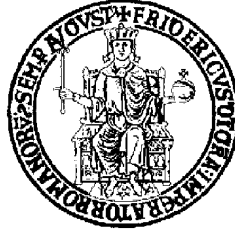


# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



## **DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA XXVI CICLO**

### **Attività dell'enzima Lecitina-Colesterolo Aciltrasferasi nel Sistema Nervoso Centrale: Esterificazione del cerebrosterolo e diagnosi di neurodegenerazione**

Tutore:

Prof. Paolo Abrescia

Dottoranda

Valeria La Marca

Coordinatore:

Prof. Ezio Ricca

# INDICE

## 1 INTRODUZIONE

1. Il colesterolo .....	5
1.1 Struttura e funzioni biologiche .....	5
1.2 Trasporto del colesterolo in circolo e trasporto inverso del colesterolo (RCT) .....	6
1.3 Metabolismo del colesterolo nel cervello.....	8
1.4 Colesterolo e neurodegenerazione.....	9
1.5 Principali proteine coinvolte nel metabolismo cerebrale del colesterolo .....	10
1.5.1 Lecitina Colesterolo Acil-transferasi.....	10
1.5.2 Apolipoproteina-I (ApoA-I) .....	11
1.5.3 Apolipoproteina E (ApoE) .....	12
1.5.4 Aptoglobina (Hpt) .....	13
2. Gli ossisteroli.....	14
2.1 Sintesi e proprietà dei principali ossisteroli.....	14
2.2 Gli ossisteroli nel metabolismo del colesterolo.....	15
2.3 24(S)OH-C (cerebrosterolo).....	16
2.4 24(S)OH-C e patogenesi della malattia di Alzheimer (AD) .....	17
2.5 Rilevanza dell'esterificazione del colesterolo e degli ossisteroli .....	19

<b>2 SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>21</b>
---------------------------------	-----------

<b>3 MATERIALI.....</b>	<b>23</b>
-------------------------	-----------

## 3 METODI

3.1 Esterificazione di 24(S)OH-C in vitro: tre diversi approcci sperimentali .....	25
3.1.1 Analisi HPLC di un prodotto di esterificazione fluorescente.....	25
3.1.2 Analisi HPLC dei prodotti di idrolisi alcalina degli esteri di 24(S)OH-C ....	26
3.1.3 Esterificazione di 24(S)OH-C marcato con trizio .....	27
3.2 Cinetica di esterificazione e confronto tra ApoA-I e ApoE nella stimolazione di LCAT .....	28
3.3 Saggio di esterificazione del colesterolo in presenza di 24(S)OH-C .....	29
3.4 Inibizione dell'attività di LCAT in presenza di Hpt.....	30

3.5 Inibizione dell'attività di LCAT in condizioni di stress ossidativo.....	30
3.6 Spettrometria di Massa .....	31
3.7 Esterificazione di 24(S)OH-C ex vivo .....	32
3.7.1 Analisi dell'attività di LCAT nel CSF.....	32
3.7.2 Analisi dell'attività di LCAT su campioni di plasma e CSF di individui sani e di pazienti con malattia di Alzheimer (AD) o Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) .....	32
3.8 Colture cellulari .....	34
3.8.1 Differenziamento della linea cellulare SH-SY5Y .....	34
3.8.2 Valutazione dell'effetto tossico di 24(S)OH-C su cellule SH-SY5Y differenziate .....	35
3.8.3 Effetto dell'esterificazione di 24(S)OH-C sulla vitalità di cellule SH-SY5Y differenziate.....	36
3.8.4 Analisi dell'incorporazione di 24(S)OH-C, in forma libera o esterificata, da parte di cellule SH-SY5Y differenziate .....	37
3.8.5 Analisi dell'incorporazione degli esteri di 24(S)OH-C, isolati mediante gel filtrazione, da parte di cellule SH-SY5Y differenziate.....	38
3.9 Procedura ELISA per la titolazione di ApoE, ApoA-I e Hpt in campioni di plasma e CSF .....	38
3.10 Elettroforesi ed immunoblotting .....	40
3.10.1 Titolazione di LCAT nel CSF di individui sani e di pazienti con AD o SLA .....	40
3.10.2 Analisi dell'aplotipo di ApoE nei plasmi di individui controllo e di pazienti AD o SLA .....	41

## **4 RISULTATI E INTERPRETAZIONE DEI DATI**

4.1 Esterificazione di 24(S)OH-C in vitro con acido esanoico fluorescente.....	43
4.2 Analisi di massa del prodotto di esterificazione fluorescente di 24(S)OH-C.....	46
4.3 Esterificazione di 24(S)OH-C da parte di LCAT: confronto tra la stimolazione enzimatica da parte di ApoA-I e quella da parte di ApoE.....	48
4.4 Saggio di esterificazione del colesterolo in presenza di 24(S)OH-C .....	50
4.5 Inibizione dell'attività di LCAT in presenza di Hpt.....	52
4.6 Influenza dello stress ossidativo sull'attività di LCAT .....	53
4.7 Analisi ex vivo: esterificazione di 24(S)OH-C nel CSF .....	54

4.8 Valutazione dell'effetto tossico di 24(S)OH-C su cellule SH-SY5Y .....	55
4.9 Analisi dell'incorporazione di 24(S)OH-C e di 24(S)OH-CE in cellule SH-SY5Y .	58
4.10 Analisi dell'incorporazione degli esteri di 24(S)OH-C, inglobati in proteoliposomi isolati per gel filtrazione, in cellule SH-SY5Y.....	59
4.11 Analisi dell'attività di LCAT nei campioni di CSF e plasma di individui controllo e pazienti affetti da malattie neurodegenerative.....	61
4.12 Analisi delle concentrazioni di Hpt, ApoA-I e ApoE in campioni da pazienti AD, SLA e da soggetti sani .....	66
4.13 Analisi del fenotipo di ApoE nei campioni di plasma da pazienti AD e SLA e da soggetti sani .....	67
4.14 Analisi della massa di LCAT nei CSF da pazienti AD, SLA e da controlli.....	67
<b>5 DISCUSSIONE</b> .....	<b>70</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>81</b>
Abbreviazioni .....	93

## INTRODUZIONE

### 1. Il colesterolo

#### *1.1 Struttura e funzioni biologiche*

Il colesterolo (C), componente fondamentale nella struttura di tutte le membrane biologiche, svolge ruoli importanti nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, regolando la comunicazione fra cellule e ambiente esterno e, in particolare, modulando struttura e funzione delle proteine integrali di membrana. Come tutti gli steroli, il colesterolo è caratterizzato da un nucleo steroideo, quasi planare e relativamente rigido, che è costituito da quattro anelli con legami carbonio-carbonio condivisi (tre anelli a sei atomi di carbonio e uno a cinque atomi). C è una molecola di natura anfipatica, con una testa polare (il gruppo ossidrilico sull'atomo C-3) e un corpo idrocarburico non polare (il nucleo steroideo, con due gruppi metilici, e la catena laterale alifatica sull'atomo C-17). Per via della sua struttura, C si inserisce nel doppio strato lipidico con la testa polare in prossimità delle teste polari dei fosfolipidi, e con il corpo apolare intercalato fra le code apolari dei fosfolipidi (Fig. 1), assicurando al doppio strato lipidico la resistenza meccanica e la fluidità necessarie per le normali funzioni di membrana. C è, inoltre, il precursore di tutti gli ormoni steroidei, dei sali biliari e della vitamina D.

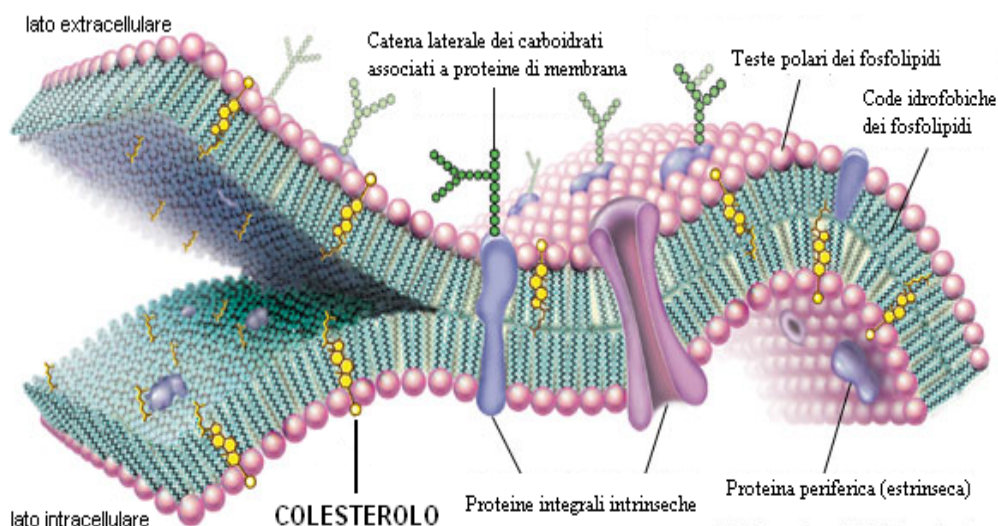


Figura 1- Colesterolo e membrana plasmatica

### 1.2 Trasporto del colesterolo in circolo e trasporto inverso del colesterolo (RCT)

Tutte le cellule dell'organismo sono capaci di sintetizzare C, ma la maggior parte di esso viene prodotta nei perossisomi delle cellule epatiche, che lo trasferiscono al sangue per il trasporto ai tessuti periferici, sotto le due forme possibili: acidi biliari o esteri di C (CE). Gli acidi biliari e i loro sali sono relativamente idrofilici, mentre CE o C sono, rispettivamente, insolubili o solubili solo a bassissime concentrazioni in acqua: il loro trasporto in circolo avviene in associazione alle *lipoproteine*. Grazie alla loro particolare struttura micellare, le lipoproteine possono trasportare molecole apolari come CE ed acilgliceroli in una soluzione acquosa come il plasma. Presentano, infatti, in superficie, apolipoproteine, C libero e fosfolipidi, che sono molecole anfipatiche, e in una zona centrale, detta *core*, i lipidi apolari (CE e trigliceridi). Esistono vari tipi di lipoproteine, differenziate soprattutto per la loro composizione lipidica e relativa densità; esse hanno una densità tanto minore quanto maggiore è la percentuale di lipidi trasportata. Le HDL sono le più piccole lipoproteine plasmatiche (diametro 5-17 nm) e contengono CE, C e fosfolipidi, scarso contenuto in trigliceridi ed elevato contenuto proteico. Sono caratterizzate da una elevata densità (>1,063 g/ml) e sono fondamentali per un processo definito *trasporto*

