conservata nell'evoluzione. Infatti, è stato dimostrato che Apo AI ha un'azione eterospecifica, ovvero che, estratta da una certa specie animale, sia in grado di attivare LCAT di specie diverse (Chen e Albers, 1983). Il rapporto Apo AI/Apo AII potrebbe essere tra i meccanismi regolatori di LCAT, ma anche Apo CI, Apo AIV e Apo E attivano LCAT, sebbene con efficienza minore rispetto ad Apo AI (Patsch and Gotto, 1996). A dimostrazione dello stretto rapporto tra Apo AI e LCAT, si è notato un marcato catabolismo della prima proteina in caso di deficienza della seconda (Rader et al., 1994).

L'azione concertata di queste due proteine suggerisce che una loro sovraespressione potrebbe aumentare l'efficacia del trasporto di C dai distretti periferici agli organi deputati al suo smaltimento. Da esperimenti condotti su topi transgenici, in cui era stato trasferito il gene per Apo AI umana, è stato dimostrato che la sovraespressione di questa proteina ha prodotto l'aumento dei livelli delle HDL in circolo (Benoit et al., 1999; Rubin et al., 1991; Rader et al., 1994), facendo così diminuire il rischio di aterosclerosi.

1.6 L'Apolipoproteina E.

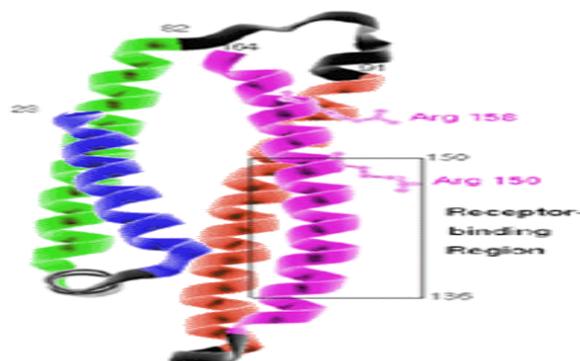


Fig. 5 : Struttura di rilevanza biologica di Apo E

Apo E è una glicoproteina plasmatica e tissutale di 299 amminoacidi, che ha peso molecolare di 34 KDa ed è codificata da un gene polimorfico (3 alleli principali) situato sul cromosoma 19. Le variazioni genetiche nel locus del gene *Apo e* determina tre principali isoforme dell'Apo E: E2, E3, E4. L'Apo E3 è l'isoforma più comune nella popolazione. Il polimorfismo nella proteina Apo E è il risultato di una singola sostituzione negli amino acidi 112 e 158 del polipeptide. Nell'Apo E3 è presente un residuo di cisteina in posizione 112 e un residuo di arginina in posizione 158, l'Apo E2 contiene residui di cisteina in entrambe le posizioni e l'Apo E4 contiene residui di arginina in entrambe le posizioni. Questo polimorfismo porta alla presenza di sei differenti fenotipi dell'ApoE, tre fenotipi omozigoti (e2/e2, e3/e3, e4/e4) e tre eterozigoti (e2/e3, e2/e4, e3/e4). (Fig. 5)

Apo E è una proteina dalle molteplici funzioni. Essa è prodotta principalmente dal fegato, ma il 20-40% del totale deriva anche da fonti extra-epatiche, come il cervello, la milza, i polmoni, le ovaie, i reni, i muscoli ed i macrofagi (Greenow K et al., 2005). Questa apolipoproteina è coinvolta nell'efficiente assorbimento epatico di particelle lipoproteiche, nella stimolazione dell'efflusso di C dai macrofagi attivati e dalle *foam cell* nella lesione aterosclerotica e, infine, nella regolazione della risposta immunitaria e infiammatoria. Apo E, inoltre, presenta un'efficienza nella stimolazione di LCAT pari al 18% (Zorich et al., 1985) o, secondo altri Autori (Chen e Albers, 1985), al 40% di quella di Apo A-I.

La sintesi e la secrezione di Apo E sono regolate da numerosi fattori. L'espressione del gene di Apo E ha una regolazione tessuto-specifica che risponde a cambiamenti funzionali cellulari e a diversi altri fattori intracellulari ed extracellulari. Per esempio, il differenziamento dei

monociti in macrofagi è accompagnato dall'aumento nell'espressione di Apo E (Auwerx et al., 1988). Inoltre, la fagocitosi, da parte dei macrofagi, di C ossidato (o oxLDL o LDL acetilate) e, la presenza di Apo A-I, fanno aumentare la trascrizione del gene (Rees et al., 1999). Infine, l'infiammazione può essere un segnale inibente: in presenza di IL-1 o di lipopolisaccaridi (LPS), l'espressione del gene, nei macrofagi, diminuisce (Greenow et al., 2005).

Come già descritto in precedenza, per completare il trasporto dalle HDL al fegato, i CE sono trasferiti, da CETP, alle LDL, che poi rilasciano il loro carico di lipidi, attraverso l'endocitosi regolata da recettori, nel fegato. E' stata, in passato, riportata l'esistenza di una eminente sottoclasse di HDL, ricca in Apo E, in diverse specie animali (compreso l'uomo) (Gordon et al., 1983). Poiché Apo E è un efficiente ligando per i recettori delle LDL, le HDL ricche di Apo E possono rilasciare al fegato il C acquisito dalla periferia anche in assenza di CETP (Matsuura et al., 2006; Mahley et al., 2006). Le specie deficienti di CETP sono particolarmente resistenti all'aumento dei livelli plasmatici di C, indotti dalla dieta, dimostrando che esse posseggono un efficiente RCT. Inoltre, è stato dimostrato che una dieta ricca di C, nei cani, porta ad un ingrandimento delle HDL con Apo E, attraverso un aumento della quantità di CE nel *core*. Ciò è spiegato dal modo in cui Apo E è disposta sulle HDL: essa è piegata a metà, formando 2 fasce circolari a forma di ferro di cavallo.

Diversi studi hanno riportato un'associazione tra il polimorfismo dell'Apo E, alti livelli plasmatici dei lipidi e malattie cardiovascolari. La Apo E4 è stata associata con più alti livelli plasmatici di C a causa della sua ridotta affinità per il recettore della proteina. Questo può conferire una predisposizione per l'aterosclerosi in individui che esprimono questo fenotipo. E' stato visto che l'allele $\epsilon 4$ è associato

con una larga varietà di malattie neurologiche. Attualmente si pensa che i processi neurodegenerativi dipendono dalla fonte cellulare di Apo E (astrociti, neuroni, o microglia), dalla natura di vari fattori dannosi e dalla struttura delle isoforme di Apo E.

L'allele ApoE $\epsilon 2$, al contrario, è associato a bassi livelli plasmatici di C a causa della ridotta affinità dell'ApoE2 per il recettore delle LDL, che causa il rallentamento del legame delle particelle lipoproteiche. Con l'aumentata concentrazione dei recettori si ha una aumentata clearance del C plasmatico. In alcuni casi, individui omozigoti *Apo* $\epsilon 2/\epsilon 2$ sviluppano una iperlipoproteinemia di Tipo III perché la funzione dell'ApoE è così compromessa che alte concentrazioni di particelle VLDL si accumulano nel siero. Studi hanno confermato che *Apo* $\epsilon 2$ e *Apo* $\epsilon 3$ effettivamente mantengono la condizione fisiologica delle cellule, mentre ciò vale molto meno per *Apo* $\epsilon 4$.

1.7 Ruolo del colesterolo nell'aterogenesi.

Le arterie sono i vasi adibiti al trasporto del sangue ossigenato ai vari distretti del corpo (con l'unica eccezione delle arterie polmonari). Esse sono costituite da tre tuniche stratificate: intima, media e avventizia.

L'aterosclerosi è una patologia che interessa la tunica intima delle arterie di grande e medio calibro (aorta, coronarie, carotidi, femorali e iliache). Nei vasi colpiti, si formano placche costituite da depositi di grassi, tessuto fibroso e calcio che possono determinare ulcerazione della parete e fenomeni ostruttivi o occlusivi.

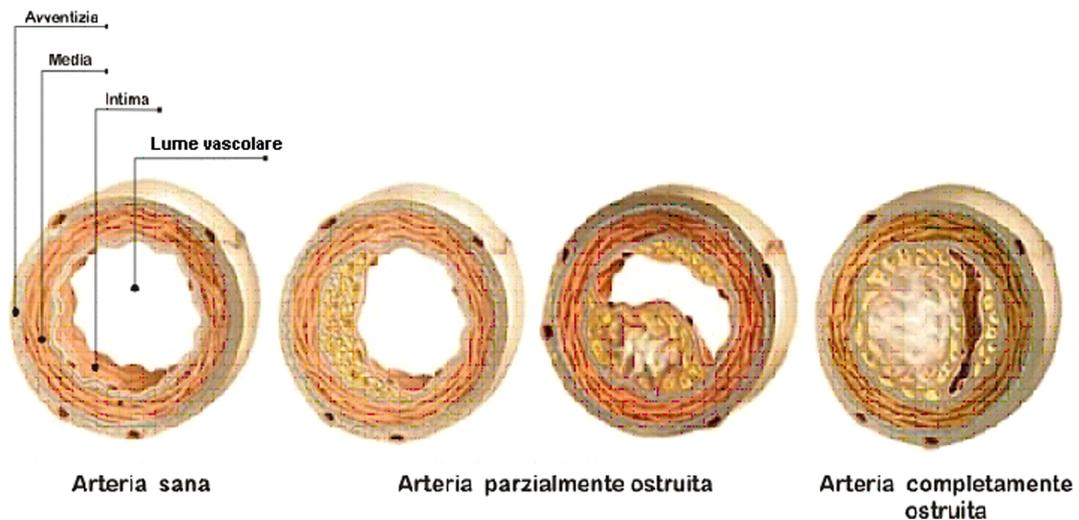


Fig 6 : Vasi ostruiti da placche aterosclerotiche.

In effetti, le lesioni aterosclerotiche rappresentano una serie di risposte molecolari e cellulari molto specifiche che, nel loro insieme, possono essere descritte come una malattia infiammatoria (Ross, 1999). Mentre la causa delle lesioni iniziali può variare da individuo a individuo, anche a seconda del punto della lesione, il risultato finale è sorprendentemente costante.

Sebbene questa patologia, nota come disfunzione endoteliale, sia associata ad un gran numero di fattori di rischio (obesità, ipertensione, età, iperglicemia, fumo, ipercolesterolemia), la sua causa maggiore sembra essere l'eccessivo accumulo di C nelle cellule e nel plasma. Tuttavia, il processo di aterogenesi è molto di più. Alla formazione della placca aterosclerotica concorrono essenzialmente i seguenti fattori.

- Le piastrine, componenti particolati del sangue (di origine cellulare), le quali normalmente, sono responsabili della riparazione di lesioni del vaso sanguigno, che avviene mediante un fenomeno di aggregazione piastrinica nella zona della lesione, associato al rilascio di sostanze vasocostrittrici.

- La disfunzione endoteliale: l'endotelio vascolare non produce più sostanze vasodilatatrici (come le prostaglandine) o iperpolarizzanti (come H_2O_2), ma promuove la diapedesi dei leucociti.
- L'esposizione di collagene: l'assenza di cellule endoteliali consente l'attivazione del processo di coagulazione del sangue (quindi, la formazione di trombi che peggiorano l'ostruzione) e il rimodellamento della matrice cellulare.

In questo contesto, un eccesso di C cellulare provoca l'inibizione della sintesi dei recettori per le LDL, una maggior persistenza di queste ultime a livello plasmatico (quindi, una maggiore probabilità di ossidazione), l'esposizione a livello endoteliale di molecole di adesione cellulare VCAM-1 ed ICAM (alle quali aderiscono i monociti circolanti per la diapedesi) (Cybulsky and Gimbrone, 1991) e, in casi estremi, necrosi ed esposizione di collagene (Kellner et al., 1998). La necrosi, dunque, se non causata da fenomeni meccanici o chimici provenienti dall'esterno, è un evento provocato dalla forza di taglio del flusso ematico su membrane cellulari endoteliali, irrigidite da eccesso di C, o da danni ossidativi alle membrane stesse (Yeagle, 1991; Schroeder et al., 1991). Quando ciò succede, in zone di forte turbolenza emodinamica (quali le biforcazioni del tessuto arterioso) o ad alte velocità di flusso (come l'aorta), il monostrato endoteliale può trovarsi nell'impossibilità di riparare prontamente la lesione; ciò permette l'infiltrazione massiva delle LDL circolanti, dando inizio alla serie di eventi che portano alla formazione dell'ateroma (Shireman, 1996; Steinberg, 1998).

Le LDL possono attraversare per diffusione semplice l'intima, composta principalmente dalle cellule endoteliali di rivestimento delle pareti vasali, dalla matrice extracellulare sottostante (tessuto connettivo) e da uno strato di cellule muscolari lisce (che protrudono

verso la matrice).

E' opinione comune che l'ossidazione delle LDL avvenga principalmente nell'intima delle arterie, in microdomini non raggiungibili dagli antiossidanti. Esse possono essere modificate da numerosi e differenti meccanismi; tuttavia, ad oggi, non c'è accordo su quello che possa predominare *in vivo*. Si tratta, comunque, di un processo mediato da radicali liberi che porta a numerosi cambiamenti strutturali che dipendono tutti da un evento iniziale, la lipoperossidazione. Via via che le LDL si accumulano, sia i lipidi che le proteine di cui sono composte vanno incontro ad ossidazione, provocata da specie reattive dell'ossigeno o dell'azoto, rilasciate dal metabolismo cellulare. Sembra che le cellule delle pareti dei vasi interpretino questi cambiamenti strutturali come un segnale di pericolo, per cui siano indotte a richiamare i componenti del sistema immunitario. Inizialmente, durante l'ossidazione delle LDL, nello spazio subendoteliale, si formano le mm-LDL, che sono caratterizzate da una leggera perossidazione dei lipidi e dall'entrata nella cellula per mezzo del recettore classico delle LDL. Esse possono indurre l'adesione dei leucociti all'endotelio e la secrezione della proteina-1 chemiotattica dei monociti (MPC-1 : *Monocyte Chemiotactic Protein-1*) e del fattore macrofagico che stimola la formazione di colonie (M-CSF : *Macrophage Colony Stimulation Factor*). Questo porta al legame e al reclutamento dei monociti nell'endotelio e alla successiva migrazione nello spazio subendoteliale, dove M-CSF promuove la loro differenziazione in macrofagi tissutali. I macrofagi, a loro volta, possono modificare le mm-LDL in una forma più ossidata.