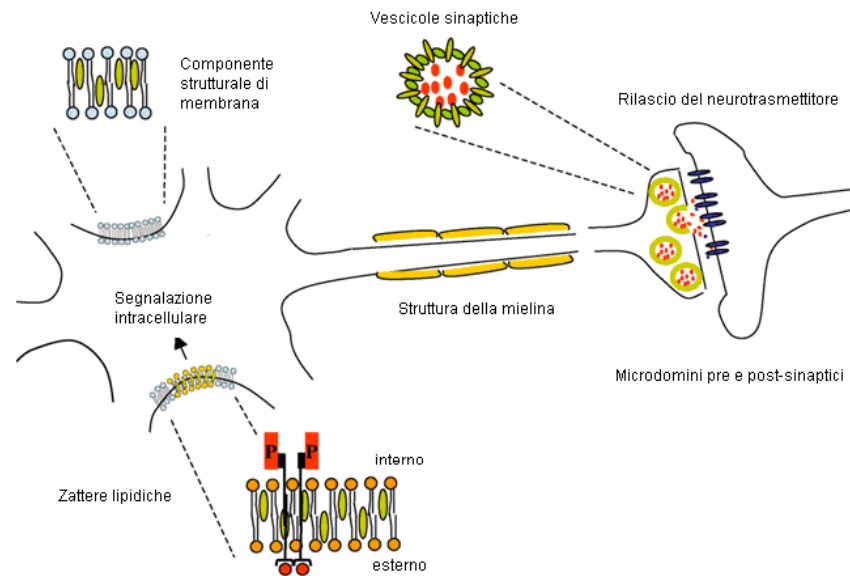
*inverso del colesterolo* (RCT). Le cellule periferiche, come tutte le cellule non intestinali o epatiche, non sono in grado di degradare C in eccesso; perciò, per garantire l'omeostasi cellulare di C, è essenziale la presenza di un meccanismo dedicato alla rimozione di C (che si accumula essenzialmente per il trasporto dal fegato, mediato da lipoproteine a bassa densità, dette LDL) dalle cellule. RCT è un processo con cui C viene rimosso dai tessuti periferici, attraverso la sua incorporazione nelle HDL ed il successivo trasporto al fegato per l'escrezione biliare. C accumulato nella membrana plasmatica viene, infatti, rimosso ad opera di HDL e dell'enzima LCAT (E.C. 2.3.1.43). In particolare, LCAT, attivato dall'interazione con un'apolipoproteina presente sulle HDL (ApoA-I o ApoE), trasferisce un gruppo acilico da C-2 del glicerolo della fosfatidilcolina (presente sulle HDL) a C-3-OH di C, formando CE (che vengono internalizzati nel *core* delle HDL) e lisofosfatidilcolina (Chen and Albers, 1982). La lipoproteina, oltre a promuovere la formazione di CE, può anche permettere l'associazione di C, che espone il gruppo ossidrilico verso l'ambiente acquoso. Le HDL veicolano, attraverso il circolo, C e CE al tessuto epatico o ai tessuti steroidogenici, i quali possono o eliminare C attraverso la bile (fegato) o usarlo come precursore degli ormoni steroidei (tessuti steroidogenici), oltre che per la formazione delle membrane. LCAT utilizza ApoA-I come principale stimolatore per esterificare C e permetterne l'inclusione (come CE) nel *core* lipidico delle HDL. Non di minore importanza è la presenza di ApoE sulle HDL, che si è scoperto avere lo stesso ruolo di ApoA-I nella funzione stimolatoria di LCAT (Zorich et al., 1985). Un processo simile a RCT si verifica anche nel compartimento anatomico cerebrale, in cui lipoproteine simili alle HDL sono responsabili dell'allontanamento dell'eccesso di C, come CE prodotto da una forma di LCAT cerebrale, separata dalla forma di LCAT plasmatico mediante la barriera emato-encefalica (BBB).

### ***1.3 Metabolismo del colesterolo nel cervello***

Il cervello è l'organo più ricco di C: contiene, infatti, circa 25% di C totale, 10 volte in più rispetto a qualsiasi altro organo (Björkhem and Meaney, 2004; Dietschy and Turley, 2004). Circa 70% di C cerebrale è localizzato nella mielina (Snipes and Suter, 1997), dove si comporta come isolante elettrico, ottimizzando la conduzione degli impulsi nervosi lungo gli assoni. Il restante 30% si trova sulle membrane di neuroni e cellule gliali (in particolare astrociti e microglia). C contribuisce alla maturazione del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e prende parte a processi fondamentali, come trasduzione del segnale, rilascio di neurotrasmettitori, sinaptogenesi e traffico vescicolare (Dietschy and Turley, 2004). Alcune funzioni predominanti di C, nei neuroni, sono indicate in Fig. 2. La BBB limita fortemente il trasporto di C (mediato da lipoproteine) dal sangue al tessuto cerebrale. Il cervello deve, quindi, produrre da solo C di cui necessita, e la BBB contribuisce a mantenere costanti i livelli di questo sterolo nel cervello. Infatti, la BBB sembra impedire lo scambio tra *pool* cerebrale ed extracerebrale di C (Leoni e Caccia, 2011), benché sia stato suggerito che circo 40% di C cerebrale possa essere allontanato al circolo (Lund et al., 2003). I neuroni sintetizzano C, prevalentemente durante l'embriogenesi e i primi anni di vita, mentre, nel cervello dell'adulto, la sintesi risulta drasticamente ridotta (Leoni e Caccia, 2011). I neuroni dell'adulto incorporano C, trasportato essenzialmente da lipoproteine contenenti ApoE, secrete prevalentemente dagli astrociti (Pfrieger, 2003). Questo permette ai neuroni di focalizzare il loro metabolismo sulla funzione di generare potenziali di azione, evitando un processo energeticamente costoso come la sintesi di C. Tuttavia, la specializzazione funzionale e strutturale delle varie aree del cervello suggerisce che il metabolismo di C non sia uniforme. Così, alcuni neuroni potrebbero incorporare tutto C di cui necessitano, mentre altri sarebbero completamente autonomi dall'apporto



esogeno di C. Quest'ipotesi è suffragata da studi che rivelano differenze regionali e cellulo-specifiche nel contenuto di C (Zhang et al., 1996).



*Figura 2- Principali funzioni del colesterolo nel cervello*

#### ***1.4 Colesterolo e neurodegenerazione***

L'eccesso di C porta ad alterazioni nelle funzioni di membrana, con conseguente morte cellulare. Quando in eccesso, C forma cristalli intracellulari e riduce la fluidità di membrana e la mobilità laterale delle proteine, modificando alcune loro funzioni nella trasduzione del segnale o nella catalisi, e stimolando percorsi apoptotici (Kellner-Weibel et al., 1998, Simons and Ikonen, 2000; Tabas, 2002). Studi epidemiologici e molecolari evidenziano, inoltre, un legame fra C e malattie neurodegenerative: alterazioni nella distribuzione e nel metabolismo di C nel SNC sono strettamente coinvolte nella patogenesi delle malattie di Alzheimer (AD) e Parkinson (Kivipelto and Solomon 2006; Hu et al., 2008; Canepa et al., 2011; Vance, 2012) e alcuni studi clinici hanno recentemente dimostrato che l'inibizione della sintesi di C cerebrale, mediante trattamento con statine idrofobiche (che attraversano la BBB), comporta effetti benefici su questo tipo di patologie (Bjorkhem and Meaney, 2004). La distribuzione e i livelli di C nelle membrane cellulari

regolano non solo il funzionamento neuronale, ma anche il metabolismo della proteina precursore dell'amiloide (APP) (Simons et al., 1998; Puglielli et al., 2003). Infatti, quando si accumula nella membrana plasmatica neuronale, C stimola il taglio, a livello del dominio trans-membrana carbossiterminale, di APP da parte dell'enzima  $\beta$ -secretasi (BACE), con conseguente rilascio di peptidi di  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) che, se accumulati, tendono ad aggregarsi (soprattutto con elevate concentrazioni di ioni di rame e zinco) e diventano neurotossici e proinfiammatori (Simons et al., 1998). Questi peptidi sono in grado di formare fibrille che, polimerizzando, formano aggregati insolubili (Wood et al., 1996) o placche amiloidi, caratteristiche delle malattie neurodegenerative (Sabatè et al., 2005). La deposizione e l'aggregazione di  $A\beta$  comporta perdita diffusa di neuroni e sinapsi. La degenerazione sinaptica e neuronale, a sua volta, porta alla distruzione della mielina, con ulteriore rilascio di C nello spazio extracellulare (Brown et al., 2009).