Forme modificate di LDL, quali l'acetil-LDL o le ox-LDL, sono captate da macrofagi con un meccanismo di endocitosi, mediata da SR. Poiché SR non è regolato da C intracellulare, le LDL endocitate si

accumulano. In tal modo, i macrofagi, si riempiono di goccioline lipidiche e assumono il caratteristico aspetto di *foam cell*. L'aumento delle foam cell e la loro deposizione lungo la parete vasale assume l'aspetto di stria lipidica. Contro strie ed ateromi insorge un meccanismo di difesa basato sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete, probabilmente indotta da un fattore che si libera dalle piastrine che aderiscono al subendotelio (PDGF). Tale meccanismo ha lo scopo di isolare la regione danneggiata, piuttosto che rimuovere il C accumulato. Il C, infatti, è così insolubile che non può essere eliminato dal punto della lesione, ma può solo continuare ad accumularsi provocando una lenta ma progressiva crescita della placca ateromatosa e delle strie lipidiche (Paoletti et al., 1997).

In fig. 6 sono riassunti le alterazioni morfofunzionali associati alla formazione della placca ateromatosa.

Le molecole infiammatorie possono promuovere l'ulteriore crescita della placca e la formazione di un "cappuccio fibroso" sopra il nucleo lipidico. Il cappuccio si sviluppa quando citochine inducono le cellule muscolari lisce della tonaca avventizia a migrare alla superficie dell'intima, a moltiplicarsi ed a produrre una matrice spessa e fibrosa (secrezione e accumulo di collagene e fibronectina), la quale immobilizza e compatta le cellule. Il cappuccio accresce le dimensioni della placca ma, allo stesso tempo, la avvolge, isolandola dal flusso sanguigno. Via via che il cappuccio matura, la regione sottostante subisce alcune modificazioni, la più evidente delle quali è la morte di parte delle foam cell, che liberano lipidi ossidati ed altre sostanze citotossiche, causando la necrosi del tessuto sottostante .

Le placche ateromatose, per gran parte della loro esistenza, si espandono all'esterno dell'arteria anziché infiltrarsi nel lume, senza causare nessun danno evidente. Quando le placche si espandono

contro la membrana basale endoteliale, si ha una notevole riduzione dell'elasticità della parete vasale ed un restringimento del lume del vaso, causandone la stenosi ed ostacolando il flusso ematico verso i tessuti, fino a determinare condizioni di occlusione (ischemia).

Nella progressione dell'aterosclerosi, le sostanze infiammatorie prodotte dalle cellule schiumose possono indebolire la struttura del cappuccio, producendo enzimi proteolitici capaci di digerire il collagene ed impedire alle cellule muscolari lisce di produrne altro. In queste condizioni, il cappuccio non può essere più riparato, la tenuta della struttura di contenimento della massa sottostante è indebolita e linee di frattura si generano nella placca: allora, il fattore tissutale, un potente procoagulante, viene a contatto col plasma determinando la formazione di trombi. I trombi perturbano il flusso laminare, trasformandolo in flusso vorticoso. Quest'ultimo agendo meccanicamente sui trombi, causa il loro distacco e migrazione finché una riduzione di calibro vascolare non li blocchi; in queste condizioni, il flusso ematico viene interrotto e le cellule a valle subiscono danni da carenza di ossigeno, nutrienti e segnali (Steinberg, 1998; Gorog, 1992). Quando il trombo è sufficientemente grande, anche senza staccarsi, può bloccare il flusso di sangue verso il cuore, provocando infarto del miocardio e cioè la morte del tessuto cardiaco (Libby, 2002).

L'aterosclerosi, quindi, è considerata come una malattia infiammatoria, mediata dal sistema immunitario; in questo contesto, è ormai documentato che il meccanismo di attivazione dei macrofagi viene sollecitato da anticorpi prodotti contro le forme ossidate sia di C delle LDL sia di altre proteine. A tal proposito, per sostenere l'ipotesi che l'infiammazione, in quanto caratterizzata da aumentati livelli plasmatici delle "proteine della fase acuta", costituisce un fattore non

solo di progressione, ma anche di predisposizione all'aterosclerosi, abbiamo condotto le nostre ricerche su un gruppo di persone con patologia infiammatoria cronica: l'artrite reumatoide (Parke et al., 1991; Parke et al., 1996).

1.8 L'Aptoglobina.

L'Aptoglobina (Hpt) è una α_2 -sialoglicoproteina che, in condizioni fisiologiche, è presente nel plasma a basse concentrazioni. I valori fisiologici variano da 0,38 mg/mL a circa 2,27 mg/mL (Langlois et al 1996). Essa è sintetizzata dal fegato sotto lo stimolo di vari fattori, tra cui IL-1, IL-6, TNF- α . Queste citochine sono prodotte dai macrofagi o altre cellule (come, ad esempio, i fibroblasti di tessuti con alterazioni strutturali) durante le prime fasi di un'inflammatione: ciò rende conto degli aumentati livelli di Hpt nel plasma, durante tale evento.

Hpt presenta tre fenotipi nell'uomo (Hpt 1-1, Hpt 1-2 e Hpt 2-2); essa è una proteina oligomerica, con ciascun monomero costituito da una subunità pesante (detta β) ed una subunità leggera (detta α_1 o α_2).

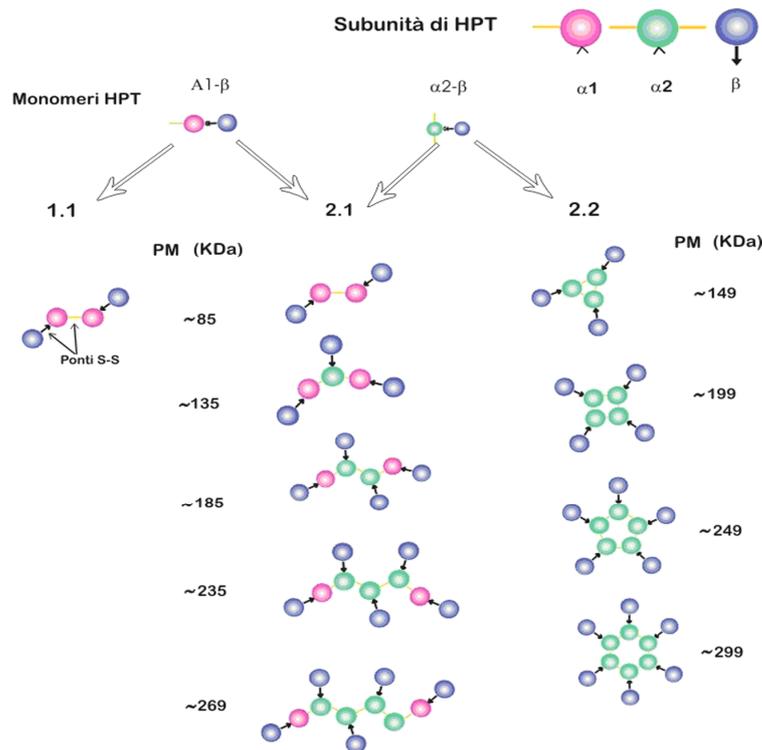


Fig. 7 : Differenze strutturali tra i fenotipi di Hpt.

La catena β , ha un PM di circa 40 kDa (Kurosky et al., 1980) ed è invariante; la catena α è prodotta da almeno tre alleli: Hpt^{1F} , Hpt^{1S} , Hpt^2 . Le due subunità $\alpha1F$ (fast) e $\alpha1S$ (slow) differiscono solo per l'amminoacido in posizione 54, che può essere, rispettivamente, un residuo di lisina o glutammato; il loro PM è di circa 8.9 kDa. La subunità $\alpha2$, invece, risulta dalla fusione delle due catene leggere (fast e slow), probabilmente a causa di un crossing-over eterologo (Bowman e Kurosky, 1982) ed ha un PM di 16 kDa (Black e Dixon, 1968). Le conseguenze di questo allele "pesante" della catena α sono molteplici e rendono gli studi su Hpt umana molto complessi. Per comprendere tale complessità è necessario chiarire peculiarità strutturali responsabili non solo del polimorfismo fenotipico, ma anche dell'eterogeneità oligomerica di Hpt. Il monomero $\alpha\beta$ si forma tramite un ponte disolfuro tra le due diverse subunità, mentre il dimero $\alpha\beta-\alpha\beta$ è dovuto ad un ponte disolfuro tra due catene α . Mentre $\alpha1F$ e

α_1 S sono monovalenti, cioè possono formare un solo ponte disolfuro con un'altra catena, α_2 è bivalente. A seconda del fenotipo espresso (Hpt 1-1 o Hpt 2-2, in omozigosi, e Hpt 1-2 in eterozigosi), si potranno avere diversi tipi di molecole. Mentre il dimero (86 kDa) è l'unica forma di Hpt che si può ritrovare nei plasmi di persone con fenotipo Hpt 1-1, nei plasmi Hpt 1-2 e, soprattutto, in quelli con Hpt 2-2 saranno presenti un gran numero di isoforme a diverso PM (da 86 a 334 kDa per Hpt 1-2; da 149 a 348 kDa per Hpt 2-2). Inoltre, è da sottolineare che, a causa del fatto che α_1 è monovalente e α_2 è bivalente, le isoforme dell'Hpt 1-2 sono dei polimeri lineari, mentre quelle dell'Hpt 2-2 sono polimeri circolari (Fig.7).

La struttura del dimero di aptoglobina (Hpt 1-1) è simile a quella delle immunoglobuline, ma ha anche un'alta omologia con la struttura di proteasi seriniche come tripsina, chimotripsina, trombina, plasmina ed elastasi. Nonostante la perdita (evolutiva) di attività proteasica, questa proteina ha acquisito un'alta affinità ($K_a > 10^{10}$ molare⁻¹) per l'emoglobina (Hb). Sembra, dunque, che la funzione principale di Hpt sia quella di legare Hb, rilasciata durante l'emolisi. Dopo essere stata legata da Hpt, Hb viene trasportata al fegato; in tal modo viene ridotta la potenziale tossicità del ferro, coordinato dall'eme, ed esso può essere riciclato per l'emopoiesi. Il legame Hb-Hpt sembra coinvolgere solo legami non covalenti, vista l'inibizione per mezzo di polielettroliti, e coinvolge la sola catena β di Hpt che si lega stechiometricamente ad un dimero $\alpha\beta$ di Hb. Tramite questo complesso, in cui è impegnato presumibilmente il 50% di Hpt plasmatica, viene catabolizzata circa 1 g di Hb al giorno (ovvero 1/6 del totale turnover di Hb).

Tra i ruoli svolti da Hpt c'è la stimolazione dell'angiogenesi (Cid et al.,1993) e l'inibizione della sintesi di prostaglandine (Jue et al.,

1983; Beisambaeva et al., 1990). Inoltre, è stato dimostrato il legame di Hpt a CD22 presente sulle cellule B (Hanasaki et al., 1995) e sono state descritte proprietà antinfiammatorie (El Ghmati et al., 1996) ed immunosoppressive di questa proteina (Oh et al., 1987; Quaye et al., 2000). Il polimorfismo di Hpt gioca un ruolo anche nella risposta immunitaria. Soggetti con fenotipo Hpt 2-2 producono livelli di anticorpi contro il virus dell'epatite B significativamente più bassi rispetto a quelli con fenotipo Hpt 1-1 e Hpt 1-2; il fenotipo influenza non solo il numero, ma anche la cinetica della risposta degli anticorpi anti-HBs (Louagie et al., 1993).

E' noto che Hpt (Giblett, 1974; Cerda et al., 1990), lega Apo AI (Kunitake et al., 1994; Salvatore et al., 2007) ed Apo E (Salvatore et al., 2009) che sono esposte sulle HDL: una delle ipotesi, alla base di questo lavoro sperimentale è che, a causa di questo legame, potrebbe venir meno la necessaria stimolazione di LCAT da parte di Apo AI (Balestrieri et al., 2001) e Apo E. Infatti, Hpt, legandosi a queste apolipoproteine potrebbe mascherare il sito di legame con LCAT; questo fenomeno potrebbe avvenire per ingombro sterico, data la grande massa molecolare di Hpt in confronto a quella delle due apolipoproteine. E' facile immaginare quale possa essere la conseguenza di questi eventi e quanto possa essere importante il rapporto $Hpt/(Apo\ AI + Apo\ E)$ per un efficiente funzionamento di RCT.

Hpt, legando Apo AI e Apo E, potrebbe inibire l'attività di LCAT, fondamentale per la rimozione del C e per l'omeostasi strutturale e funzionale del tessuto endoteliale. Abbiamo appurato, inoltre, nei precedenti paragrafi, come il cattivo funzionamento di uno dei meccanismi del RCT possa essere alla base di tutta una serie di eventi che portano alla formazione di un ateroma. Dunque,

l'approfondimento dell'attività di Hpt sembra importante per definire, a livello molecolare, ragioni e contesto del rischio di malattie cardiovascolari e per approntare nuove terapie e modalità di prevenzione. Appare, quindi, di cruciale importanza lo studio dell'interazione tra Hpt e Apo AI e Apo E e degli effetti inibitori dei singoli fenotipi sull'attività LCAT.

1.9 Il peptide P2a.

In precedenti lavori scientifici, è stato possibile individuare la regione di Apo AI implicata nel legame con Hpt. Ulteriori indagini, effettuate con l'utilizzo di peptidi sintetici, hanno permesso di restringere la zona specifica di interazione. Tale sequenza è risultata essere Leu¹⁴¹-Ala¹⁶⁴, e questo peptide è stato denominato P2a (Fig. 8).

LSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLA

Fig. 8 : Sequenza amminoacidica del peptide P2a.

Esperimenti di competizione tra P2a e le HDL per il legame ad Hpt, mostrano le capacità del peptide di modulare tale legame. Inoltre, in altri esperimenti si analizza l'influenza del peptide sul legame di Hpt con Hb (Spagnuolo et al., 2005). Questa funzione fisiologica di Hpt, che è la più importante svolta da questa proteina, non viene minimamente influenzata da P2a in esperimenti di competizione in vitro.

L'attività di LCAT in vitro, risulta essere drasticamente inibita dalla presenza di Hpt. In effetti, quest'ultima legando Apo AI impedisce una corretta stimolazione dell'enzima e di conseguenza la sua funzionalità è limitata. Quest'effetto inibitorio è annullato dalla presenza di P2a in un saggio dell'attività di LCAT in presenza di Hpt (Spagnuolo et al., 2005).

È opportuno notare che l'aumento della concentrazione di Hpt durante la fase acuta dell'infiammazione, potrebbe causare un accumulo maggiore di C nelle cellule endoteliali e nelle arterie, rappresentando un fattore di rischio come riportato in letteratura (Spagnuolo et al., 2003). Le proprietà del peptide P2a sopra descritte ne fanno un candidato per entrare nella rosa dei potenziali farmaci da testare contro le malattie cardiovascolari.

2. OBIETTIVI

Un'ipotesi su cui si basa parte di questo lavoro di ricerca è che Hpt, legando Apo A-I o Apo E, possa inibire l'attività di LCAT, fondamentale per la rimozione del colesterolo e per l'omeostasi strutturale e funzionale del tessuto endoteliale. Da ciò ne consegue il cattivo funzionamento del RCT con l'innescarsi di tutta una serie di eventi che portano alla formazione di un ateroma.

La nostra attività di ricerca è quindi finalizzata allo sviluppo di molecole in grado di migliorare RCT. In particolare l'approccio biochimico prevede lo sviluppo di nuove molecole capaci di competere con Apo A-I o con Apo E nel legame ad Hpt (Fig. 9). Nel contempo, queste molecole non devono alterare la proprietà di legame di Hpt nei confronti di Hb, né essere immunogene.

EFFETTO DI UN INIBITORE DI Hpt DURANTE L'INFIAMMAZIONE

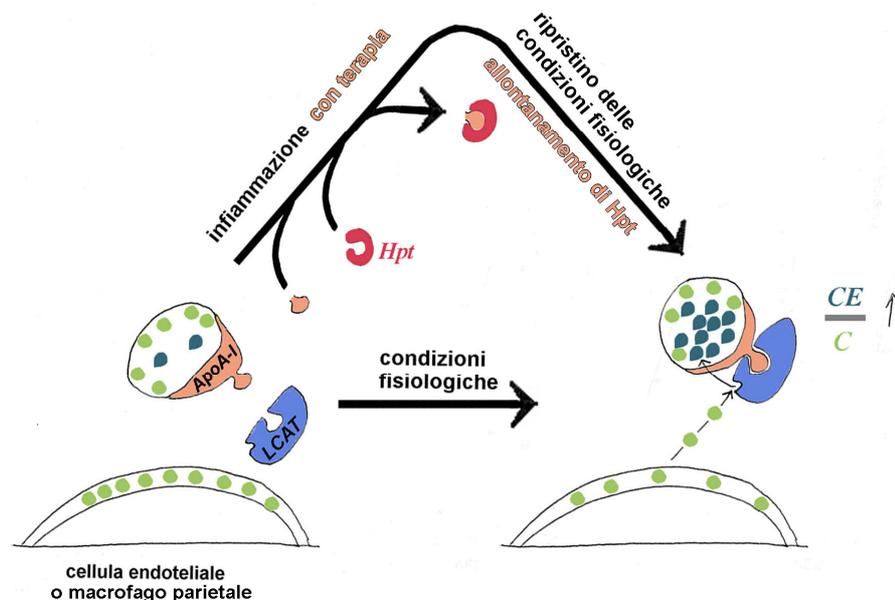


Fig. 9 : Rappresentazione schematica del meccanismo di RTC. In figura è mostrato il meccanismo d'azione di molecole biologiche durante un processo infiammatorio.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Sono stati acquistati dalla Sigma (agenzia di Milano) i seguenti prodotti: albumina di siero bovino (BSA); albumina umana (HSA); Emoglobina bovina (Hb); Hpt purificata del fenotipo 2-1; anticorpi anti-Hpt umana (IgG policlonali di coniglio, da ora denominati Ab anti-Hpt); anticorpi contro la regione Fc degli anticorpi di coniglio, coniugati con perossidasi di rafano (IgG policlonali di capra, da ora indicati come Ab GAR-HRP); perossido di idrogeno; 4-cloro-1-naftolo. Apo AI e l'anticorpo anti-Apo AI (IgG policlonali di coniglio, Ab anti-Apo AI) sono stati acquistati dalla Calbiochem (Inalco, Agenzia di Milano). Apo E umana (fenotipo 3) e l'anticorpo anti-Apo E (IgG policlonali di capra) sono stati acquistati dalla Vinci Biochem (Vinci, Italia). I peptidi di P2a e i peptidi che si sovrappongono parzialmente alla sequenza amminoacidica di Apo E D65 to R191, sono stati sintetizzati da INBIOS (Napoli, Italia), usando standard Fmoc chemistry, con biotinilazione di N-termini.

Dalla Millipore (agenzia di Milano) sono state acquistate le membrane di PVDF, per il trasferimento in campo elettrico delle proteine, e i filtri di nitrocellulosa per filtrare le soluzioni. C triziato [$1\alpha,2\alpha(n)$ - ^3H - C] è stato acquistato dalla NEN (agenzia di Milano). Lastrine di silice Sil-G (0.25 mm), per la cromatografia su strato sottile, della Macherey-Nagel (Duren, Germany) sono state usate. Materiale monouso, sali ed altre sostanze chimiche per la preparazione e la manipolazione di reattivi e soluzioni, sono state acquistati da rivenditori di Napoli.

3.2 Metodi

3.2.1 Elettroforesi.

L'elettroforesi dei peptidi derivanti dal taglio di Apo E con bromuro di cianogeno (CNBr) o trombina, in condizioni riducenti e denaturanti (SDS-PAGE), è stata eseguita su gel discontinuo, sostanzialmente in accordo al metodo di Schagger e Von jagon 1987. Per preparare il gel, è stata utilizzata una soluzione madre di acrilammide e bis-acrilammide (N,N'-metilene-bisacrilammide), rispettivamente al 30% ed allo 0,8%. Il gel di separazione era costituito da una matrice di poliacrilammide al 18% o al 15%, contenente 300 mM Tris-HCl a pH 8.8 e 0,1% SDS. Per la polimerizzazione sono stati utilizzati, come catalizzatori, persolfato di ammonio e TEMED (N,N,N',N'-tetrametil, etilendiammina), secondo una procedura pubblicata. Le dimensioni del gel di separazione erano: 8 cm (altezza) x 6,5 cm (larghezza) x 0,15 cm (spessore); quelle del gel superiore, in cui erano stati formati pozzetti per inserimento di apposito stampo di plastica, erano: 2 cm (altezza) x 6,5 cm (larghezza) x 0,15 cm (spessore). Il tampone di corsa (a pH 8.3) è stato preparato sciogliendo 14,4 g di glicina e 3 g di Tricina in un litro di acqua bidistillata, a cui sono stati aggiunti 10 ml di 10% SDS. I campioni, preparati in un tampone riducente e denaturante (62,3 mM Tris-HCl a pH 8.6, 10% di glicerolo, 5% β -mercaptoetanololo, 0.3% blu di bromofenolo, 5% SDS) (O'Farrell, 1975), sono stati incubati a 100°C per 5 min e, poi, caricati nei pozzetti sul gel. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato immerso in una soluzione contenente 25% isopropanolo e 10% acido acetico, allo scopo di fissare le proteine. Dopo circa 1 h, la soluzione di fissaggio è stata rimossa e sostituita con un'altra simile, contenente 0.25% di colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250). Dopo 1 h di colorazione, il gel è stato decolorato, mediante ripetuti lavaggi con acido acetico al

10%, finché non è stato ottenuto uno sfondo trasparente. Tutte le procedure sopra descritte sono state effettuate sotto costante agitazione, a temperatura ambiente.

Il trasferimento delle proteine da gel a membrana (detto comunemente *Western blotting*) è stato effettuato essenzialmente in accordo a un protocollo pubblicato (Porta et al., 1999). Dopo l'elettroforesi, il gel e una membrana di PVDF (precedentemente attivata in metanolo) sono stati equilibrati per 20 min in tampone di trasferimento (20 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanolo, pH 8.3) a 4°C. Le proteine sono state trasferite su membrana di PVDF mediante migrazione in campo elettrico. Tale campo è stato prodotto con uno strumento costituito da due piattafornie di grafite o metallo con funzione di elettrodi (Sammy-dray; Macherey-Nagel; Duren, Germany). La membrana è stata adagiata su tre fogli di cellulosa a contatto con l'anodo; sulla membrana è stato deposto il gel e, su di esso, altri tre fogli di cellulosa sono stati sovrapposti: i fogli, imbevuti di tampone, sono serviti per assicurare la continuità del campo elettrico. Sono state adottate condizioni di trasferimento variabili, a seconda della grandezza del gel: l'intensità di corrente a cui si trasferiscono le proteine deve essere di 3,5 mA per cm² di gel; il tempo di trasferimento è stato di 3 h. Dopo il trasferimento delle proteine, la membrana è stata lavata 2 volte (10 min ciascuna) con EWB (ELISA washing buffer: 20mM Tris-HCl a pH 7,3; 130 mM NaCl; 0,05% Tween-20): la membrana è stata, poi, incubata per 1 h a 37°C con 1% gelatina in EWB, per saturare eventuali siti aspecifici di legame per gli anticorpi. Dopo due lavaggi (come sopra) in EWB, la membrana è stata incubata per 1 hr a 37°C con 0,1 mg/ml di Hpt. Dopo due lavaggi (come sopra) in EWB, la membrana è stata incubata per 1 hr a 37°C con l'anticorpo specifico per l'antigene, opportunamente diluito; la diluizione, in 1% gelatina, è

stata fatta 1:500 per Ab anti-Hpt. Dopo altri due lavaggi in EWB, la membrana è stata incubata per 1 h a 37°C con l'anticorpo secondario (Ab GAR-HRP, diluito 1:800 in 1% gelatina). Infine, la membrana è stata lavata ancora in EWB e due volte in TBS (Tris buffer salino 20 mM Tris-HCl pH 7,3; 500 mM NaCl) (dieci minuti per ciascun lavaggio). L'attività dell'enzima perossidasi, legato all'anticorpo secondario è stata rivelata mediante l'aggiunta della soluzione di sviluppo (33% metanolo, 0,03% H₂O₂ e 4 mM 4-cloro-1-naftolo in TBS), che ha prodotto la comparsa di bande scure in corrispondenza degli immunocomplessi formati.

3.2.2 Procedimento ELISA : Valutazione dell'affinità di peptidi biotinilati ad Hpt o HDL immobilizzate su piastra.

E' stata preparata una soluzione di Hpt (Soluzione madre 4,65 µg/µl) in tampone di coating (7,3 mM Na₂CO₃ pH 9,6- 17,4mM NaHCO₃-1,5 mM NaN₃).

Durante la fase di Coating le proteine interagiscono con il pozzetto della micropiastra, formando legami stabili; dunque, aliquote della soluzione di Hpt (50 µl) sono state deposte nei pozzetti e successivamente incubate per tutta la notte a 4°C, per permettere la formazione di tali legami.

Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate 3 volte con il tampone EWB (ELISA washing buffer: 20mM Tris-HCl a pH 7,3; 130 mM NaCl; 0,05% Tween-20) e tre con TBS (Tris buffer salino: 20 mM Tris-HCl pH 7,3; 500 mM NaCl).

La capacità legante dei pozzetti sulla piastra è stata successivamente saturata mediante incubazione (37°C, 1h) con 0.5% BSA in TBS (fase

di blocking) . Dopo la suddetta fase, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto.

Sono state successivamente preparate soluzioni in DB (0,25% BSA in EWB) dei seguenti peptidi biotinilati: Ala-scan 146, Ala-scan 147, Ala-scan 149, Ala-scan 150, Ala-scan 151, Ala-scan 153, Ala-scan 155, Ala-scan 157, Ala-scan 161, Ala-scan 162, P144-161, P144-158, P144-155 e P2a (8 μM , 24 μM , 80 μM , 240 μM per ciascun peptide).

Aliquote di 50 μl di questi campioni sono state trasferite in triplicato, in ogni micropozzetto, il tempo di incubazione per questa fase di Binding è stato di 105 min, alla temperatura di 37°C. Dopo l'incubazione della piastra in stufa è stato ripetuto il lavaggio precedentemente descritto. A questo punto si è proceduto all'incubazione con l'avidina, diluita 1:4000 in DB (0,25% BSA in EWB). Aliquote (60 μl) di questa diluizione sono state trasferite in ogni micro pozzetto. Dopo l'incubazione della piastra (37°C per 1 h), è stato ripetuto il lavaggio della piastra. La fase seguente prevedeva l'aggiunta ad ogni micro pozzetto di 100 μl di una soluzione contenente il substrato per la perossidasi (20 mg OPD e 120 μl di 3% H_2O_2 , disciolti in 50 μl di una soluzione a pH 5, contenente 300 mM acido citrico e 700 mM NaHPO_4). La reazione che si verificava prevedeva la scissione ad opera della perossidasi di H_2O_2 , producendo in tal modo radicali che colpiscono l'OPD presente in soluzione. La modificazione del bersaglio, in questo caso OPD, trasformato in un composto colorato, è stata determinata come indice dell'attività enzimatica. Questa fase è durata 30 minuti a 37°C. La reazione enzimatica è stata bloccata aggiungendo ad ogni pozzetto 50 μl di 2,5 M H_2SO_4 . In seguito all'incubazione con il substrato, si è sviluppato un colore in misura proporzionale alla concentrazione dell'enzima presente. Di conseguenza lo sviluppo del colore rifletteva la

concentrazione di complessi formati dal legame dell'avidina con i peptidi biotinilati. La misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm dei campioni ha permesso di determinare la quantità di peptidi biotinilati legati all'aptoglobina.

3.2.3 Sintesi dei peptidi.

Tutti i peptidi che si sovrappongono parzialmente alla sequenza di Apo A-I sono stati sintetizzati usando una cromatografia in fase solida (Spagnuolo et al., 2005). Le sintesi peptidiche sono state effettuate con “348Ω Advanced Chemtech multiple peptide synthesizer” usando una resina PAL-PEG-PS (Perseptive Biosystem, Hamburg, Germany). Il distacco dei peptidi dalla resina è stato ottenuto con il trattamento con una miscela di acido trifluoroacetico , triisopropilsilano , acqua, 1,2-etanditiolo (90:2.5:2.5:5, v:v:v:v) a temperatura ambiente. In seguito tutti i peptidi sono stati precipitati con etiletere, e disciolti in appropriate miscele di aceto nitrile e acqua, e purificati tramite HPLC con una colonna C18 (Juppiter; Phenomenex, Torrance, CA). Infine la purezza e l'identità dei peptidi è stata analizzata con Voyager instrument (Perseptive Biosystems).

3.2.4 Procedimento ELISA : Spiazzamento di Hpt da HDL, Hb o Apo E immobilizzate su piastra con l'utilizzo di peptidi.

E' stata preparata una soluzione di HDL, Hb o Apo E in tampone di coating.

Durante la fase di Coating le proteine interagiscono con il pozzetto della micropiastra, formando legami stabili; dunque, aliquote della soluzione di Hpt, Hb o Apo E (600 ng in 50 µl) sono state deposte nei pozzetti e successivamente incubate per tutta la notte a 4°C, per permettere la formazione di tali legami.

Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate tre volte con il tampone EWB e tre con TBS.

La capacità legante dei pozzetti sulla piastra è stata successivamente saturata mediante incubazione (37°C, 1h) con 0.5% BSA in TBS. Dopo la suddetta fase, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto.

Sono state successivamente preparate soluzioni in DB contenenti 1 µM Hpt e i seguenti peptidi : Ala-scan 146, Ala-scan 147, Ala-scan 149, Ala-scan 150, Ala-scan 151, Ala-scan 153, Ala-scan 155, Ala-scan 157, Ala-scan 161, Ala-scan 162, Apo-Aib, P2a e peptidi mimetici di Apo E (8 µM, 24 µM, 80 µM, 240 µM per ciascuno dei peptidi).