## ***1.5 Principali proteine coinvolte nel metabolismo cerebrale del colesterolo***

### ***1.5.1 Lecitina-colesterolo aciltrasferasi.***

L'enzima LCAT è secreto dal fegato nel plasma di tutte le specie di mammiferi ed ha un peso molecolare di circa 66 kDa (Fielding, 1986). Questo enzima esterifica C, rimosso dalla superficie delle cellule periferiche, con un acido grasso, rimosso dalla posizione C-2 del glicerolo della fosfatidilcolina presente sulle HDL. Questa attività non è limitata solo all'esterificazione di C cellulare, ma anche a quella di C adsorbito sulla superficie delle HDL, necessaria per il passaggio di C (in forma di CE) dalle HDL alle LDL. LCAT è principalmente stimolato da ApoA-I (Glomset et al., 1966), ma anche da altre apolipoproteine, come Apo E (come già accennato), presenti sulla superficie delle lipoproteine, incluse le HDL (Wilson et al., 1992; Fragoso and Skinner, 1996). LCAT è

quindi dotato di due distinte attività catalitiche: un'attività *fosfolipasica* (dovuta ad un dominio contenente un residuo di Serina), che stacca l'acido grasso dalla fosfatidilcolina, e un'attività *transacetilasica* (dovuta ad un dominio con struttura del sito catalitico stabilizzata da un residuo di Cisteina vicinale), che esterifica C con l'acido grasso. LCAT è presente anche nel SNC, in quanto prodotto dagli astrociti (Hirsch-Reinshagen et al., 2009). In particolare, nel fluido cerebrospinale la concentrazione dell'enzima è circa il 2% di quella plasmatica, pari a 6 µg/mL (Albers et al., 1992; Demeester et al., 2000).

LCAT è bersaglio di stress ossidativo: esso, infatti, può essere inibito da agenti ossidanti, come è stato dimostrato dal trattamento con ioni rame (Bielicki et al., 1995 (a)), o da incubazione con perossinitrito (Graham et al., 1998), idroperossidi (Bielicki et al., 1999), radicali perossidici (Chen et al., 1995) o per ossidazione dei residui di Cisteina vicini al sito attivo (Bielicki et al., 1995 (b); Wang et al., 2000). Le condizioni redox del plasma influenzano, quindi, RCT in maniera significativa e lo stress ossidativo nel SNC potrebbe influenzare la formazione di CE nel fluido interstiziale cerebrale.

### ***1.5.2 Apolipoproteina A-I (ApoA-I)***

ApoA-I è il principale costituente proteico delle HDL e il miglior cofattore di LCAT. E' una proteina costituita da 243 amminoacidi e contiene 10  $\alpha$ -eliche anfipatiche disposte in tandem, che costituiscono l'80% della massa totale della proteina. I domini ad  $\alpha$ -elica sono responsabili sia dell'interazione dell'apolipoproteina con la componente lipidica della particella, sia dell'attivazione di LCAT (Sorci-Thomas et al., 1997). Le  $\alpha$ -eliche sono unite da corte e flessibili ansepeptidiche, contenenti un residuo di prolina. Sembra ormai accertato che ApoA-I non soltanto attivi LCAT, ma organizzati la costituzione stessa delle HDL e che stimoli l'efflusso di C dalla cellula. La forma libera di ApoA-I può, infatti,

funzionare da molecola segnale, in quanto, interagendo con la membrana plasmatica, avvia la mobilitazione di C dalle membrane cellulari e da CE intracellulare (immagazzinato in vescicole di deposito) verso la membrana plasmatica, in base a segnali mediati dalla proteina kinasi C (Oram et al., 1991; Mendez et al., 1991). Responsabili dell'efflusso di C sono alcuni trasportatori del tipo *ATP-binding cassette* (ABC), che si comportano come recettori di ApoA-I sulla superficie di cellule periferiche. L'efficienza nella stimolazione di LCAT può essere drasticamente inficiata dalla presenza di alti livelli di Aptoglobina (Hpt), una proteina della fase acuta dell'infiammazione, la quale, legando ApoA-I, impedisce l'attivazione di LCAT e la conseguente esterificazione di C (Balestrieri et al., 2001).

### ***1.5.3 Apolipoproteina E (ApoE)***

ApoE è una proteina dalle molteplici funzioni, che ha un peso molecolare di 34 kDa. Essa rappresenta il principale trasportatore lipidico nel SNC: non solo rifornisce i neuroni con lipidi e C (Bu, 2009; Bjorkhem et al., 2010), ma contribuisce anche all'omeostasi lipidica nel cervello, grazie ad un estensivo riciclo di C intracerebrale (Bjorkhem et al., 2009). ApoE è prodotta principalmente dal fegato, ma 20-40% del totale deriva da fonti extraepatiche, come cervello, milza, polmoni, ovaie, reni, muscoli e macrofagi (Greenow et al., 2005). ApoE può esistere in tre diverse isoforme (E2, E3, E4) nell'uomo, dovute all'esistenza di tre alleli del gene *apoE*, che differiscono solo per gli amminoacidi presenti nelle posizioni 112 e 158. Questi aplotipi mostrano sia una differente capacità di legare i recettori delle LDL, sia una diversa efficienza nella stimolazione di LCAT (Rye et al., 2006). ApoE presenta un'efficienza nella stimolazione di LCAT pari a 40% di quella prodotta da Apo A-I (Chen and Albers, 1985). ApoE è coinvolta nell'assorbimento epatico di particelle lipoproteiche, nella stimolazione dell'efflusso di C (dai macrofagi attivati e dalle *foam cell*, nella lesione aterosclerotica) e nella regolazione della risposta immunitaria

e infiammatoria (Getz, 2009). Anche ApoE è strettamente coinvolta in RCT: per completare il trasporto di CE da HDL al fegato, CE sono trasferiti, dall'enzima *cholesteryl-ester transfer protein*, alle LDL (la cui principale componente proteica è rappresentata proprio da ApoE), che rilasciano poi il loro carico di lipidi al fegato o alle cellule periferiche, tramite un processo di endocitosi mediata da recettori.

#### ***1.5.4 Aptoglobina (Hpt)***

Hpt è una  $\alpha_2$ -sialoglicoproteina che, in condizioni fisiologiche, è presente nel plasma a concentrazioni che variano da 0,38 mg/mL a circa 2,27 mg/mL (Langlois et al. 1996). Essa è sintetizzata e secreta dal fegato sotto lo stimolo di varie citochine, tra cui IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Queste citochine sono prodotte da macrofagi o altre cellule (come, ad esempio, i fibroblasti di tessuti con alterazioni strutturali) soprattutto durante l'infiammazione: ciò rende conto dell'elevata concentrazione di Hpt nel plasma, durante la fase acuta dell'infiammazione, quando i suoi livelli possono aumentare anche di 10-20 volte. Hpt è una proteina oligomerica (Langlois et al. 1996) che svolge diversi ruoli, tra cui la stimolazione dell'angiogenesi (Cid et al. 1993) e l'inibizione della sintesi di prostaglandine (Jue et al. 1983; Beisambaeva et al. 1990). Inoltre, Hpt si lega al recettore CD22 dei linfociti B (Hanasaki et al. 1995) ed ha proprietà antinfiammatorie ed immunosoppressive (El Ghmati et al. 1996). Questa proteina è stata oggetto di studio per la sua capacità di legare ApoA-I (Spagnuolo et al, 2005), la proteina maggioritaria delle HDL circolanti, e di interferire, così, con la sua capacità di stimolare LCAT. Elevate concentrazioni di Hpt, come quelle che si trovano in circolo durante la fase acuta dell'infiammazione, proteggono da danni ossidativi ApoA-I (Salvatore et al, 2007) ma ne riducono l'effetto stimolatorio su LCAT (Balestrieri et al, 2001): interagendo con Hpt, infatti, la quota di ApoA-I disponibile al legame con LCAT risulta ridotta. In particolare, Hpt lega l'elica 6 di ApoA-I sulla sequenza amminoacidica compresa tra Leu<sup>141</sup> e Ala<sup>164</sup> (Spagnuolo et al. 2005), su cui è

presente anche il sito di attivazione per l'enzima LCAT.

## **2.Gli ossisteroli**

### ***2.1 Sintesi e proprietà dei principali ossisteroli***

L'omeostasi di C cellulare dipende essenzialmente da meccanismi trascrizionali e post-traduzionali che sono regolati dai livelli di C e dei suoi derivati ossidati, gli *ossisteroli* (Bielska et al., 2012). La rapida degradazione ed escrezione degli ossisteroli è facilitata dalle proprietà chimico-fisiche, che permettono loro di attraversare le membrane lipofile e di essere ridistribuiti nel corpo con una velocità molto più alta di C stesso (Iuliano et al., 2011). Gli ossisteroli si trovano, insieme a C, in quasi tutte le cellule, ma con una concentrazione da 10000 e 100000 volte più bassa rispetto a quest'ultimo. L'ossidazione di C a formare gli ossisteroli può essere spontanea, indotta da diversi composti, come radicali liberi, perossidi lipidici o ioni metallici divalenti (come il  $\text{Cu}^{2+}$ ) o, più spesso, mediata da un enzima appartenente alla superfamiglia del citocromo P-450, che catalizza l'aggiunta di un gruppo ossidrilico alla catena laterale della molecola. I prodotti di queste reazioni enzimatiche rappresentano la maggior parte degli ossisteroli presenti in circolo: ad esempio, l'enzima *7 $\alpha$ -idrossilasi* (CYP7A1) è responsabile della produzione di *7 $\alpha$ -idrossicolesterolo* (7 $\alpha$ OH-C), la *27-idrossilasi* (CYP27A1) catalizza la formazione di *27-idrossicolesterolo* (27(S)OH-C), la *24-idrossilasi* (CYP46A1) produce *24-idrossicolesterolo* (24(S)OH-C), il *citocromo 3A4* (CYP3A4) produce il *4 $\beta$ -idrossicolesterolo*, ed, infine, la *25-idrossilasi* (che non è un enzima della superfamiglia del citocromo P-450), è responsabile della formazione di *25-idrossicolesterolo* (25(S)OH-C) (Russell et al., 2000) (Fig. 3).