Aliquote di 50 µl di questi campioni sono state trasferite in triplicato, in ogni micropozzetto; il tempo di incubazione per questa fase di legame di Hpt alle proteine su pozzetto è stato di 105 min, alla temperatura di 37°C. Dopo l'incubazione della piastra in stufa è stato ripetuto il lavaggio precedentemente descritto. A questo punto si è proceduto all'incubazione con anticorpo anti-Hpt di coniglio, diluito 1:3000 in DB. Aliquote (60 µl) di questa diluizione sono state trasferite in ogni micro pozzetto. Dopo l'incubazione della piastra (37°C per 1 h), è stato ripetuto il lavaggio della piastra, e si è proceduto all'incubazione con anticorpo anti-coniglio legato a perossidasi, diluito 1:5000 in DB. La fase seguente prevedeva l'aggiunta ad ogni micro pozzetto di 100 µl di una soluzione contenente il substrato per la perossidasi (20 mg OPD e 120 µl di 3% H₂O₂ , disciolti in 50 µl di una soluzione a pH 5, contenente 300 mM acido citrico e 700 mM NaHPO₄) . La reazione che si verificava prevedeva la scissione ad opera della perossidasi di H₂O₂, producendo in tal modo radicali che colpiscono l'OPD presente in soluzione. La

modificazione del bersaglio, in questo caso OPD, trasformato in un composto colorato, è stata determinata come indice dell'attività enzimatica. Questa fase è durata 30 minuti a 37°C. La reazione enzimatica è stata bloccata aggiungendo ad ogni pozzetto 50 µl di 2,5 M H₂SO₄. In seguito all'incubazione con il substrato, si è sviluppato un colore in misura proporzionale alla concentrazione dell'enzima presente. Di conseguenza lo sviluppo del colore rifletteva la concentrazione di complessi formati dagli anticorpi con Hpt rimasta su piastra. La misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm dei campioni ha permesso di determinare indirettamente la quantità di Hpt legata alle proteine che erano state immobilizzate su pista, e la quantità spiazzata mediante l'uso di peptidi.

3.2.5 Saggio dell'attività di LCAT.

L'attività dell'enzima LCAT è stata determinata misurando la conversione del C in CE, utilizzando, come substrato dell'enzima, un proteoliposoma artificiale, preparato in accordo ad una metodica pubblicata (Chen e Albers, 1982; Sparks et al.,1992). La preparazione del proteoliposoma è stata effettuata miscelando, in un tubo di vetro di 15 ml, 0,08 ml di fosfatidilcolina (50 mg/ml), 0,018 ml di una soluzione etanolica di colesterolo (1 mg/ml) e 0,0289 ml di una soluzione etanolica di [1α,2α(n)-³H]-C (1 µCi/ml). La miscela risultante è stata portata a secco, sotto flusso di azoto, a temperatura ambiente: a questo punto, sono stati aggiunti nel tubo 0,15 ml di tampone TBE (10 mM Tris-HCl a pH 7,4, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) e 0,021 ml di una soluzione di 725 mM sodio colato in TBE. La dispersione è stata agitata vigorosamente, per 3 min, e incubata a 37°C per 1,5 h; anche durante l'incubazione, la miscela è stata agitata

vigorosamente (ogni 10 min), affinché diventasse completamente chiara. Al termine dell'incubazione, 0,033 ml di Apo AI (3,28 mg/ml) sono stati aggiunti alla miscela ed è stata effettuata una seconda incubazione di 1 h a 37°C. Infine, la miscela è stata dializzata in TBE, per 20 h a 4°C, per rimuovere il colato. Nel proteoliposoma così preparato il rapporto molare Apo AI: fosfatidilcolina: C era 1.5: 200: 18.

Il saggio dell'attività di LCAT è stato effettuato, quindi, preparando diversi tubi in cui sono stati aliquotati 8,3 µl di HSA al 6% e 10 µl di sospensione di proteoliposoma diluito 1: 20, Hpt e il peptide Apo-Aib a concentrazioni. I diversi tubi sono stati portati ad un volume finale di 100 µl con TBE e preincubati a 37°C per 30 min. Dopo questa fase, sono stati aggiunti 2,5 µl di 2 mM β-mercaptoetanolo e 3,5 µl di un pool di plasma umano, precedentemente deprivato di LDL e VLDL e HDL (per trattamento con 0,16 M CaCl₂ e 0,65% destran-solfato, seguito da centrifugazione e recupero del supernatante) (Burstein et al., 1970). La miscela è stata agitata e incubata a 37°C per 60 min. Al termine dell'incubazione, la reazione enzimatica è stata bloccata con 130 µl di etanolo assoluto. A ciò sono seguite 3 estrazioni sequenziali, ciascuna con 500 µl di esano. Gli estratti di esano sono stati riuniti e la miscela risultante è stata portata a secco sotto flusso di azoto; successivamente, il materiale è stato ridisciolti in 50 µl di cloroformio e trasferito su una lastrina (gel di silice, su supporto di plastica) per TLC (*Thin Layer Chromatography*) utilizzando capillari di borosilicato. La fase mobile, per la TLC, era costituita da etere di petrolio / etere etilico / acido acetico in rapporto 90:30:1. In queste condizioni, a causa di un'interazione differente con il tampone, colesterolo ed esteri del colesterolo migrano con velocità diverse; in particolare, gli esteri (che sono molecole più apolari del colesterolo) si

ripartiscono preferenzialmente nella fase mobile e, quindi, migrano più velocemente, mentre il colesterolo si sposta solo di poco dal punto in cui è stato depositato. Alla fine della corsa, la lastrina è stata esposta a vapori di iodio. In tal modo, sono state evidenziate le aree raggiunte dalle migrazioni del colesterolo libero e del colesterolo esterificato. C standard (7 µg) è stato usato come controllo su ciascuna lastrina, per distinguere le due forme di C. Le lastrine sono state tagliate in modo da recuperare le aree contenenti C o CE, che sono state immerse in fiale di scintillazione, contenenti 3 ml di liquido di scintillazione (Insta-Gel). La radioattività incorporata nel prodotto di reazione (CE) o residua nel reagente (C) è stata misurata per fotometria di scintillazione. L'attività di LCAT è stata calcolata come percento di C esterificato in 1 h e, poi, convertita in attività molare (nmoli di C esterificato per h per ml di campione), secondo un uso diffuso in letteratura. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

3.2.6 Preparazione del Peptidosoma.

Un peptidosoma artificiale, è stato preparato sostanzialmente in accordo ad una metodica pubblicata (Chen e Albers, 1982; Sparks et al.,1992). La preparazione del peptidosoma è stata effettuata miscelando, in un tubo di vetro di 15 ml, 0,08 ml di fosfatidilcolina (50 mg/ml), 0,018 ml di una soluzione etanolica di C (1 mg/ml). La miscela risultante è stata portata a secco, sotto flusso di azoto, a temperatura ambiente: a questo punto, sono stati aggiunti nel tubo 0,15 ml di tampone TBE (10 mM Tris-HCl a pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) e 0,021 ml di una soluzione di 725 mM sodio colato in TBE. La dispersione è stata agitata vigorosamente, per 3 min, e incubata a 37°C per 1,5 h; anche durante l'incubazione, la miscela è

stata agitata vigorosamente (ogni 10 min), affinché diventasse completamente chiara. Al termine dell'incubazione, 0,033 ml di peptide Apo-Aib o PEX (X da PE1 a PE9) (3,28 mg/ml) sono stati aggiunti alla miscela ed è stata effettuata una seconda incubazione di 1 h a 37°C. Infine, la miscela è stata dializzata in TBE, per 20 h a 4°C, per rimuovere il colato. Nel proteoliposoma così preparato il rapporto molare Apo-Aib o PEX : fosfatidilcolina: colesterolo era 1,5: 200: 18.

4. RISULTATI

4.1 Legame di Peptidi mimetici di Apo AI, con sequenze parziali di P2a, ad Hpt immobilizzata su piastra.

In precedenti esperimenti è stato dimostrato che la sequenza di Apo AI che lega Hpt è costituita da 24 amminoacidi (141-164 denominata P2a). Questo peptide è capace di annullare l'effetto inibitorio di Hpt sull'enzima LCAT in un saggio enzimatico in vitro (Spagnuolo et al., 2005). Nell'ottica di migliorare il legame di P2a ad Hpt e la stabilità del peptide in soluzione e di diminuire i costi di produzione dei peptidi, sono stati sintetizzati due peptidi più corti rispetto alla sequenza di P2a e testati nel saggio di legame ad Hpt immobilizzata su piastra (Fig. 10).

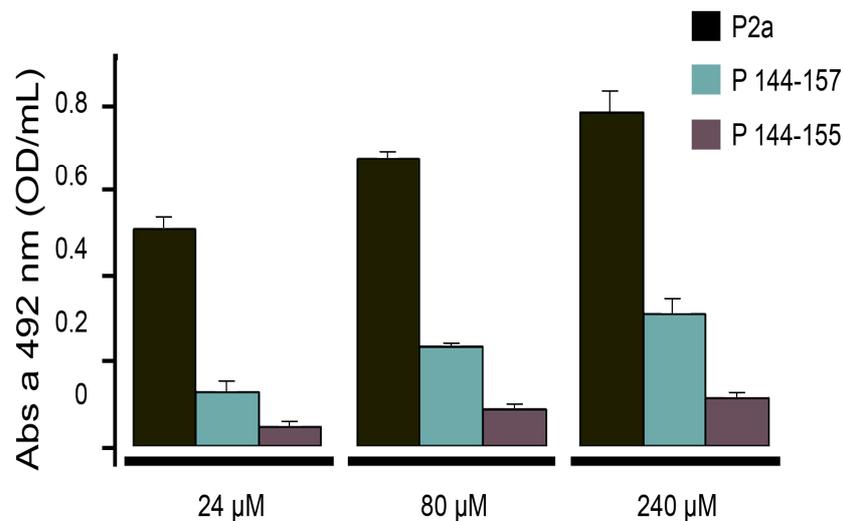


Fig. 10 : Comparazione di peptidi accorciati rispetto al P2a nella capacità di legare Hpt. Aliquote di peptidi accorciati e biotinilati (P144-157 e P144-155) a diverse concentrazioni (24, 80 e 240 μM) sono state incubate con Hpt immobilizzata su piastra. Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

I peptidi accorciati P144-157 e P144-155 dimostrano di avere minore affinità per Hpt rispetto al P2a, a tutte le concentrazioni testate.

4.2 *Legame di Peptidi mimetici di Apo AI, modificati con introduzione di alanine (Ala-scan) nella sequenza di P2a, ad Hpt immobilizzata su piastra.*

In questo esperimento l'approccio biochimico seguito è stato quello di valutare l'influenza di alcuni amminoacidi (soprattutto quelli carichi) sul legame tra Hpt e peptide. Sono stati sintetizzati dieci peptidi, in cui alcuni amminoacidi sono stati sostituiti con alanina (Ala) in determinate posizioni. Successivamente abbiamo valutato la capacità di questi peptidi di legare Hpt immobilizzata su piastra (Fig. 10). La sostituzione di Ala, in specifiche posizioni, aumenta notevolmente la capacità di P2a di legare Hpt. Le sostituzioni che hanno dato i risultati migliori sono quelle in posizione 146 (E→A), 157 (D→A), 162 (H→A), 149 (R→A), 150 (D→A).

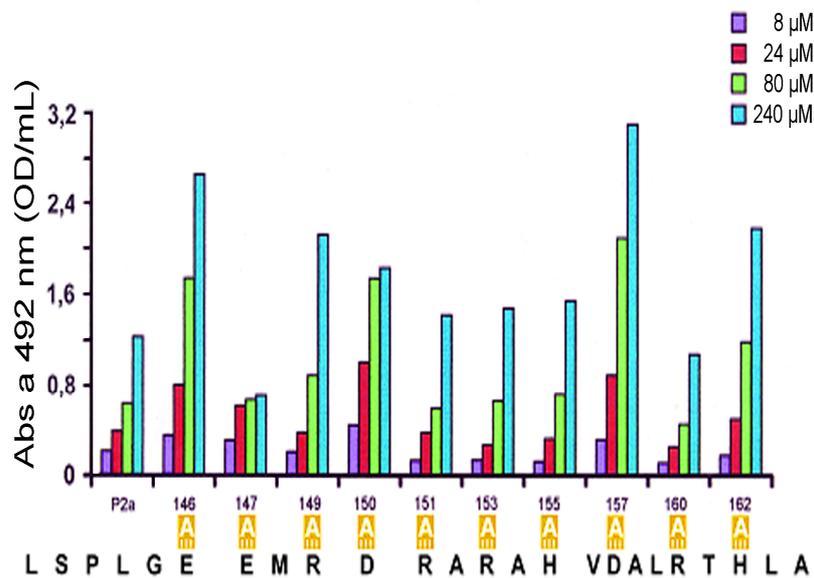


Fig. 11: Comparazione di peptidi, con sostituzioni di specifici residui di P2a con Ala, rispetto a P2a nella capacità di legare Hpt. Aliquote di peptidi (Ala in posizione 146,147, 149, 150, 151, 153, 155, 157, 160 o 162) a diverse concentrazioni (8, 24, 80 e 240 μM) sono state incubate con Hpt immobilizzata su piastra. Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.3 Spiazzamento di Hpt da HDL immobilizzate su piastra, con peptidi contenenti Ala nella sequenza di P2a.

Hpt lega le HDL interagendo con ApoAI o ApoE (Salvatore et al., 2009). È possibile immobilizzare le HDL sul fondo del pozzetto di una piastra, ed incubare queste lipoproteine con una determinata quantità di Hpt. Si può, poi, misurare il legame che ne scaturisce con l'utilizzo di anticorpi anti-Hpt. Quando l'incubazione suddetta viene effettuata in presenza di peptidi (o di qualsiasi altra molecola, in generale), il legame tra Hpt e HDL può risultare influenzato in maniera sostanziale. In particolare, più il peptide interagisce con Hpt, minore sarà il legame che la proteina stabilisce con le HDL. Questo tipo di esperimento prende il nome di spiazzamento (o competizione). Il risultato dell'esperimento di legame ad Hpt, effettuato con i peptidi contenenti Ala al posto di residui naturali, ci ha portato a ipotizzare che questi peptidi riuscissero a spiazzare Hpt dalle HDL in maniera più efficace rispetto al P2a. Lo spiazzamento con questi peptidi non ha confermato i risultati dell'esperimento di legame, in quanto peptidi essi, pur legando Hpt più efficientemente di P2a, la spiazzano peggio dalle HDL (Fig 12). A tutte le concentrazioni saggiate (8, 24, 80 e 240 μM), P2a risulta essere più efficace dei peptidi modificati, in questo tipo di esperimento.

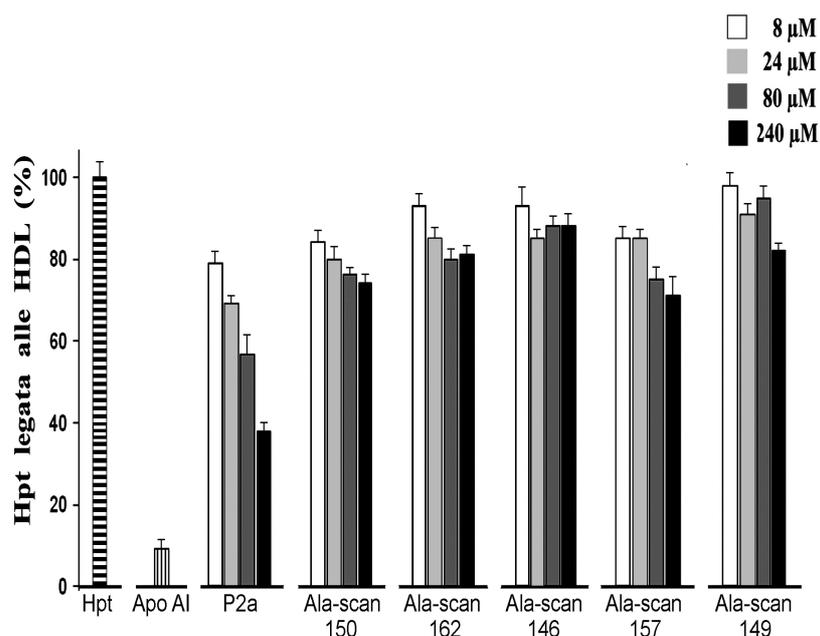


Fig. 12 : Spiazzamento di Hpt da HDL con peptidi contenenti Ala al posto di residui naturali nella sequenza di P2a. Aliquote di peptidi a diverse concentrazioni (8, 24, 80, 240 μ M) sono state analizzate per la loro capacit  di interferire con il legame tra Hpt e HDL. I dati sono riportati come percento del valore ottenuto dall'incubazione della sola Hpt (barra con linee nere orizzontali). Ogni campione   stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.4 Legame dei peptidi alle HDL.

Per spiegare l'apparente incongruenza riscontrata nello spiazzamento di Hpt da HDL, mediante l'uso di peptidi contenenti Ala al posto di residui naturali nella sequenza di P2a, abbiamo ipotizzato che questi peptidi potessero interagire con le lipoproteine immobilizzate su piastra. Quindi, il peptide con la sostituzione Ala-146   stato testato per il suo legame diretto alle HDL. L'esperimento   stato realizzato usando tre diverse concentrazioni diverse del peptide (8, 24, 80 μ M). Inoltre il legame   stato anche seguito nel tempo come mostrato in figura 13. Il peptide ha interagito con le HDL, e questa sua interazione   stata proporzionale sia alla concentrazione adoperata che al tempo di incubazione. L'esperimento   stato ripetuto con i dieci peptidi,

sintetizzati modificando la sequenza di P2a, dando esito del tutto paragonabile (dato non mostrato).

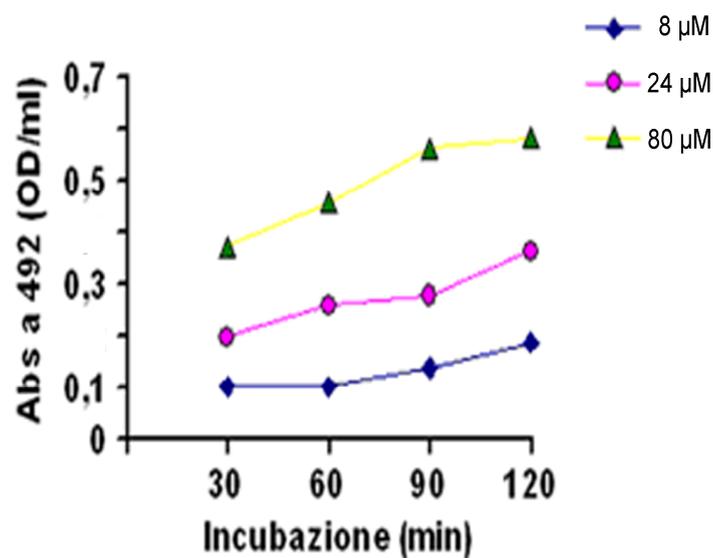


Fig. 13 : Cinetica di legame del peptide con Ala-146 a HDL.

Il passo successivo è stato quello di constatare se la semplice sostituzione di un amminoacido potesse modificare l'affinità del peptide P2a per le HDL. Quindi è stato effettuato un confronto tra il peptide P2a e quello con Ala-146 rispetto al legame per le HDL, in modo da avere una visione più completa del fenomeno. Alle concentrazioni testate (8 e 24 μ M) il peptide Ala-146 è risultato più affine alle HDL rispetto al P2a. Quindi la sostituzione amminoacidica ha reso il peptide più efficiente nel legare le HDL e Hpt.

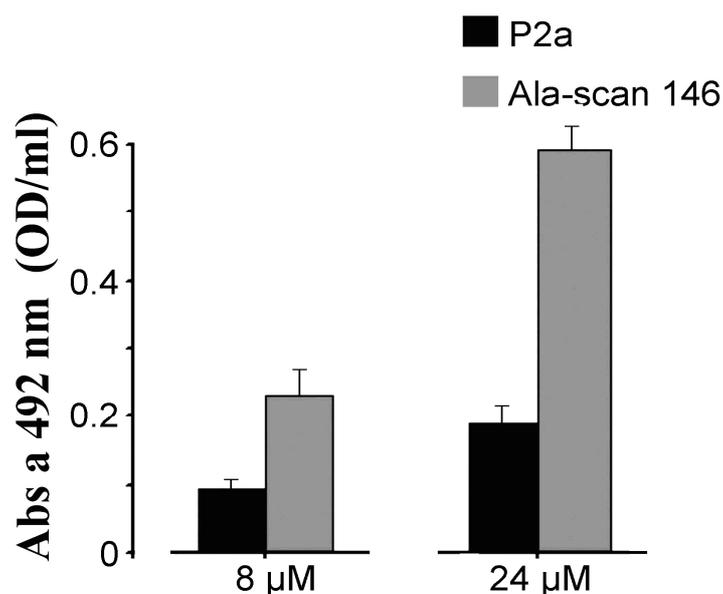
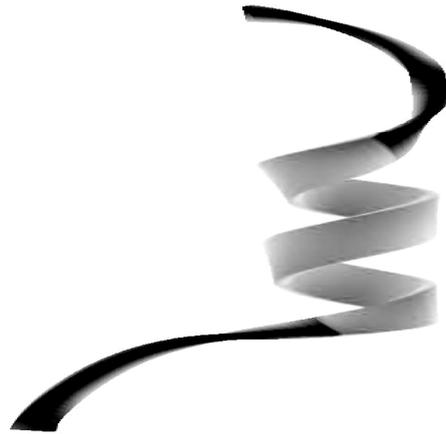


Fig. 14 : Comparazione tra P2a e Ala-146 per il legame a HDL. Aliquote di peptidi Ala-146 o P2a a diverse concentrazioni (8 e 24 μ M) sono state incubate con le HDL immobilizzate su piastra. Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.5 Stabilizzazione conformazionale di P2a.

Per cercare di superare i problemi riscontrati con l'utilizzo dei peptidi modificati con Ala, abbiamo cambiato il nostro approccio. Infatti, oltre a cercare di aumentare l'affinità del P2a per Hpt, abbiamo cercato di dare una struttura più fisiologica al peptide. Per fare in modo che P2a assumesse una conformazione ad α -elica, abbiamo effettuato delle sostituzioni amminocidiche in determinate posizioni della sequenza peptidica. In particolare, le sostituzioni suddette sono consistite nell'inserimento di alanine e gruppi amminoisobutilici (Fig 15). Il nuovo peptide ottenuto è stato denominato Apo-Aib.



141 LSPLGEEMRDRARAHVDALRTH LA 164

141 WAABAEEBRDRBRAH BDAARTHAA Apo-Aib

Fig 15 : Stabilizzazione conformazionale di P2a. Attraverso l'introduzione di Ala e gruppi amminoisobutilici in determinate posizioni, il peptide assume una struttura di α -elica in soluzione.

4.6 Legame di Apo-Aib a Hpt immobilizzata su piastra.

Il peptide Apo-Aib è stato saggiato per il legame diretto ad Hpt immobilizzata su piastra. Esso è stato anche saggiato in paragone al P2a, per verificare se la stabilizzazione conformazionale, da noi attuata, avesse reso quest'ultimo più affine ad Hpt e, nel contempo, idoneo ad essere usato in soluzioni biologiche ed in eventuali esperimenti futuri su esseri viventi. Come mostrato in Figura 16, il peptide Apo-Aib risulta più affine ad Hpt, rispetto al P2a. La differenza nella capacità di legare Hpt dei due peptidi si può apprezzare in modo significativo alle concentrazioni 80 e 240 μ M.

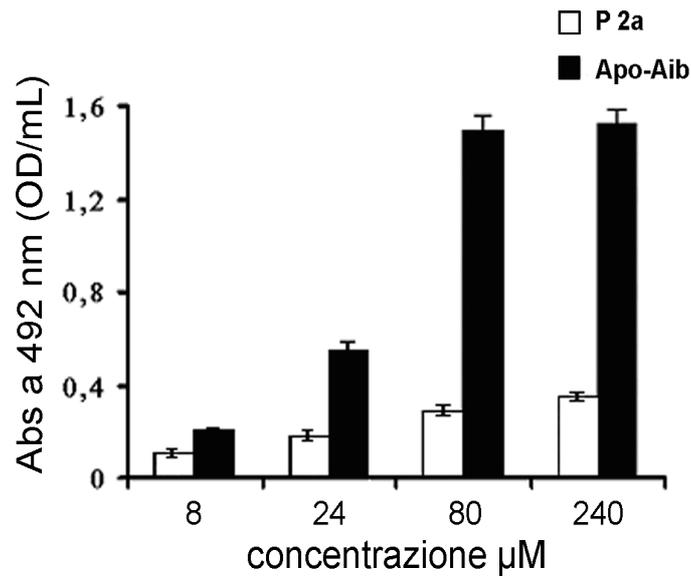


Fig.16 : Comparazione tra Apo-Aib rispetto al P2a nella capacità di legare Hpt. Aliquote di peptidi Apo-Aib a diverse concentrazioni (8, 24, 80 e 240 μM) sono state incubate con Hpt immobilizzata su piastra. Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.7 Saggio dell'attività di LCAT in presenza di Apo-Aib e Hpt.

Il risultato riscontrato nell'esperimento di legame ad Hpt su piastra, ci ha spinto a testare Apo-Aib in una serie di esperimenti in vitro, i quali costituiscono una tappa preliminare ad esperimenti su cellule o in vivo. Uno di questi esperimenti è rappresentato dall'utilizzo di Apo-Aib per annullare l'effetto inibitorio di Hpt nei confronti dell'attività di LCAT in vitro. In questo saggio, la fonte di LCAT è costituita dal plasma deprivato delle HDL, in quanto queste lipoproteine sono substrati naturali dell'enzima e potrebbero alterare il risultato del saggio stesso. I substrati sono contenuti in un proteoliposoma costituito da C (radioattivo) e fosfatidilcolina. Inoltre, il proteoliposoma contiene anche una proteina stimolatrice di LCAT cioè Apo A1. L'attività dell'enzima è espressa come CE formati per ora per ml di plasma. L'aggiunta di Hpt nel saggio, in quantità molar

almeno doppie rispetto a quelle di Apo A1 contenute nel liposoma, provoca l'inibizione dell'attività di LCAT (Balestrieri et al., 2001). Con l'aggiunta del peptide Apo-Aib, che interagisce con Hpt, l'inibizione risulta minore a concentrazioni basse del peptide (8 μM) mentre viene completamente annullata a concentrazioni elevate di peptide (240 μM) (Fig. 17). Quest'esperimento rappresenta un'ulteriore prova della capacità di Apo-Aib di interagire fortemente con Hpt, non solo quando quest'ultima risulta bloccata sul fondo di un pozzetto (esperimento di legame su piastra) ma anche in soluzione, che rappresenta una situazione più simile a quella fisiologica.

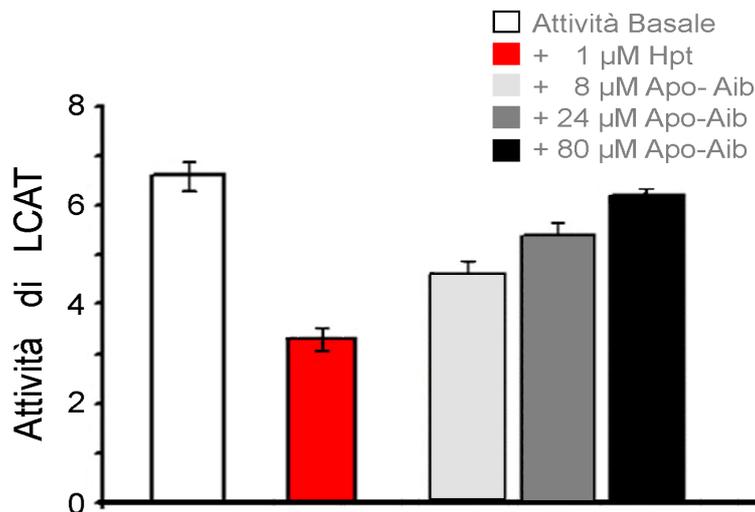


Fig.17: Saggio dell'attività di LCAT in presenza di Hpt e Apo-Aib. L'attività di LCAT è stata testata con l'uso di un proteliposoma contenente colesterolo triziato, fostatidilocolina e Apo AI. L'attività basale (barra bianca) è stata misurata anche in presenza di 1 μM Hpt (barra rossa) e in presenza di 1 μM Hpt e Apo-Aib a diverse concentrazioni (8 μM barra grigio chiaro, 24 μM barra grigio scuro, 80 μM barra nera). Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.8 Interferenza di Apo-Aib sul legame Hpt-Hb.

Un altro esperimento importante, in cui testare Apo-Aib, è l'analisi di competizione con Hb, immobilizzata su piastra, per Hpt.

L'importanza di questo saggio è dovuta al fatto che il peptide in nessun modo deve interferire in questo legame che risulta essere indispensabile per l'organismo (vedi introduzione par. 1.8). Il peptide è stato testato a tre diverse concentrazioni (8, 24 e 80 μM), e non sembra essere in grado di modulare l'interazione tra Hpt e Hb. In effetti anche quando nelle miscele è stato aggiunto il peptide, Hpt ha interagito preferibilmente con Hb legata su piastra.