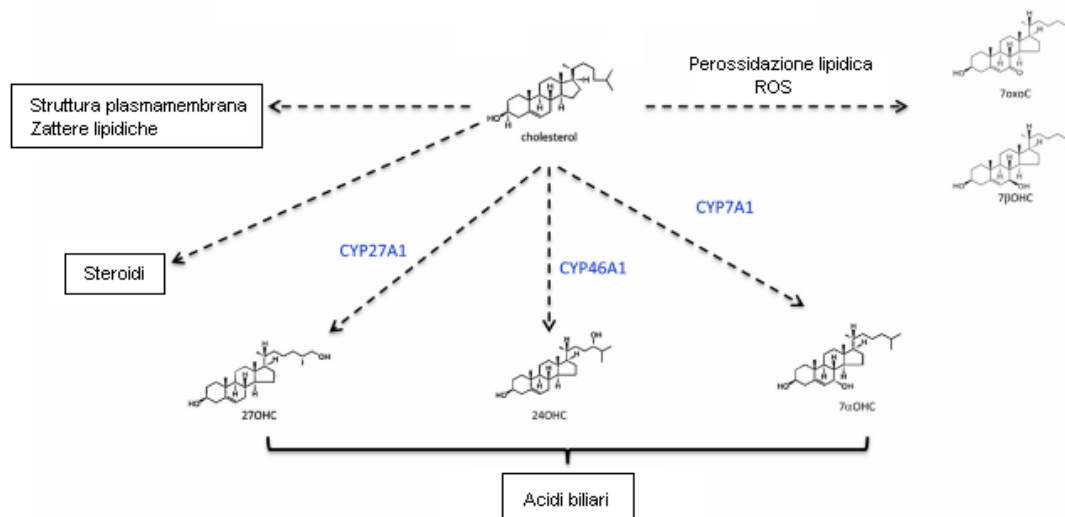


Figura 3- Schema del metabolismo di C e degli ossisteroli. C è coinvolto nella struttura, organizzazione e funzione delle membrane cellulari ed è il precursore degli ossisteroli, degli steroidi e degli acidi biliari. L'enzima 7 $\alpha$ -idrossilasi del fegato converte il C in 7 $\alpha$ -idrossicolesterolo (7 $\alpha$ OH-C). L'enzima 27-idrossilasi (CYP27A1), espresso in differenti tipi cellulari, converte C in 27(S)OH-C. L'enzima 24-idrossilasi (CYP46A1), specifico dei neuroni, è responsabile della formazione di 24(S)OH-C. L'auto-ossidazione di C, in presenza di perossidazione lipidica o di specie reattive dell'ossigeno (ROS), risulta nella formazione di vari ossisteroli: i principali sono 7 $\beta$ -idrossicolesterolo (7 $\beta$ OH-C) e 7-ossi-colesterolo (7OH-C).

## 2.2 Gli ossisteroli nel metabolismo del colesterolo

In molte cellule ed organi, C viene eliminato mediante conversione in ossisteroli, ovvero prodotti ossidati sulla catena laterale: nelle regioni extra-cerebrali, il gruppo ossidrilico viene introdotto in posizione C-27 o C-25, con formazione rispettivamente di 27-idrossicolesterolo (27OH-C) e 25-idrossicolesterolo (25OH-C). L'introduzione del gruppo ossidrilico sulla catena laterale di C modifica l'organizzazione delle catene aciliche dei fosfolipidi nelle membrane cellulari, in modo che il passaggio attraverso la membrana stessa verso accettori extra-cellulari (come le lipoproteine) risulti facilitato ed energeticamente meno dispendioso rispetto al trasferimento di C (Bjorkhem and Meaney, 2004). Gli ossisteroli sono strettamente coinvolti nel metabolismo di C, in quanto contribuiscono ad abbassare i livelli di C libero intracellulare (Gill et al., 2008). Essi inibiscono, infatti, la sintesi di C ed i percorsi di incorporazione (Radhakrishnan et al.,

2007), promuovendone l'efflusso ed i percorsi di eliminazione e stimolando l'esterificazione di C intracellulare (Lange et al., 1999; Du et al., 2004).

### **2.3 24(S)OH-C (*cerebrosterolo*)**

Nel cervello adulto la velocità di sintesi di C ed il suo turnover sono molto bassi. C in eccesso viene convertito in 24(S)OH-C dall'enzima CYP46A1, che catalizza l'aggiunta di un gruppo ossidrilico sulla catena laterale di C, in posizione C-24 (*Fig. 4*). 24(S)OH-C è detto anche *cerebrosterolo*, dal momento che l'enzima CYP46A1, responsabile della sua formazione, è espresso quasi esclusivamente dai neuroni metabolicamente attivi. Essendo più polare rispetto a C, 24(S)OH-C diffonde liberamente nel fluido interstiziale cerebrale e nel CSF e può essere trasportato col circolo al fegato, dove viene trasformato in acidi biliari. Considerando le forti limitazioni poste dalla presenza della BBB per il traffico di C, la conversione di C a 24(S)OH-C rappresenta uno dei principali meccanismi messi in atto dal cervello per ridurre la quantità di C, favorendone lo smaltimento. Ogni giorno, infatti, circa 6-8 mg di C cerebrale vengono rilasciati in circolo in forma di 24(S)OH-C (Lütjohann et al., 1996) e, di questi, circa 1-2 mg lasciano il cervello in associazione ad ApoE (Dietschy and Turley, 2004; Xie et al., 2003).

24(S)OH-C è un regolatore endogeno del recettore nucleare LXR (*Liver X receptor*). Nel cervello adulto la quasi totalità di C necessario ai neuroni proviene dalle lipoproteine contenenti ApoE, prodotte dalle cellule gliali (Pfrieger, 2003). In particolare, attraverso il recettore LXR, 24(S)OH-C regola il rifornimento neuronale di C, influenzando espressione, sintesi e secrezione di ApoE (Abildayeva et al., 2006), così come l'espressione, sulle membrane degli astrociti, dei trasportatori di steroli *ATP-binding cassette* di tipo A1 (ABC-A1), G1 (ABC-G1) and G4 (ABC-G4), coinvolti nel trasporto di C dalla glia alle lipoproteine contenenti ApoE (Repa et al., 2000; Withney et al., 2002; Wang et al., 2008). 24(S)OH-C, inoltre, inibisce *in vitro* la produzione di A $\beta$  (Prasanthi et



al., 2009; Bu, 2009) e si ipotizza che promuova il metabolismo di APP attraverso un percorso *non amiloidogenico*, ovvero quello che coinvolge l'enzima  $\alpha$ -secretasi (Prasanthi et al., 2009). Nonostante questi importanti ruoli "protettivi" nel SNC, 24(S)OH-C è implicato nella patogenesi delle malattie neurodegenerative (Poli et al., 2013). In particolare, le proprietà neurotossiche di 24(S)OH-C si evidenziano con l'incremento della generazione di radicali liberi, riduzione del potenziale di membrana mitocondriale e induzione di *necroptosi* (Yamanaka et al., 2011), come dimostrato su cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, sia differenziate che non differenziate (Kölsch et al., 1999 e 2001). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che 24(S)OH-C potenzia gli effetti apoptotici e necrogenici esercitati dal peptide A $\beta$ 1-42 su due differenti linee cellulari neuronali umane (Gamba et al., 2011) e su cellule simil-neuronali (Testa et al., 2012).

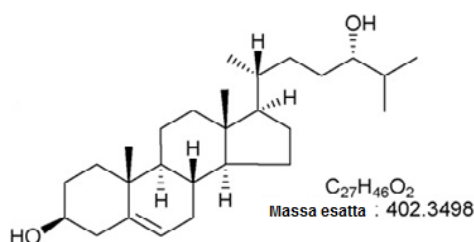


Figura 4- Struttura di 24(S)OH-C

#### 2.4 24(S)OH-C e patogenesi della malattia di Alzheimer (AD)

La forma sporadica di AD è caratterizzata da depositi extracellulari di A $\beta$  nelle placche senili, accumuli intracellulari della proteina tau iperfosforilata, e degenerazione neuronale e sinaptica (Blennow et al., 2006). APP può subire, alternativamente, un percorso non amiloidogenico (cioè l'idrolisi di uno specifico legame peptidico che, seguita dall'idrolisi di un altro legame peptidico, produce tre peptidi non tossici) dipendente dall'enzima  $\alpha$ -secretasi, oppure un percorso amiloidogenico dipendente dall'enzima  $\beta$ -secretasi