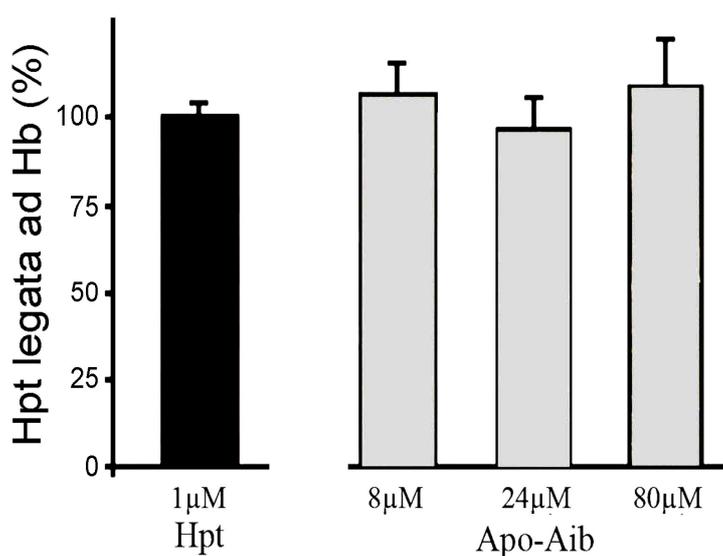


Fig. 18 : Spiazzamento di Hpt da Hb con il peptide Apo-Aib. Aliquote di peptidi Apo-Aib a diverse concentrazioni (8, 24, 80 μM) sono state analizzate per la loro capacità di interferire con il legame tra Hpt e Hb. I dati sono riportati come percentuale del valore ottenuto dall'incubazione della sola Hpt (barra nera). Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.9 Spiazzamento di Hpt da HDL con Apo-Aib.

Nell'ottica di confrontare le proprietà del peptide Apo-Aib con quelle di P2a, è stato eseguito l'esperimento di spiazzamento di Hpt da HDL immobilizzate su piastra. Alle concentrazioni più alte che sono state testate (80 μM) il peptide Apo-Aib ha spiazzato più Hpt dalle HDL, rispetto al P2a. Ciò costituisce un'ulteriore prova della interazione di Apo-Aib con Hpt.

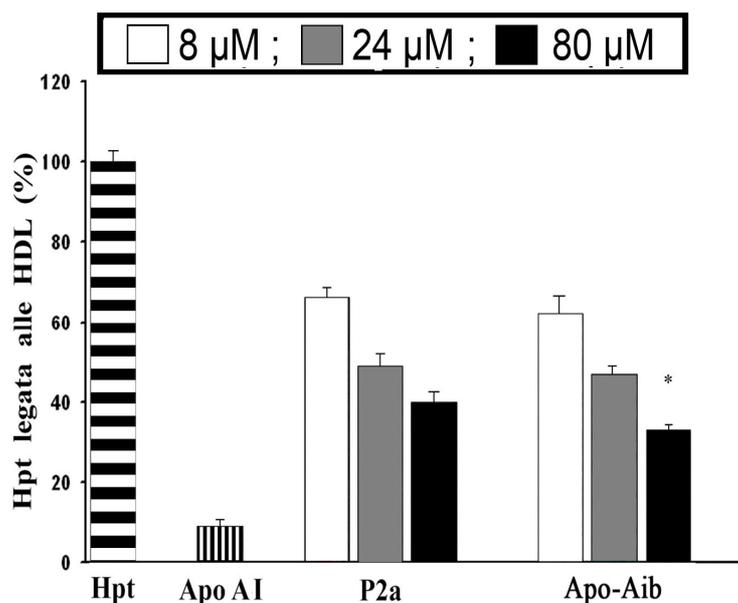


Fig. 19 : Spiazzamento di Hpt da HDL con il peptide Apo-Aib. Aliquote di peptidi Apo-Aib e P2a, a diverse concentrazioni, sono state analizzate per la loro capacit  di interferire con il legame tra Hpt e HDL. Aliquote di Hpt (50 μl), precedentemente incubate con P2a o Apo-Aib (8, 24, o 80 μM), sono state incubate in pozzetti, nei quali erano state precedentemente immobilizzate le HDL. Anti-Hpt IgG di coniglio e GAR-HRP IgG sono stati usati per rivelare Hpt legata alle HDL. L'ammontare degli immunocomplessi   stata determinata misurando l'assorbanza a 492 nm. I dati sono riportati come percento del valore ottenuto dall'incubazione della sola Hpt (barra con linee orizzontali). Ogni campione   stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.10 Spiazzamento di Hpt da HDL con Apo-Aib su liposoma.

Nell'ottica di proporre Apo-Aib come un potenziale candidato per trattamenti antiaterosclerotici, e quindi per verificare gli effetti della sua azione in vivo, abbiamo cominciato a pensare ad una struttura che sia capace di veicolarlo nell'organismo. Molti farmaci, al giorno d'oggi, sono veicolati da liposomi (Benson, 2009); quindi, anche noi abbiamo legato il peptide Apo-Aib ad un liposoma artificiale. Questo peptidosoma   stato testato nel saggio di legame ad Hpt dando esito positivo (dato non mostrato) ed   stato testato nello spiazzamento di

Hpt da HDL. Lo spiazzamento prodotto dal peptidosoma si può osservare in figura 20.

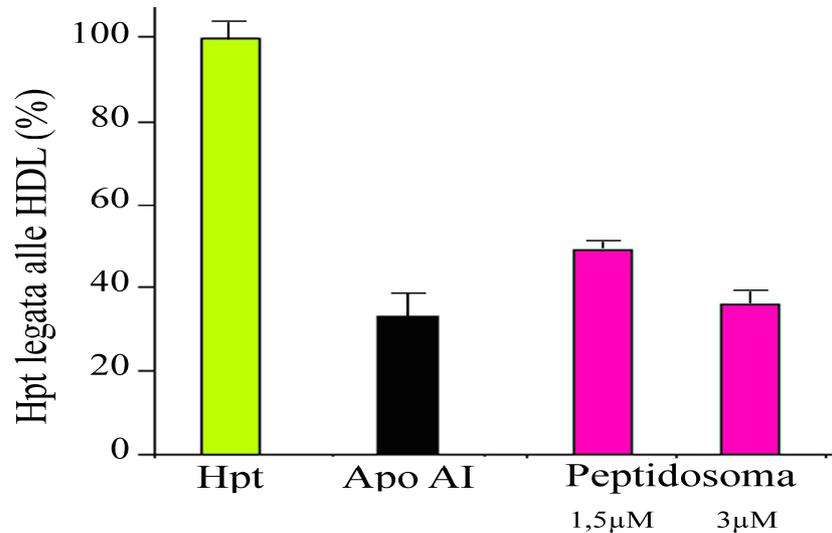


Fig. 20. Spiazzamento di Hpt da HDL con il peptide Apo-Aib lipidato. Aliquote di Apo-Aib lipidato, a diverse concentrazioni, sono state analizzate per la loro capacità di interferire con il legame tra Hpt e HDL. Aliquote di Hpt (50 µl), precedentemente incubate Apo-Aib lipidato (1,5 o 3 µM), sono state incubate in pozzetti nei quali erano state precedentemente immobilizzate le HDL. Anti-Hpt IgG di coniglio e GAR-HRP IgG sono stati usati per rivelare Hpt legata alle HDL. L'ammontare degli immunocomplessi è stato determinato misurando l'assorbanza a 492 nm. I dati sono riportati come percento del valore ottenuto dall'incubazione della sola Hpt (barra verde). Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS.

4.11 Legame di Hpt ad una specifica sequenza di Apo E : Taglio proteolitico con trombina.

La digestione di Apo E con trombina produce due frammenti primari (dal residui 1- 191 e 216-299). Questi frammenti sono stati separati, in condizioni denaturanti e riducenti, e, dopo il trasferimento su membrana di PVDF, sono stati incubati con Hpt. Il più grande dei frammenti da trombinolisi è stato rilevato da anticorpi anti-Hpt (Fig. 21).

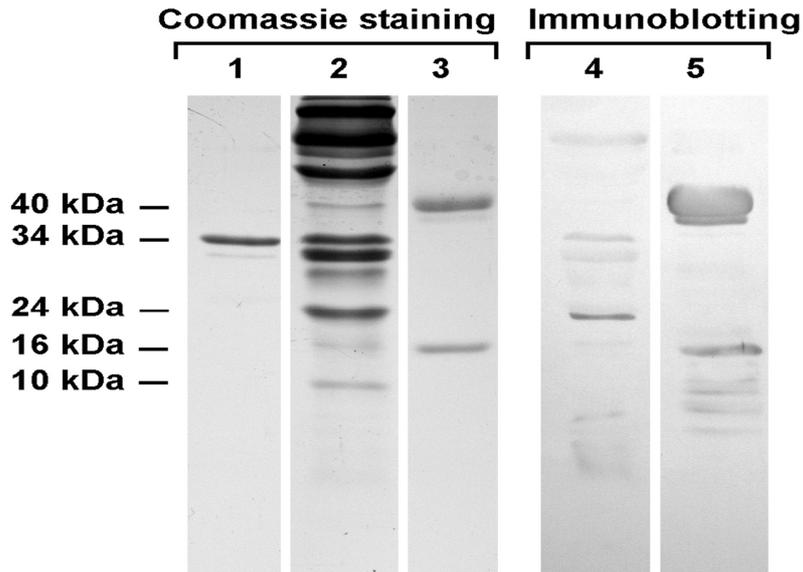


Fig. 21 : SDS-15% PAGE e Immunoblotting di frammenti derivati da digestione di ApoE con trombina. Campioni di 100 μ g di Apo E in 40 μ l sono stati caricati sul gel. Le proteine sono state frazionate con SDS-PAGE e colorate con Coomassie R250 (dal tracciato 1 al 3), o trasferite su membrane di PVDF per essere rilevate con anticorpi di coniglio anti-Hpt IgG and HRP-GAR (tracciati 4 and 5). Tracciato 1: ApoE; Tracciato 2: ApoE digerita con trombina; Tracciato 3: Hpt; Tracciato 4: ApoE, dopo blotting e l'incubazione della membrana con Hpt; Tracciato 5: Hpt , dopo blotting e l'incubazione della membrana.

4.12 Legame di Hpt ad una specifica sequenza di Apo E : Taglio con CNBr.

La frammentazione di Apo E con CNBr produce un numero elevato di peptidi. Questi peptidi sono stati separati, in condizioni denaturanti e riducenti e, dopo il trasferimento su membrana di PVDF, sono stati incubati con Hpt. In seguito, i complessi tra peptidi e Hpt sono stati rivelati con anticorpi anti-Hpt (Fig. 22). I peptidi sono stati poi analizzati per spettrofotometria di massa, la quale ha identificato le sequenze amminoacidiche 65-272 e 68-272. Sulla base di questi dati,

in aggiunta a quelli esposti nel paragrafo precedente, sembra ragionevole affermare che la regione di legame di Hpt, su Apo E, è localizzata nella sequenza che va da D65 a R191.

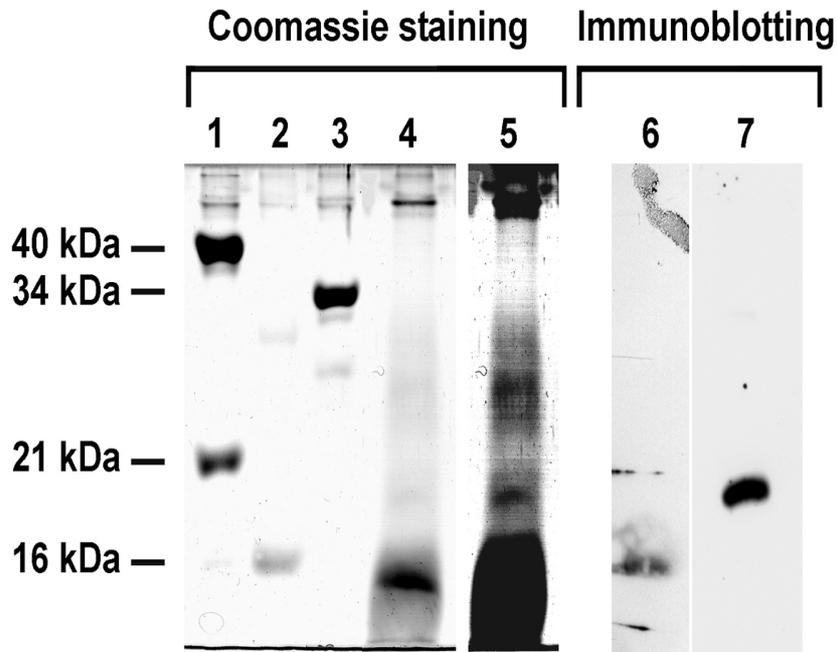


Fig. 22 : SDS-18% PAGE e Immunoblotting di frammenti derivati da digestione di ApoE con CNBr. Campioni di 100 μ g di ApoE in 40 μ l sono stati caricati sul gel. Le proteine sono state frazionate con SDS-PAGE e colorate con Coomassie R250 (dal tracciato 1 al 5), o trasferite su membrane di PVDF per essere rilevate con anticorpi di coniglio anti-Hpt IgG and HRP-GAR (tracciati 6 and 7). Tracciato 1: Hpt; Tracciato 2: Hb; Tracciato 3: Apo E; Tracciato 4: Apo E digerita con CNBr; Tracciato 5: ApoE digerita con CNBr (maggior contrasto); Tracciato 6: Hb, dopo blotting e l'incubazione della membrana con Hpt; Tracciato 7: Hpt legata a frammenti di ApoE, dopo blotting e l'incubazione della membrana con Hpt.

4.13 Legame di Hpt ad una specifica sequenza di Apo E: Uso di peptidi mimetici di Apo E per mappare il sito di legame tra le due proteine.

L'intera sequenza D65-R191 è stata divisa in nove peptidi che si sovrappongono parzialmente, e che sono stati coniugati alla biotina (Fig. 23).

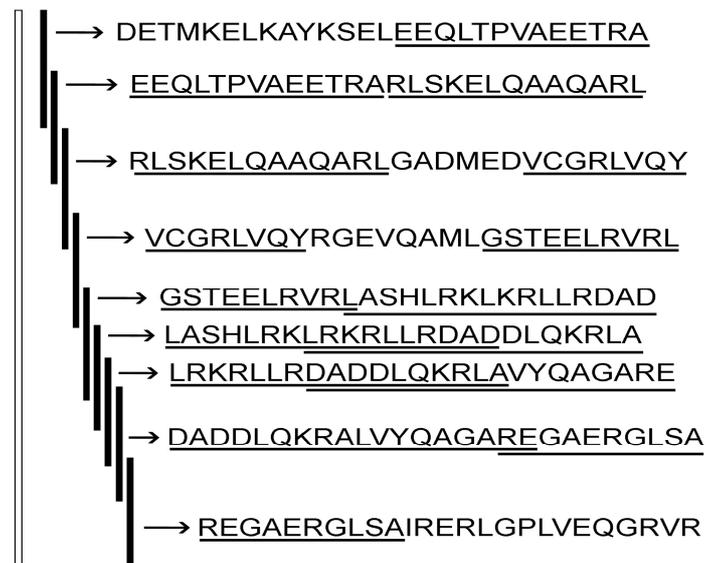


Fig. 23. La sequenza amminoacidica di Apo E dal residuo D65 al R191 è rappresentata dalla barra verticale sulla sinistra. Nove distinti peptidi che si sovrappongono alla sequenza (barre nere), sono stati sintetizzati.

I peptidi biotinilati, denominati da PE1 a PE9, sono stati testati per la loro capacità di legare Hpt dopo essere stati immobilizzati su fase stazionaria, cioè su piastre ELISA, ed è stata usata avidina-HRP per la rivelazione (dato non mostrato). I peptidi, in un secondo momento, sono stati lipidati, seguendo la stessa procedura usata per lipidare Apo-Aib, e testati nel saggio di spiazzamento di Hpt da Apo E immobilizzata su piastra. Lo spiazzamento prodotto dai peptidi lipidati

si può osservare in figura 24. I peptidi si comportano in maniera differente nell'esperimento; infatti, PE1 e PE3 (come del resto PE4, PE8 e PE9, non mostrati in figura) non producono nessuno spiazzamento. PE2 e PE7 producono spiazzamento, che però risulta inferiore a quello prodotto dai peptidi PE5 e PE6.

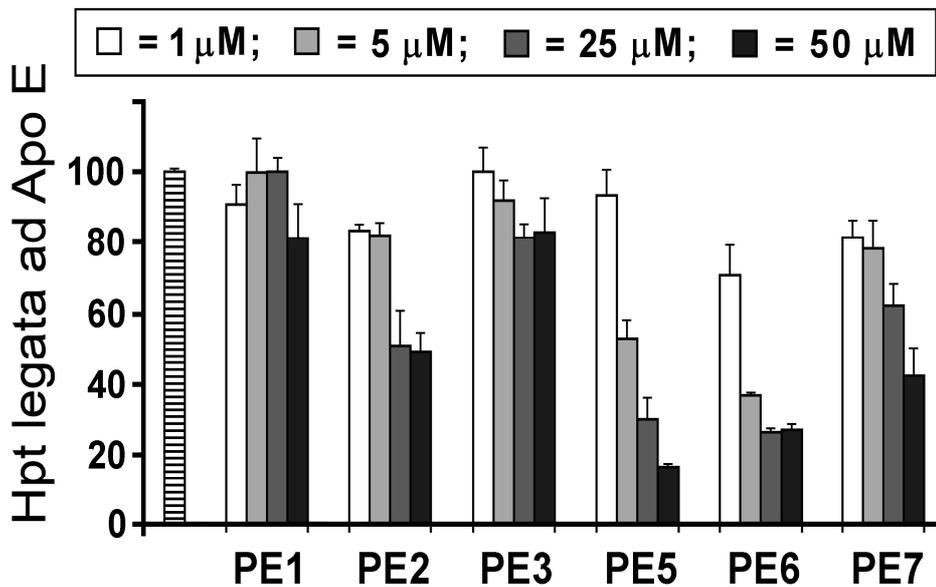


Fig. 24 : Competizione di peptidi mimetici di ApoE con ApoE per il legame ad Hpt. Peptidi mimetici di Apo E (PE1, PE2, PE3, PE4, PE5, PE6, PE7, PE8, PE9) sono stati lipidati e analizzati per la loro capacità di interferire con il legame tra Apo E e Hpt. Aliquote di Hpt (50 μ l), precedentemente incubate con peptidosomi (1, 5, 25, o 50 μ M peptide), sono state incubate in pozzetti nei quali era stata precedentemente immobilizzata Apo E. Anti-Hpt IgG di coniglio e GAR HRP IgG sono stati usati per rivelare Hpt legata ad ApoE. L'ammontare degli immunocomplessi è stato determinato misurando l'assorbanza a 492 nm. Il legame di Hpt non è stato rilevato in presenza di 1 μ M Apo AI. I dati sono riportati come percento del valore ottenuto dall'incubazione della sola Hpt (barra con linee orizzontali). Ogni campione è stato analizzato in triplicato e le barre indicano il valore di DS. I valori delle competizioni con PE4, PE8, e PE9 erano molto simili a quelli ottenuti con PE1, e non sono stati riportati in figura.

5. DISCUSSIONE

Molte sono le ricerche che hanno come obiettivo di trovare molecole e composti che siano in grado di migliorare il meccanismo di trasporto inverso del C, al fine di prevenire e curare malattie cardiovascolari. In questa ottica si inquadra il nostro sforzo nella ricerca di molecole che possano essere usati come potenziali farmaci antiaterosclerotici.

L'approccio della nostra ricerca ha avuto come bersaglio una proteina plasmatica Hpt. Quest'ultima è una proteina che svolge molte funzioni fisiologiche tra le quali il recupero di Hb fuoriuscita da i globuli rossi in seguito a fenomeni di emolisi fisiologica (Langlois e Delanghe, 1996). Inoltre, Hpt lega Apo AI e Apo E due lipoproteine essenziali nel meccanismo del trasporto inverso del C in quanto cofattori essenziali dell'enzima anti-aterosclerotico LCAT. Questo legame, in effetti, è molto importante in condizioni fisiologiche perché protegge entrambe le proteine da eventuali danni ossidativi causati da ROS. Queste ossidazioni danneggiano la struttura di queste lipoproteine e le rendono incapaci di stimolare efficientemente LCAT (Salvatore et al., 2009).

In condizione di infiammazione, quando la concentrazione di Hpt aumenta notevolmente, le lipoproteine non riescono a stimolare efficacemente LCAT e, quindi, viene recuperato meno C dalle cellule periferiche dell'organismo sotto forma di CE (Cigliano et al., 2005 ; Spagnuolo et al., 2005). L'accumulo di C, nel plasma, è alla base di tutta una serie di fenomeni che possono portare alla formazione di placche aterosclerotiche con conseguenze molto dannose per l'organismo.

Hpt influenza notevolmente l'attività di LCAT in un saggio enzimatico in vitro. Il peptide P2a è capace di legare Hpt e di

annullare l'effetto inibitorio di quest'ultima nel saggio sopra descritto (Spagnuolo et al., 2005).

In questo contesto si inquadra la nostra attività di ricerca, che ha lo scopo di migliorare il peptide P2a per renderlo più funzionale nel legare Hpt e nel contempo di trovare nuove molecole capaci di svolgere lo stesso tipo di funzione.

P2a è costituito da 24 amminoacidi della sequenza di Apo AI, da L141 a A164. Abbiamo cercato di ridurre il numero di amminoacidi di P2a in modo da rendere meno costosa la produzione del peptide. I due peptidi prodotti P144-157 e P144-155 sono stati testati nel saggio di legame ad Hpt, ma la loro capacità di legame si è dimostrata molto inferiore rispetto a quella del P2a. L'eliminazione di alcuni amminoacidi alla estremità della sequenza si è rivelata una strategia non praticabile, in quanto si tratta di amminoacidi che giocano un ruolo primario nel legame di P2a a Hpt.

L'approccio biochimico successivo ha portato alla sintesi di dieci peptidi. Ognuno di essi, rispetto al P2a, presentava un amminoacido sostituito con un'alanina. Alcuni di questi sono molto più efficienti di P2a nel legare Hpt. In particolare, la sostituzione di alcuni amminoacidi carichi (E, R) con alanina (amminoacido neutro) sembra aumentare la capacità del P2a di legare Hpt. In effetti, i peptidi per essere considerati più funzionali del P2a devono superare altri test biochimici, tra i quali l'esperimento di spiazzamento di Hpt da HDL immobilizzate su piastra. In questo esperimento, gli Ala-scan non hanno però confermato i risultati del legame diretto, e il P2a si è dimostrato più capace di spiazzare Hpt legata alle HDL mediante Apo AI o Apo E. Per dare una spiegazione a questo dato, apparentemente in contraddizione con le nostre teorie, abbiamo ipotizzato che i peptidi interagissero con le HDL. Per confermare la nostra ipotesi abbiamo

effettuato un esperimento di legame diretto dei peptidi alle HDL. In effetti abbiamo riscontrato un'interazione tra questi peptidi e HDL maggiore rispetto a quella del P2a e nell'esperimento di spiazzamento il risultato è stato falsato in quanto della concentrazione totale di peptide usata nel saggio, solo una parte era realmente disponibile per legare e spiazzare Hpt dalle HDL.

Per superare questo problema abbiamo cambiato la nostra strategia. In effetti il peptide P2a è stato analizzato per la sua capacità di strutturarsi in maniera fisiologica, dando esito negativo. Questa volta le modifiche della struttura di P2a sono consistite nell'inserimento di un gruppi ammino-isobutilici (Aib) e alanine nel peptide. Questa modifica è tale da far assumere al peptide modificato (Apo-Aib) una struttura ad alfa elica che lo rende più stabile. Il peptide Apo-Aib è stato testato nel saggio di legame ad Hpt e si è rivelato molto più funzionale di P2a a tutte le concentrazioni saggiate. Siamo passati quindi a testare Apo-Aib nel saggio di attività di LCAT in presenza di Hpt. Anche in questo caso, il nostro peptide modificato si è dimostrato capace, sebbene alle più alte concentrazioni testate, di annullare l'effetto inibitorio di Hpt sulla produzione di CE da parte di LCAT. L'ulteriore test biochimico a cui abbiamo sottoposto Apo-Aib è stato lo spiazzamento di Hpt da Hb immobilizzata su piastra. L'esperimento in questo caso è fondamentale perché in nessun modo il peptide deve interferire con la capacità di Hpt nell'espletare la sua maggiore funzione fisiologica cioè quella di legare Hb libera nel plasma a causa di fenomeni di emolisi fisiologica. Anche questo esperimento ha dato esito positivo in quanto il legame Hpt-Hb, di per se molto forte, non viene minimamente influenzato da Apo-Aib, anche alle concentrazioni più elevate di peptide usate. Non ci rimaneva che testare Apo-Aib nel saggio di spiazzamento di Hpt dalle HDL, saggio in cui avevano

fallito gli Ala-scan. Nel confronto con P2a Apo-Aib si è dimostrato superiore nello spiazzare Hpt dalla HDL, sebbene alle più alte concentrazioni testate (80 μ M). Nel progettare eventuali sviluppi futuri, non potevamo tener conto del fatto che il peptide in quanto tale difficilmente può essere iniettato in un animale modello. Questa osservazione deriva dal fatto che il peptide deve poter persistere nell'animale un tempo sufficiente per espletare la sua funzione. In realtà è possibile, che date le sue dimensioni, il peptide veicolato in un animale modello venga facilmente espulso attraverso il rene. Quindi abbiamo pensato di realizzare un peptidosoma, cioè una struttura lipidica sulla quale il peptide possa essere legato in modo da risultare più resistente alle proteasi e più difficilmente espulso attraverso il rene. Il peptidosoma ha mantenuto inalterata la capacità di legare Hpt e di spiazzarla apprezzabilmente dalle HDL. Inoltre, un miglioramento sensibile è stato riscontrato nell'esperimento di spiazzamento. Questo miglioramento è dovuto al fatto che è stata usata una quantità di peptide lipidato sensibilmente minore rispetto alla quantità di Apo-Aib non lipidato, per ottenere la stessa percentuale di spiazzamento.

Contemporaneamente allo sviluppo di Apo-Aib, abbiamo seguito una strategia diversa, con lo stesso fine di trovare e sviluppare nuove molecole in grado di migliorare RCT.

Hpt lega Apo E (Salvatore et al., 2009). Abbiamo cercato di sfruttare nel miglior modo questa informazione al fine di trovare altre molecole in grado di legare Hpt. Apo E è formata da 299 amminoacidi, nel tentativo di mappare il sito di legame, il nostro primo esperimento è consistito nell'effettuare un taglio proteolitico della proteina mediante l'uso di trombina. Quest'enzima nella sua azione proteolitica, produce due frammenti 1-191 e 216-299. I frammenti, dopo essere stati separati mediante gel elettroforesi e trasferiti su membrana, sono stati

incubati con Hpt. Questo esperimento ci ha permesso di appurare che Hpt lega il più grande dei frammenti, cioè 1-191.

Nell'esperimento successivo, la proteina è stata tagliata chimicamente con l'uso di CNBr, il quale produce un numero elevato di frammenti. Questi ultimi sono stati separati mediante elettroforesi e trasferiti su membrana. Hpt incubata su membrana si è legata al frammento, che l'analisi di massa ha rivelato essere 65-272. Dopo questi esperimenti, abbiamo ragionevolmente pensato che il sito di legame tra Hpt e Apo E fosse situato nella regione D65-R191.

Il sito di legame tra Hpt e Apo E è stato mappato precisamente usando peptidi sintetici, mimetici di Apo E. In effetti sono stati sintetizzati nove peptidi che coprissero l'intera sequenza D65-R191. Data la prospettiva interessante aperta dall'esperimento condotto con Apo-Aib su liposoma e la possibilità di poter veicolare i peptidi in organismi modello, i peptidi mimetici di Apo E sono stati lipidati e utilizzati per spiazzare Hpt da Apo E immobilizzata su pozzetto. I peptidi più efficaci sono risultati essere PE5 e PE6. Ciò non solo ci ha dato la possibilità di assegnare il sito di legame tra Hpt e Apo E, che quindi ricade nella zona della sequenza coperta dai due peptidi (che in verità parzialmente si sovrappongono), ma ci ha permesso di avere due nuove molecole, in aggiunta ad Apo-Aib, da testare in esperimenti in vivo come nuovi farmaci antiaterosclerotici.

6. PROSPETTIVE

I nostri programmi futuri prevedono l'ulteriore sviluppo di questi peptidi, di cui abbiamo studiato la funzione biologica in esperimenti in vitro.

Uno step successivo prevede l'utilizzo dei peptidi in esperimenti in vivo su topi.

Infatti i topi costituirebbero un ottimo modello su cui testare le funzioni biologiche dei peptide. In letteratura sono descritti molte metodiche per indurre in un topo uno stato di infiammazione. Si possono adoperare tra l'altro numerosi agenti infiammatori. In queste condizioni, risulta ampiamente descritto che la concentrazione di Hpt nel plasma aumenta notevolmente e limita l'azione di LCAT nel recupero del C dalle cellule periferiche dell'organismo.

Sono queste le condizioni nelle quali potrebbe essere testato uno dei peptidi individuato dal nostro gruppo di ricerca.