(BACE1), che porta (mediante idrolisi di un differente legame peptidico, seguita dall'idrolisi dello stesso legame peptidico del primo percorso) alla formazione di A $\beta$ . Quest'ultimo percorso, se attivato in maniera anomala, porta ad iper-produzione e/o inefficiente *clearance* di A $\beta$  (mediata da ApoE) nel cervello, con conseguente formazione di aggregati e placche amiloidi diffuse. La combinazione di eventi, come accumulo di oligomeri A $\beta$ , stress ossidativo, risposte infiammatorie, disfunzione microvascolare, ridotta *clearance* di A $\beta$  e cambiamenti metabolici, contribuiscono a indurre disfunzione sinaptica e morte neuronale (Blennow et al., 2006; Jack et al., 2009 e 2010). *In vitro*, 24(S)OH-C e 27(S)OH-C inibiscono l'espressione di APP e la produzione di A $\beta$ , con un effetto di 24(S)OH-C maggiore rispetto a 27(S)OH-C. In particolare, 24(S)OH-C attiva il percorso non amiloidogenico di APP, stimolando l'attività della  $\alpha$ -secretasi (Prasanthi et al., 2009). La quasi totalità di 24(S)OH-C presente nel plasma viene sintetizzato nel cervello, ed è il risultato di un equilibrio fra secrezione cerebrale, *clearance* epatica e metabolismo delle lipoproteine (Leoni and Caccia, 2011 e 2012; Björkhem, 2006). I livelli plasmatici di 24(S)OH-C possono essere considerati per ottenere informazioni sullo stato metabolico dei neuroni (Leoni e Caccia, 2011 e 2012; Björkhem et al., 2002; Hughes et al., 2012). Tuttavia, i dati presenti in letteratura sono discordanti: alcuni studi dimostrano una riduzione nei livelli plasmatici dell'ossisterolo in AD, come conseguenza della degenerazione di neuroni metabolicamente attivi (Koudinov et al., 2001; Teunissen et al., 2003; Besga et al., 2012); altri studi, invece, descrivono un aumento nei livelli plasmatici di 24(S)OH-C in AD (Leoni et al., 2008; Qureschie et al., 2008). L'aumento potrebbe essere spiegato considerando un incremento nel turnover delle membrane neuronali, come conseguenza del danneggiamento neuronale, che fornisce elevate quantità di C da convertire in 24(S)OH-C. Esistono, infine, alcuni lavori in cui non vengono osservate differenze significative nei livelli plasmatici di 24(S)OH-C fra controlli e pazienti affetti da AD (Gamba et al., 2011; Iuliano et al., 2010).

Durante il corso di una malattia neurodegenerativa, come AD o sclerosi multipla, ad un iniziale incremento nel turnover di C, associato ad aumento di 24(S)OH-C nel plasma, segue una fase di ridotto turnover di C, dovuta a degenerazione neuronale, associata a riduzione di 24(S)OH-C nel plasma. Le due fasi, in parte, si sovrappongono ed il risultato è un profilo molto complesso (e soggettivo per ogni paziente) nell'andamento di 24(S)OH-C in condizioni di neurodegenerazione (Hughes et al, 2012). La combinazione degli effetti metabolici e tossici di 24(S)OH-C deve essere, infatti, considerata per spiegare i risultati, apparentemente, contrastanti, appena descritti. Pertanto, nonostante 24(S)OH-C sia fortemente implicato nella patogenesi di AD, e nonostante i suoi livelli plasmatici rispecchino lo stato metabolico dei neuroni, la misura dei livelli plasmatici di questo ossisterolo (che viene comunemente titolato dopo idrolisi alcalina, cioè come somma di forme libere ed esterificate native) non si può considerare un biomarcatore di fenomeni neurodegenerativi.

### ***2.5 Rilevanza dell'esterificazione del colesterolo e degli ossisteroli***

Esteri degli ossisteroli sono stati rilevati sia nelle placche aterosclerotiche che nel plasma umano (Brook et al., 1971; Teng et al., 1975; Smith et al., 1981; Lin and Morel, 1996; Szedlacsek et al., 1995) ed è stato ipotizzato che l'esterificazione possa alterare la distribuzione degli ossisteroli e l'associazione alle proteine plasmatiche che partecipano a RCT e influenzare il trasporto alle cellule, alleviando, così, il loro effetto tossico (Lin and Morel, 1996; Szedlacsek et al., 1995). L'esterificazione di C, catalizzata da LCAT, è un processo fondamentale in RCT dalle cellule periferiche al fegato (Glomset, 1962 e 1968; Jonas, 1991; Rader, 2009) ed influenza la distribuzione di C fra le lipoproteine (Glomset, 1962; Jonas, 1991; Tall et al., 1987; Tall, 1993). Oltre C, alcuni studi hanno dimostrato che LCAT esterifica anche 25-OH-C e 27OH-C, producendo essenzialmente monoesteri del primo (circolanti in associazione a lipoproteine) (Lin and Morel 1996) e sia monoesteri

che diesteri del secondo ossisterolo (Szedlacsek et al. 1995). Benché sia comunemente ritenuto che gli esteri di 24(S)OH-C (24(S)OH-CE), trovati nel fluido cerebrospinale (CSF) e nelle lipoproteine plasmatiche (Dzeletovic et al. 1995; Papassotiropoulos et al. 2002; Burkard et al., 2007), siano prodotti dalla forma cerebrale di LCAT, non esiste attualmente alcuna evidenza sperimentale che questo enzima sia effettivamente responsabile dell'esterificazione di 24(S)OH-C.

## SCOPO DEL LAVORO

L'accumulo di 24(S)OH-C, così come l'accumulo di C in SNC, è neurotossico. La scoperta di elevati livelli di 24(S)OH-C, nel CSF di pazienti con malattie neurodegenerative, suffraga l'ipotesi che l'aumentata escrezione neuronale di questo ossisterolo rifletta uno stato patologico. Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che 24(S)OH-C, benché coinvolto in ruoli positivi intracellulari, possa diventare tossico per i neuroni quando è presente a concentrazioni superiori a quelle fisiologiche nel terreno di coltura. Il fatto che la maggior parte di 24(S)OH-C circolante si trovi in forma esterificata, incorporata in lipoproteine, suggerisce che l'allontanamento di questo ossisterolo dal SNC venga stimolato dalla sua esterificazione. Gli esteri lipidici, infatti, a causa della loro idrofobicità, sono massivamente inglobati nel *core* idrofobico delle lipoproteine che, così, trasportano in circolo grandi quantità di lipidi. Dal momento che 24(S)OH-C condivide con C il gruppo ossidrilico usato dall'enzima LCAT per la formazione di CE, è stato ipotizzato che questo ossisterolo possa essere esterificato anch'esso da LCAT, sotto stimolazione di ApoA-I o ApoE, entrambi presenti nel SNC. Uno degli obiettivi principali di questo lavoro di tesi è stato quello di dimostrare che 24(S)OH-C è substrato di LCAT nel SNC, e che l'esterificazione possa favorire la rimozione di questo ossisterolo dal cervello, prevenendone così l'effetto tossico sui neuroni. In tale contesto, un obiettivo secondario del lavoro è stato quello di analizzare i prodotti di esterificazione *in vitro* di 24(S)OH-C, per definire se si trattasse di monoesteri o diesteri, dal momento che 24(S)OH-C presenta una doppia funzione ossidrilica.

Un altro obiettivo, importante per confermare che LCAT fosse effettivamente l'enzima responsabile dell'esterificazione del 24(S)OH-C, è stato quello di verificare che

l'esterificazione dell'ossisterolo riflettesse condizioni tipiche dell'attività di LCAT: inibizione da parte di anticorpi anti-LCAT, stimolazione maggiore da parte di ApoA-I rispetto ad ApoE, spiazzamento del substrato noto (cioè C), inibizione da parte di Hpt e, infine, perdita di attività a seguito di stress ossidativo.

Un obiettivo principale è stato quello di valutare se LCAT, convertendo parte di 24(S)OH-C a 24(S)OH-CE (che vengono accumulati all'interno di proteoliposomi), fosse in grado di ridurre la concentrazione di 24(S)OH-C disponibile per i neuroni in coltura, confinando 24(S)OH-CE nello spazio extracellulare e limitando, così, l'incorporazione cellulare e la conseguente neurotossicità di 24(S)OH-C.

L'ultimo obiettivo della mia tesi è stato quello di analizzare l'attività di LCAT *ex vivo*, in campioni biologici (plasmi e fluidi cerebrospinali) di soggetti sani, individui affetti da debole difficoltà cognitiva (MCI) e pazienti affetti da malattie neurodegenerative (malattia di Alzheimer o Sclerosi Laterale Amiotrofica). Le alterazioni dell'attività enzimatica, supposte accompagnare condizioni di neurodegenerazione, avrebbero candidato l'attività di LCAT come biomarcatore specifico di ipercolesterolemia e stress ossidativo cerebrali, noti fattori di rischio neurodegenerativo. In tale contesto, sono state pianificate analisi di campioni di plasma e CSF omologhi, con lo scopo di valutare se esistesse una correlazione fra il livello di esterificazione di 24(S)OH-C nel CSF e quello nel plasma. Dal momento che 24(S)OH-C presente in circolo è quasi esclusivamente di origine cerebrale, l'analisi del livello di esterificazione di questo ossisterolo nel plasma rifletterebbe condizioni neurodegenerative e, quindi, potrebbe rappresentare un utile strumento diagnostico.