La nostra preferenza cadrebbe nell'iniettare il peptide coniugato ad un liposoma in modo da impedirne la fuoriuscita dall'organismo attraverso il rene. Dopo prelievo del plasma dai topi, dovremo valutare il suo effetto sul ripristino dell'attività di LCAT per confermare l'ipotesi di partenza della nostra ricerca.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Auwerx JH, Deeb S, Brunzell JD. Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. *Biochemistry* 1988;27:2651-2655.
2. Balestrieri M, Cigliano L, De Simone ML, Dale B and Abrescia P. Haptoglobin inhibits Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in human ovarian follicular fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 2001;59:186-191.
3. Beisambaeva RU, Mursagalieva AT, Dzhumalieva LM, Shaikenov TE and Mevkh AT. Identification of haptoglobin as an endogenous inhibitor of prostaglandin H synthase in the cytosol fraction of primary cells from sheep vesicular glands. *FEBS Lett.* 1990;269:125-127.
4. Benoit P, Emmanuel F, Caillaud JM, Bassinet L, Castro G, Gallix P, Fruchart JC, Branellec D, Denèfle P and Duverger N. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999;99:105-110.
5. Benson HA. Elastic liposomes for topical and transdermal drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2009;6:217-226.
6. Bielicki JK, Forte TM and McCall M.R. Gas-phase cigarette smoke inhibits plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochim. Biophys. Acta* 1995;1258:35-40.(a)
7. Bielicki JK, McCall MR, Vanderberg JJM, Kuypers FA and Forte TM. Copper and gas-phase cigarette inhibit plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity by different mechanisms. *J. Lipid Res.* 1995;36: 322-331.(b)
8. Bielicki JK, Forte TM and McCall MR. Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 1996;37:1012-1021.
9. Bielicki JK and Forte TM. Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 1999;40:948-954.(a)
10. Bielicki JK, McCall MR and Forte TM. Apolipoprotein A-I promotes cholesterol release and apolipoprotein E recruitment from THP-1 macrophage-like foam cells. *J. Lipid Res.* 1999;40:85-92.(b)

11. Black A and Dixon GH. Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobins. *Nature* 1968;218:736-741.
12. Bowman BH and Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv. Hum. Genet.* 1982;12:189-261.
13. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Journal of Lipid Research* 1970; 11: 583-599.
14. Cybulsky MI and Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Scienze* 1991;251:788-791.
15. Chen CH, Albers JJ. Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 1982;23:680-691.
16. Chen CH and Albers JJ. Interspecies activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein A-I isolated from the plasma of humans, horses, sheep, goats and rabbits. *Biochem. Biophys. Acta* 1983; 753: 40-46.
17. Chen CH, Albers JJ. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Oct 2;836(3):279-85.
18. Chen CH and Loo G. Effects of peroxy radicals on Lecithin/Cholesterol Acyltransferase activity in human plasma. *Lipids* 1995;30:627-631.
19. Cid MC, Grant DS, Hoffman GS, Auerbach R, Fauci AS and Kleinman HK. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J. Clin. Invest.* 1993;91:977-985.
20. Cigliano L, Balestrieri M, Spagnuolo MS, Dale B and Abrescia P. Lecithin-cholesterol acyltransferase activity during maturation of human preovulatory follicles with different concentrations of ascorbate, α -tocopherol and nitrotyrosine. *Reprod. Fertil. Dev.* 2002;14:15-21.
21. Cigliano L, Spagnuolo MS, Cuomo G, Valentini G, Niglio A, Abrescia P. Apolipoprotein A-I-dependent cholesterol esterification in patients with rheumatoid arthritis. *Life Sciences* 2005;77:108-120.
22. Cigliano L, Spagnuolo MS, Dale B, Balestrieri M, Abrescia P. Estradiol esterification in the human preovulatory follicle. *Steroids* 2001; 66: 889-896.

23. Davit-Sproul A, Therond P, Leroy A, Palmade-Rieunier F, Rousset C, Moatti N, et al. Inhibition of lecithin cholesterol acyltransferase by phosphatidylcholine hydroperoxides. *FEBS Lett* 1999;447:106-110.
24. El Ghmati SM, Van Hoeyveld EM, Van Strijp JG, Ceuppens JL and Stevens EA. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J. Immunol.* 1996;156:2542-2552.
25. Fielding CJ. Mechanisms of action of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. *Meth. Enz.* 1986;129:783-790.
26. Fielding CJ., Fielding P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid. Res.* 1995;36:211-228.
27. Fielding PE, Nagao K, Hakamata H, Chimini G and Fielding CJ. A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein AI. *Biochemistry* 2000;39:14113-14120.
28. Forte TM, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J and McCall MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein specific HDL that differ in size, phospholipids composition, and reactivity with LCAT. *J. Lipid Res.* 1995; 36: 148-157.
29. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 2000;106:453-458.
30. Glomset JA, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 1966; 7: 638-648.
31. Gordon DJ and Rifkind BM. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *New Engl. J. Med.* 1989 321;1311-1316.
32. Gorog P. Neutrophil-oxidized low density lipoprotein: generation in and clearance from the plasma. *Int. J. Exp. Pathol.* 1992;73:485-490.
33. Graham A, Vinogradov DV and Owen JS. Effects of peroxynitrite on plasma components of the reverse cholesterol transport. *FEBS Lett.* 1998;431:327-332.
34. Greenow K, Pearce N, Ramji DP. The key of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* 2005;83:329-342.

35. Gupta PP, Tandon HD, Ramalingaswami V. Cirrhosis of the liver in rabbits induced by a high cholesterol diet--an experimental model. *Indian J. Med. Res.* 1976;64:1516-26.
36. Hanasaki K, Powell LD, Varki A. Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. *J. Biol. Chem.* 1995;270:7543-7550.
37. Hara H and Yokoyama S. Role of apolipoproteins in cholesterol efflux from macrophages to lipid microemulsion: proposal of a putative model for the pre-beta high-density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1992;31:2040-2046.
38. Hoeg JM, Vaisman BL, Demosky SJ, Meyn SM, Talley GD, Hoyt RF, Feldman S, Berard AM, Sakai N, Wood D, Brousseau ME. et al. Lecithin-cholesterol acyltransferase overexpression generates hyperalpha-lipoproteinemia and a non atherogenic lipoprotein pattern in transgenic rabbits. *J. Biol. Chem.* 1996;271:4396-4402.(a)
39. Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman S, Haudenschild CC et al. Overexpression of Lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *PNAS* 1996; 93:11448-11453.(b)
40. Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH and Phillips MC. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1991;1085:273-298.
41. Jue DM, Shim BS and Kang YS. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol. Cell. Biochem.* 1983;51:141-147.
42. Kellner-Weibel G., Yancey P.G., Jerome W.G., Walser T., Mason R.P., Small D.M., et al. Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:423-431.
43. Kunitake ST, Carilli CT, Lau TH, Protter AA, Naya-Vigne J, Kane JP. Identification of proteins associated with apolipoproteins A-I-containing lipoproteins purified by selected-affinity immunosorption. *Biochemistry* 1994;33:1988-1993.

44. Kurosky A, Hay RE, Kim HH, Touchstone B, Rasco MA and Bowman BH. Characterization of the cyanogens bromide fragments of the β chain of human haptoglobin. *Biochemistry* 1980;15:5326-5336.
45. Langlois MR and Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin. Chem.* 1996;42:1589-1600.
46. Libby P, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143.
47. Lin YC, Duan H, Mazzone T. Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 1618:1626.
48. Louagie H, Delanghe J, De Buyzere M, Hauser P and Leroux Roels G. Haptoglobin polymorphism and the immune response after hepatitis B vaccination. *Vaccine* 1993;11:1188-1190.
49. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apo E and reverse cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1226-1229.
50. Matsuura F, Wang N, Chen W, Jiang X-C and Tall AR. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an Apo E and ABCG1-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 2006 116:1435-1442.
51. McCall M.R., van der Berg J.J., Kuypers F.A. Tribble D.L., Krauss R.M., Knoff L.J. et al. Modification of LCAT activity and HDL structure. New links between cigarette smoke and coronary heart disease risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994;15:1599-1606.
52. McCall MR, Tang JY, Bielicki JK and Forte TM. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase and modification of HDL apolipoproteins by aldehydes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1599-1606.
53. Miller GJ and Miller NE. Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet.* 1975;1:16-19.
54. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975;250:4007-4021.
55. Oh SK, Very DL, Walker J, Raam S and Ju ST. An analogy between fetal haptoglobin and a potent immunosuppressant in cancer. *Cancer Res.* 1987;47:5120-5126.

56. Oram J.F., Mendez A. J., Slotte J. P. and Johnson T. F. High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol loaded fibroblasts. *Atheroscler. Thromb.* 1991;11:403-414.
57. Oram JF and Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* 1996;37:2473-2491.
58. Oram J.F., Lavn M.R., Garvin M.R. and Wade D.P. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 2000;275:34508-34511.
59. Paoletti R, Bellosta S and Bernini F. Pharmacological control of phagocyte function: inhibition of cholesterol accumulation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1997;832:322-329.
60. Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV and Parke DV. Molecular pathology of drugs-disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases. *Inflammopharmacolgy* 1991;1:3-36.
61. Parke AL, Parke DV and Avery Jones F. Diet and nutrition in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory disease. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1996;20:1-26.
62. Patsch W and Gotto MA. Pathophysiology of apolipoproteins. *Plasma lipoproteins* 1996;263:1-32.
63. Peters-Libeu CA, Newhouse Y, Hatters DM, Weisgraber KH. Model of biologically active apolipoprotein E bound to dipalmitoylphosphatidylcholine. *J.Biol.Chem.* 2006 260:8831-8837.
64. Porta A, Cassano E, Balestrieri M, Bianco M, Picone R, De Stefano C, Abrescia P. Haptoglobin transport into human ovarian follicles and its binding to apolipoprotein A-I. *Zygote* 1999, 7: 67-77.
65. Quaye IK, Brandful J, Ekuban FA, Gyan B and Ankrah NA. Haptoglobin polymorphism in human immunodeficiency virus infection: Hp0 phenotype limits depletion of CD4 counts in HIV-1-seropositive individuals. *J. Infect. Dis.* 2000;181:1483-1485.
66. Rademacher B.E., Steele W.J. A general method for the isolation of haptoglobin 1-1, 2-1 and 2-2 from human plasma. *Anal. Biochem.* 1987;160:119-126.

67. Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J, Clerc M, Dumon MF, Fairwell T, Zech L, et al. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II and HDL containing apo A-E in classic LCAT deficiency and fish-eye disease. *J. Clin. Invest.* 1994;93:321-330.
68. Rees D, Sloane T, Jessup W, Dean RT and Kritharides L. Apo A-I stimulates secretion of Apolipoprotein E by foam cell macrophages. *J. Biol. Chem.* 1999;274:27925-27933.
69. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* 1999;340:115-126.
70. Rothbalt GH, Mahlberg FH, Johnson VJ and Phillips MC. Apolipoproteins, membrane cholesterol domain, and the regulation of cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 1992; 33:1091-1097.
71. Rubin EM, Krauss RM, Splaner EA, Verstuyft JC and Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by huma apolipoprotein A-I. *Nature* 1991;353:265-267.
72. Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *A. J. Clin. Path.* 2004;121:S97-S104.
73. Santamarina-Fojo S, Lambert S, Hoeg JM, Brewer HB. Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Cur. Opin. Lipidol.* 2000;11:267-275.
74. Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco V, Carlucci A, Pedone P, Abrescia P. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry* 2007;46:11158-11168.
75. Salvatore A, Cigliano L, Carlucci A, Bucci EM, Abrescia P. Haptoglobin binds apolipoprotein E and influences cholesterol esterification in the cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 2009;110:255-263.
76. Schagger H and Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987;166:368-379.
77. Shireman R. Formation, metabolism and physiologic effects of oxidatively modified low-density lipoproteins: overview. *J. Nutrition* 1996;126:1049S-10452S.

78. Schroeder F, Jefferson JR, Kier AB, Knittel J, Scallen TJ, Wood WG, et al. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetics pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991;196:235-252.
79. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YW and Anantharamaiah GM. The amphipatic helix in exchangeable apolipoproteins : a review of secondary structure and function. *J. Lipid. Res.* 1992;33:141-166.
80. Sorci-Thomas MG, Curtiss L, Parks JS, Thomas MJ and Kearns MW. Alteration in apolipoprotein A-1 22-mer repeat order results in a decrease lecithin:cholesterol acyltransferase reactivity. *J. Biol. Chem.* 1997;272:7278-7284.
81. Sorci-Thomas M.G., Thomas M.J., The effect of altered Apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2002;12:121-128.
82. Spagnuolo MS, Cigliano L, D'Andrea LD, Pedone C, Abrescia P. Assignment of the binding site for hptoglobin on apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 2005;280:1193-1198.
83. Sparks DL, Phillips MC and Lund-Kats S. The conformations of apolipoproteine A1 in discoidal and spherical recombinant high density lipoproteine particles 13C nmr studies of lysine ionization behaviour. *J. Biol. Chem.* 1992;267:25830-25838.
84. Sparks DL, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Phillips MC. Effect of the cholesterol content of reconstituted LpA-I on lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *The journal of Biological Chemistry* 1995;270:5151-5157.
85. Steinberg D. Oxidative modifications of LDL and atherogenesis. In: Gotto AM, Jr., Lenfant C, Paoletti R, Catapano AL, and Jackson AS, editors. *Multiple risk factors in cardiovascular disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998;141-147.
86. Szedlaczek SE, Wasowicz E, Hulea SA, Nishida HI, Kummerow FA and Nishida T. Esterification of oxysterols by human plasma Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1995;270:11812-11819.
87. Wang N, Silver DL, Costet P and Tall AR. Specific binding of ApoA1, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing Abc1. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:33053-33058.

88. Wilson HM, Griffin BA, Watt C, Skinner ER. The isolation and characterization of high-density-lipoprotein subfractions containing apolipoprotein E from human plasma. *Biochem. J.* 1992; 284:477-481.
89. Yeagle PL. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* 1991;73:1303-1310.
90. Zorich N, Jonas A, Pownall HJ. Activation of lecithin cholesterol Acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids. *J. Biol. Chem.* 1985;260:8831-8837.

ABBREVIAZIONI

Ox-LDL = LDL ossidate

Apo A-I = apolipoproteina AI

Apo E = apolipoproteina E

ABCA1=ATP-binding cassette A1

ACAT = AcilCoA-colesterolo aciltrasferasi

BSA = albumina bovina

C = colesterolo libero

CE = estere del colesterolo

ELISA = saggio enzimatico immunologico

Hb = emoglobina

HDL = lipoproteine ad alte densità

HMG-CoA reduttasi = 3-idrossi-3-metilglutaril-Coenzima A reduttasi

Hpt = aptoglobina

ICAM-1 = molecola-1 di adesione intercellulare

IDL = lipoproteine a densità intermedia

IL-1, IL-6 = interleuchine 1 e 6

LCAT = lecitina-colesterolo acil-transferasi

LDL = lipoproteine a bassa densità

LTP I , LTP II = proteina di trasferimento dei lipidi (I , II)

PDGF = fattore di crescita derivato dalle piastrine

PKC = protein chinasi C

PLTP =proteina di trasferimento dei fosfolipidi

ROS = specie reattive dell'ossigeno

RTC = trasporto inverso del colesterolo

SR = recettore spazzino

TBS = Tris Buffer Salino (cioè con NaCl)

TLC = thin layer chromatography (cromatografia su strato sottile)

TNF = fattore di necrosi tumorale

VCAM-1 = ICAM specifica del tessuto vascolare

VLDL = lipoproteine a densità molto bassa