## MATERIALI

Il lipide fluorescente 1-palmitoil-2-{6-[(7-nitro-2-1, 3-benzossadiazolo-4-il) ammino] esanoil}-sn-glicero-3-fosfocolina (16:00-6:0 PC NBD) e il 24(S)OH-C idrossicolesterolo sono stati acquistati da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Il 24(S)-idrossicolesterolo triziato [22,23-<sup>3</sup>H] (50 Ci/mmol) è stato fornito da American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). [1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-Colesterolo (52.5Ci/mmol) e il liquido di scintillazione Ultima Gold sono stati acquistati da Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). Prodotti chimici ad elevata purezza come l'albumina di siero umano (HSA), fosfatidilcolina (PC) da tuorlo d'uovo (1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina; purezza 99% da TLC: numero di catalogo P3556; contenuto di acido palmitico, stearico, oleico e linoleico di circa 33, 13, 31 e 15% rispettivamente, più altri acidi grassi), acido retinoico (RA), glutaraldeide, Crystal Violet, colesterolo, colonne Supelcosil LC-18 (4,6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ ), Crystal Violet, dodecil solfato di sodio (SDS), CuCl<sub>2</sub>, acido ascorbico, perossido di idrogeno, KOH, NaCl e altre sostanze chimiche, anticorpi policlonali di coniglio anti-Hpt umana (cat # H8636), anticorpo di capra coniugato alla perossidasi di rafano (HRP) anti-IgG di coniglio (IgG GAR-HRP, cat # A0545), anticorpi di coniglio coniugati con perossidasi di rafano anti IgG di capra (IgG RAG-HRP, cat # A5420), anticorpi di capra coniugati con perossidasi di rafano anti-IgG di topo (IgG GAM-HRP, cat # A2554), sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM e siero bovino fetale (FBS) sono stati acquistati da BioWhittaker (Verseviere, Belgio). L-glutammina, penicillina e streptomina sono state acquistate da Gibco (Life Technologies Italy, Monza, Italia). Sono state usate fiasche per colture cellulari (25 cm<sup>2</sup>), piastre a 96 pozzetti per colture cellulari e pipette sterili della Beckton-Dickinson (San Jose, CA, USA). La proteina

ApoA-I umana, i filtri per centrifuga Amicon, la membrana PDVF per il trasferimento delle proteine, l'anticorpo policlonale anti-ApoA-I in coniglio (cat # 1784229), anticorpi policlonali anti-ApoE in capra (cat # AB947), sono stati acquistati da Merck Millipore (Billerica, MA, USA). ApoE3 ricombinante è stata acquistata da Peprotech (Londra, UK). L'anticorpo monoclonale anti-ApoE umana è stato acquistato dalla ditta Santa Cruz (Dallas, TX, USA). L'anticorpo monoclonale anti-LCAT in coniglio è stato, invece, acquistato da Abcam (Cambridge, UK), cat # 51060. L'anticorpo anti-ApoE4 monoclonale (cat # M067-3) è stato acquistato da MBL International (Woburn, MA, USA). La colonna C18 NUCLEODUR ISIS (4,6 × 250 mm, 3 μ) e le lastre Sil-G per la cromatografia su strato sottile (TLC; 0.25 mm) e colonne per SPE (MFC18 ec, 200 mg), usate per l'isolamento degli ossisteroli, provengono dalla Macherey-Nagel (Duren, Germania). La resina Sephacryl S-200 proviene da GE-Healthcare Life Sciences (Milano, Italia). I solventi organici sono stati acquistati da Romil (Cambridge, UK). La colonna LUNA C18 (2 × 100 mm, 3 μ) per UPLC è stata acquistata dalla Phenomenex (Torrance, CA, USA). La linea cellulare SH-SY5Y di neuroblastoma umano è stata gentilmente fornita dall'Istituto di Genetica e Biofisica (CNR, Napoli, Italia). I reattivi per i dosaggi colorimetrici delle proteine, i reattivi per la chemiluminescenza, le lastre fotografiche Kodak e i reagenti di sviluppo e fissaggio sono stati acquistati dalla Bio-Rad (Hercules, CA, USA). L'apparecchio usato per il trasferimento delle proteine era del tipo *Semi-dry* ed è stato acquistato da Whatman Biometra (Baltimora, MD, USA). I fluidi follicolari ed i plasmi omologhi sono stati forniti dalla II Clinica Neurologica della Seconda Università di Napoli, previo consenso informato dei pazienti. Altri plasmi di pazienti con AD o di soggetti con MCI sono stati forniti dalla banca di campioni dell'IRRCFS Fatebenefratelli di Brescia.



## METODI

### *3.1 Esterificazione di 24(S)OH-C in vitro: tre diversi approcci sperimentali*

#### **3.1.1 Analisi HPLC di un prodotto di esterificazione fluorescente**

Un pool di siero umano è stato trattato con 0,65% di destrano solfatato (PM = 15 kDa) in 0,2 M MnCl<sub>2</sub>, al fine di allontanare le lipoproteine, e poi abbondantemente dializzato (*cut-off* = 30 kDa) contro TBS (TBS: 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) a 4°C per allontanare il destrano solfatato. Il siero così ottenuto, deprivato da lipoproteine e denominato LPDS, è stato utilizzato come fonte dell'enzima LCAT. In alcuni esperimenti, 24(S)OH-C è stato esterificato da LCAT in presenza di proteoliposomi, contenenti ApoA-I o ApoE (come stimolatori dell'attività enzimatica) e fosfatidilcolina (PC) con una catena esanoilica fluorescente (NBD-PC) (come donatore della catena acilica). I proteoliposomi fluorescenti (rapporto molare ApoA-I/NBD-PC = 1/133; 25 µM ApoA-I) sono stati preparati secondo il metodo della dialisi del colato, essenzialmente in accordo con una procedura pubblicata (Chen and Albers, 1982). La miscela di reazione (50 µL) contenente LPDS (concentrazione finale = 3 mg/mL di proteine), 30 µM 24(S)OH-C, proteoliposoma fluorescente (con 1,8 µM ApoA-I nella miscela), 0,5% albumina di siero umano (HSA) e 50 µM β-mercaptoetanolo in TBS (130 mM NaCl, 20 mM Tris HCl, pH 7,4) è stata incubata a tempi diversi (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 h) a 37°C. Miscele mancanti di 24(S)OH-C o LPDS sono state preparate e usate come controllo. Un ulteriore controllo è stato fatto incubando (1 h, 37°C) LPDS con 2 µL di anticorpo monoclonale di coniglio anti-LCAT, prima di aggiungere la miscela di reazione sopra descritta. Ad ogni tempo di incubazione analizzato, la reazione è stata fermata con l'aggiunta di 150 µL di etanolo, e la componente lipidica è stata recuperata da ogni miscela mediante quattro estrazioni sequenziali, ciascuna con 0,5 ml di esano. Dopo aver fatto evaporare l'esano dai campioni, utilizzando una

centrifuga collegata ad una pompa da vuoto, i lipidi sono stati ridisciolti in 60  $\mu$ L di acetonitrile/metanolo (60/40, v/v) ed analizzati per HPLC. Nello specifico, aliquote da 20  $\mu$ L ciascuna sono state iniettate su una colonna Supelcosil LC-18 (5  $\mu$ m di diametro delle particelle, 250  $\times$  4,6 mm); la cromatografia è stata condotta a 1 mL/min a 25°C, usando una fase mobile di acetonitrile/metanolo (60/40, v/v). Per monitorare l'eluizione del campione, è stato utilizzato un rivelatore di fluorescenza ( $\lambda_{EX} = 460$  nm,  $\lambda_{EM} = 534$  nm). L'area del picco fluorescente è stata misurata dal software Class-VP (Shimadzu, Columbia, MD, USA) e la quantità di materiale fluorescente è stata espressa in unità arbitrarie. Il picco col gruppo fluorescente NBD, prodotto durante l'incubazione (e supposto essere 24(S)OH-C esterificato con l'acile fluorescente), è stato raccolto (tempo di ritenzione: 6,6 minuti) e, successivamente, processato per analisi di spettrometria di massa e massa-massa (MS e MS/MS), che permettevano di confermare la presenza di 24(S)OH-C esterificato e di valutare se il prodotto della reazione fosse un mono o un di-estere.

### **3.1.2 Analisi HPLC dei prodotti di idrolisi alcalina degli esteri di 24(S)OH-C**

Un'evidenza indiretta dell'esterificazione di 24(S)OH-C, da parte di LCAT, è stata ottenuta da esperimenti finalizzati a idrolizzare gli esteri prodotti durante incubazione di 24(S)OH-C con LPDS e con una sospensione di proteoliposomi fluorescenti, preparati come precedentemente descritto. Miscele di reazione da 100  $\mu$ L, preparate utilizzando le stesse concentrazioni del precedente esperimento ed incubate per 8 h a 37°C, sono state addizionate di 2 mg/mL BHT e 0,3  $\mu$ M EDTA e rapidamente divise in due aliquote di 50  $\mu$ L. Un'aliquota (chiamata S) è stata sottoposta a trattamento alcalino (saponificazione), tramite aggiunta di 150  $\mu$ L di 1 M KOH in etanolo, mentre l'altra (chiamata NS) è stata addizionata di 150  $\mu$ L di etanolo. Le due aliquote sono state separatamente incubate per 1 h a 37°C. KOH è stato neutralizzato, al termine dell'incubazione, con l'aggiunta di 10  $\mu$ L di acido fosforico al 50% (v/v); poi, entrambe le aliquote sono state supplementate con 50

$\mu\text{L}$  di 2 M NaCl, prima dell'estrazione lipidica in esano. I lipidi essiccati sono stati ripresi in acetonitrile e, poi, frazionati per HPLC, utilizzando una colonna Nucleodur C18 ISIS: la cromatografia è stata condotta ad una velocità di 1 mL/min a 25°C, usando acetonitrile come fase mobile. Un rivelatore UV ( $\lambda = 205 \text{ nm}$ ) è stato utilizzato per monitorare l'eluizione di 24(S)OH-C che, in queste condizioni sperimentali, è stata osservata dopo 18 minuti. Le aree dei picchi di 24(S)OH-C nei campioni S ed NS hanno rappresentato, rispettivamente, la quantità di 24(S)OH-C totale e di 24(S)OH-C non esterificato, e sono state misurate attraverso il software Class-VP.

### 3.1.3 Esterificazione di 24(S)OH-C marcato con trizio

In alcuni esperimenti in vitro è stato utilizzato 24(S)OH-C triziato ( $^3\text{H}$ -24(S)OH-C). Per verificare l'esterificazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C sono state preparate delle miscele contenenti LPDS come fonte di LCAT (concentrazione finale: 3 mg/mL di proteine plasmatiche), proteoliposomi contenenti ApoA-I o ApoE (concentrazione finale di apolipoproteina nella miscela: 1  $\mu\text{M}$ ),  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C (concentrazione finale nella miscela: 30  $\mu\text{M}$ ; attività specifica: 20  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ ), 0,5% albumina di siero umano (HSA), e 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanololo in TBS. La miscela di reazione è stata incubata per 4 h a 37°C. In parallelo, sono state preparate miscele di reazione senza proteoliposoma o senza LPDS, come controlli. Al termine dell'incubazione, alle miscele sono stati aggiunti 150  $\mu\text{L}$  di etanolo, e i lipidi sono stati recuperati con esano come precedentemente descritto. Gli estratti di ciascun campione sono stati riuniti, portati a secco ed, infine, ridisciolti in 50  $\mu\text{L}$  di cloroformio. I campioni così ottenuti sono stati trasferiti su una lastrina di silice (fissata su un supporto di alluminio) e processati mediante cromatografia su strato sottile (TLC, *Thin Layer Chromatography*), in cui la fase stazionaria era rappresentata dalla silice, mentre la fase mobile era costituita per 70% da esano e per 30% da acetato di etile. In queste condizioni, a causa di una diversa idrofobicità fra 24(S)OH-C e 24(S)OH-CE, queste due

specie migrano in maniera differente sulla lastrina. In particolare, gli esteri 24(S)OH-CE, essendo più apolari per la presenza di un gruppo acilico lipidico, migrano più velocemente rispetto a 24(S)OH-C, che, al contrario, viene trattenuto con più forza dalla fase stazionaria. Al termine della TLC, la lastrina è stata tagliata in segmenti della lunghezza di un centimetro, lungo il percorso della migrazione, e ciascun segmento è stato separatamente analizzato allo scintillatore, per misurarne la radioattività. L'utilizzo di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C standard ha permesso di individuare la posizione di migrazione ( $R_f = 0.35$ ) di 24(S)OH-C presente in ogni campione frazionato; la radioattività è stata rilevata, solo nei campioni e non nei controlli, anche in un'altra posizione del tracciato cromatografico ( $R_f = 0,75$ ), corrispondente alla migrazione di una forma più "apolare" rispetto a  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, cioè della sua forma esterificata. L'entità dell'esterificazione è stata calcolata come rapporto tra dpm corrispondenti a  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C esterificato e dpm totali (cioè dpm di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C più dpm di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-CE), ed è stata espressa in percentuale.

### ***3.2 Cinetica di esterificazione e confronto tra ApoA-I e ApoE nella stimolazione di LCAT***

Per analizzare la cinetica di esterificazione di 24(S)OH-C e per paragonare l'efficienza di stimolazione dei due effettori ApoA-I ed ApoE, sono stati condotti esperimenti incubando un'unica miscela di reazione (volume = 170  $\mu\text{L}$ ), composta da LPDS (3 mg/mL di proteine plasmatiche), 30  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -24(S)OH-C e proteoliposomi contenenti ApoA-I o ApoE (concentrazione proteica: 1  $\mu\text{M}$ ), dalla quale sono state prelevate aliquote identiche (30  $\mu\text{L}$ ) a tempi diversi (0,5, 1, 2, 4, 8 h), che poi sono state processate per TLC ed analizzate per le percentuali di esteri prodotti. Miscele di controllo sono state preparate incubando proteoliposomi e  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C senza enzima, oppure LPDS e  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C senza proteoliposomi. Ogni aliquota prelevata è stata mescolata con 150  $\mu\text{L}$  di etanolo e, poi, sottoposta a quattro estrazioni sequenziali con 0,5 ml di esano. Gli estratti lipidici,

accumulati per ogni aliquota, sono stati portati a secco attraverso concentrazione sotto vuoto ed, infine, risospesi in cloroformio. Gli esteri di  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  (cioè  $^3\text{H-24(S)OH-CE}$ ) sono stati, quindi, separati da  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  mediante TLC e, attraverso misura della radioattività, è stato possibile calcolare la percentuale di esterificazione di  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  e l'attività di LCAT (espressa come nanomoli di  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  esterificato per h e per mL di LPDS), per ogni tempo di incubazione, sia in presenza di ApoA-I che in presenza di ApoE. Per calcolare i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$  dell'enzima, sotto stimolazione di ciascuna apolipoproteina, l'esterificazione di  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  è stata effettuata preparando delle miscele di reazione costituite da LPDS, proteoliposomi contenenti ApoA-I o ApoE (concentrazione finale della proteina:  $1\ \mu\text{M}$ ), quantità differenti di  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  ( $1,5, 5, 15, 30, 60$  or  $100\ \mu\text{M}$ ;  $20\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ ) come substrato. Dopo 3 h di incubazione a  $37^\circ\text{C}$ , la reazione è stata bloccata con etanolo e la percentuale di esterificazione è stata calcolata dopo estrazione lipidica e TLC, come sopra descritto. In particolare, i dati di cinetica sono stati adattati direttamente all'equazione di Michaelis-Menten usando una regressione non lineare, con il software GraphPad Prism 5 (software GraphPad Inc., San Diego, CA), al fine di ottenere i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$ . I dati sono stati espressi graficamente secondo il metodo di Lineweaver e Burk (metodo dei doppi reciproci).

### ***3.3 Saggio di esterificazione del colesterolo in presenza di 24(S)OH-C***

Per dimostrare che C e  $24(\text{S})\text{OH-C}$  sono substrati dello stesso enzima, sono stati allestiti degli esperimenti di competizione, preparando miscele costituite da LPDS (4%, v/v),  $0,2\ \mu\text{M}$   $^3\text{H-C}$  ( $365\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ ) in proteoliposomi contenenti ApoA-I come stimolatore di LCAT, e quantità crescenti di  $24(\text{S})\text{OH-C}$  ( $0, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100\ \mu\text{M}$ ) in TBS. Tutte le miscele contenevano 0,5% BSA e  $50\ \mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanololo. Dopo l'incubazione (2 h,  $37^\circ\text{C}$ ), i lipidi sono stati estratti con esano, frazionati tramite TLC su lastre di silice su supporto di alluminio (fase mobile: etere di petrolio/etere dietilico/acido acetico in

rapporto 90/30/1, v/v/v). Al termine della cromatografia, le lastre sono state esposte a vapori di iodio, in modo da evidenziare le aree raggiunte dalle migrazioni di C libero e di CE. C standard è stato usato come controllo su ciascuna lastra, per distinguere CE da C. In particolare, i fattori di ritenzione ( $R_f$ ) erano pari a 0,3 per C e 0,9 per CE. Per ogni lastra, le due specie lipidiche sono state separatamente rimosse ed analizzate allo scintillatore, al fine di calcolare la percentuale di esterificazione e l'attività enzimatica, espressa come nmoli di CE/h/ml di LPDS.

### ***3.4 Inibizione dell'attività di LCAT in presenza di Hpt***

L'effetto della proteina Hpt sull'attività di esterificazione di 24(S)OH-C è stato saggiato incubando LPDS con una miscela di reazione costituita da proteoliposomi (0.5  $\mu$ M ApoA-I), 15  $\mu$ M  $^3$ H-24(S)OH-C e differenti quantità di Hpt (0, 1, 2,5, 7,5, 10; rapporto molare Hpt/ApoA-I = 2, 5, 15, 20, rispettivamente) per 3 h a 37°C. Dopo estrazione dei lipidi e TLC, l'attività di LCAT è stata misurata come descritto negli esperimenti precedenti.

### ***3.5 Inibizione dell'attività di LCAT in condizioni di stress ossidativo***

L'esterificazione di 24(S)OH-C da parte di LCAT è stata analizzata anche in condizioni di stress ossidativo. In particolare, LPDS è stato incubato a 30°C per 20 min con una miscela di ossidazione basata sulla reazione di Fenton, cioè costituita da 150  $\mu$ M  $\text{CuCl}_2$ , 20  $\mu$ M  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 50  $\mu$ M acido ascorbico. Il sistema di stress ossidativo è stato messo a punto su ABTS, nota molecola bersaglio di radicali ossidrilici, che viene convertita nella sua forma monocationica radicalica (quando trattata con un agente ossidante), che ha un picco di assorbimento a 414 nm. La miscela che ha prodotto una sufficiente ossidazione di ABTS è stata utilizzata per trattare l'enzima LCAT, presente in LPDS. L'ossidazione è stata, quindi, bloccata con l'aggiunta di 1 mM acido ascorbico; poi, alla miscela sono stati aggiunti i substrati: 20  $\mu$ M  $^3$ H-24S-C e proteoliposoma, contenente 1  $\mu$ M ApoAI a

concentrazione finale nella reazione. Dopo incubazione di 3 h a 37°C, l'attività di LCAT è stata analizzata sia nella miscela sottoposta a ossidazione, sia in due miscele di controllo, costituite da LPDS preincubato in assenza della miscela di ossidazione e da LPDS aggiunto alla miscela (insieme a 20  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -24S-C e proteoliposoma) dopo blocco (con 1 mM acido ascorbico) dell'ossidazione.

### **3.6 Spettrometria di Massa**

Per eseguire gli esperimenti di analisi di massa (MS) e frammentazione (MS/MS), è stato utilizzato l'apparecchio LCQ DECA XP Ion Trap (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), uno spettrometro di massa a trappola ionica, ed è stata seguita una procedura pubblicata (Honda et al. 2009). Lo spettrometro era dotato di una sorgente di ionizzazione ESI (*Electron Spray Ionization*) che opera con un potenziale elettrico dell'ago pari a 3,5 kV e ad una temperatura di 300°C. La calibrazione dei segnali m/z è stata eseguita automaticamente utilizzando una miscela di standard commerciali di caffeina, MRFA e Ultramark (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Le condizioni generali di LC-MS/MS erano: voltaggio della vaporizzazione = 1000 V; temperatura = 350° C; pressione del gas (azoto) per l'evaporazione del solvente = 85 psi; flusso di azoto = 60 unità arbitrarie; temperatura del capillare per il trasferimento di ioni = 350° C; pressione del gas di collisione (argon) = 1,5 mTorr; polarità degli ioni = positiva. I dati sono stati processati e analizzati utilizzando il software Finningan Xcalibur versione 1.3 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). La frammentazione è stata indotta su uno ione selezionato, con il 28% dell'energia totale.

### **3.7 Esterificazione di 24(S)OH-C ex vivo**

#### **3.7.1 Analisi dell'attività di LCAT nel CSF**

L'esterificazione del 24(S)OH-C è stata analizzata nel CSF prelevato, dopo consenso informato, da tre pazienti di sesso maschile (età compresa fra 50 e 60 anni), che non assumevano farmaci al momento del prelievo. I pazienti non avevano sintomi neurologici né alcun tipo di deficit neurologico; i prelievi sono stati effettuati per analisi routinarie di diagnostica clinica neurologica, in accordo con le linee guida correnti (Deisenhammer *et al.*, 2011). I campioni di CSF (N=3), con conta eritrocitaria < 3 cellule/ $\mu$ L, proteine totali < 0.45 mg/mL e assenza di ossiemoglobina (assenza di assorbanza a 415 nm), sono stati uniti, addizionati di 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanolo (per preservare l'enzima da ossidazione spontanea) e utilizzati per gli esperimenti entro le prime due ore dal prelievo. A partire dal pool di CSF sono state fatte aliquote da 100  $\mu$ L, che sono state supplementare con 1  $\mu$ L di 2  $\mu$ M  $^3$ H-24(S)OH-C e incubate per tempi diversi (da 2 a 16 h) a 37°C. Alcuni campioni, incubati per 4 e per 16 h, contenevano anche 3  $\mu$ L di anticorpo monoclonale di coniglio anti-LCAT e sono stati usati come controllo negativo. Al termine dell'incubazione, i lipidi di ogni miscela sono stati estratti con esano, processati per TLC e infine analizzati allo scintillatore.

#### **3.7.2 Analisi dell'attività di LCAT su campioni di plasma e CSF di individui sani e di pazienti con malattia di Alzheimer (AD) o Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)**

Campioni di plasma (1 mL) e CSF (1 mL) da individui sani e da pazienti con AD o SLA sono stati conservati a -80° C fino al momento dell'utilizzo. I campioni sono stati processati per confrontare l'attività di LCAT in condizioni fisiologiche e patologiche. In generale, ogni campione è stato suddiviso in due aliquote esattamente uguali, di cui una (aliquota S) è stata sottoposta a idrolisi alcalina con KOH (saponificazione), al fine di



idrolizzare gli esteri di 24(S)OH-C, riconvertendo così in forma libera tutto 24(S)OH-C presente nel campione; l'altra aliquota (NS) non ha subito il trattamento alcalino ed è stata utilizzata immediatamente per l'estrazione dei lipidi. In particolare, prima di suddividere il campione nelle aliquote S ed NS, è stato aggiunto 24(S)OH-C deuterato (standard interno) come marcatore di eventuali perdite di materiale fra campioni trattati e non trattati. Lo standard interno è stato aggiunto in modo da averne un appropriato eccesso (2-3X) rispetto ai titoli di 24(S)OH-C presenti nei due diversi fluidi biologici esaminati: 150 ng di IS sono stati aggiunti al campione di plasma (di cui 75 ng nell'aliquota S e 75 ng in NS), e 20 ng sono stati aggiunti invece al campione di CSF (10 ng in S e 10 ng in NS). Entrambe le aliquote (S ed NS) di ogni campione analizzato sono state addizionate di 80  $\mu$ M EDTA e 0,5 mg/mL BHT. I campioni da saponificare sono stati incubati per 1 h a 37°C, dopo aver aggiunto 0,75 M (concentrazione finale) KOH in etanolo; al termine dell'incubazione, i campioni S sono stati portati a pH 7 con aggiunta di acido fosforico al 50%; ai campioni da non saponificare (NS), invece, sono stati aggiunti due volumi di etanolo. I lipidi sono stati isolati da entrambe le aliquote di ogni campione, mediante estrazioni sequenziali in esano (6 estrazioni da 1 ml ciascuna). Gli estratti sono stati accumulati, essiccati sotto vuoto in centrifuga e, poi, risospesi in 50% etanolo. Le miscele di lipidi, così ottenute, sono state frazionate per estrazione solida in fase inversa, al fine di isolare gli ossisteroli. In particolare, i campioni sono stati caricati su colonne SPE MFC18 (equilibrate in etanolo al 50%), in cui la fase solida è costituita da octadecilalcano legato a microparticelle inerti; la fase eluente, invece, consisteva in etanolo al 70%. L'eluato di ogni campione è stato portato a secco e, poi, ridisciolti in acetonitrile per l'iniezione su colonna di cromatografia in fase inversa Luna C18. L'isolamento di 24(S)OH-C dalla miscela di ossisteroli è stato effettuato mediante "ultra performance liquid chromatography" (UPLC) interfacciata con una sorgente di carica elettrica a un rivelatore per spettrometria di massa *LTQ*, che ha permesso la misura della quantità di 24(S)OH-C in ciascun campione. L'eluizione, con una

velocità di flusso pari di 0,3 mL/min, è stata fatta impostando un gradiente fra la soluzione A, costituita da 0,1% acido formico in acqua, e la soluzione B, costituita da 0,1% in acetonitrile. In particolare, per i primi 7 min l'eluizione è stata condotta in condizioni isocratiche, con 75% di B; da 7 a 8 min è stato fatto un gradiente da 75% a 90% di B; da 8 a 15 minuti sono state mantenute condizioni isocratiche con 90% di B; da 15 a 16 min, la fase mobile è stata portata a 75% di B e veniva così mantenuta fino a 21 min. La quantità di 24(S)OH-C misurata, nell'aliquota S, rappresentava 24(S)OH-C totale nel campione; la quantità di 24(S)OH-C misurata, nell'aliquota NS, invece, rappresentava la quota di 24(S)OH-C che non era stata esterificata da LCAT. L'ammontare dell'esterificazione (cioè di 24(S)OH-CE) è stato calcolato come differenza fra la quantità di 24(S)OH-C totale, misurata in ogni aliquota S, e la quantità di 24(S)OH-C non esterificato, riscontrato nella aliquota NS. I dati sono stati normalizzati, grazie alla presenza dello standard interno.

### **3.8 Colture cellulari**

#### **3.8.1 Differenziamento della linea cellulare SH-SY5Y**

La linea cellulare SH-SY5Y, derivata da neuroblastoma umano, è stata fornita dal CNR (Istituto di Genetica e Biofisica, Napoli). Le cellule sono state coltivate in terreno completo (DMEM supplementato con 10% siero fetale bovino (FBS), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL streptomina), a 37°C ed in atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub> in aria. Le cellule sono state seminate ad una densità di 8000 cellule/pozzetto, in micropiastre da 96 pozzetti. Il terreno è stato sostituito con altro terreno fresco, per tre volte durante la settimana di coltura, e le cellule sono state coltivate finché non sono giunte a confluenza. Le cellule allo stato nativo presentano un basso grado di differenziamento; coltivate in terreno povero di siero (0,5% di FBS) e addizionato con acido retinoico (RA), sviluppano fenotipo neuronale maturo. Nello specifico, il terreno di differenziamento

conteneva 0,5% FBS, 2 mM L-glutammina, 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomicina e 1% *N-2 supplement*. Dopo circa 4 h (tempo stimato affinché le cellule aderissero alla piastra), RA è stato aggiunto al terreno ad una concentrazione finale di 10 µM. Dopo 40 h dalla semina, le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti.

### **3.8.2 Valutazione dell'effetto tossico di 24(S)OH-C su cellule SH-SY5Y differenziate**

La neurotossicità di 24(S)OH-C è stata valutata sulla linea cellulare SH-SY5Y differenziata. In particolare, dopo 40 h di differenziamento, il terreno è stato rimosso dai pozzetti della piastra e sostituito con DMEM privo di siero e contenente diverse quantità di 24(S)OH-C (5, 10, 20, 40, 50 µM). Quindi, le cellule sono state incubate per 5 o 16 h. La sopravvivenza delle cellule neuronali è stata valutata tramite colorazione con Crystal Violet (CVS), in accordo con procedure pubblicate (Itagaki et al. 1991; Saotome et al. 1989). In particolare, il colorante basico lega rapidamente le componenti acide dei neuroni (DNA, RNA, nuclei), intercalandosi nel DNA delle cellule vive, ma non viene trattenuto dalle cellule morte (con membrane non integre). Al termine del trattamento, le cellule sono state dapprima fissate (15 min a 37°C) con 100 µL di 1% glutaraldeide in PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, pH 7,4), e poi, a ciascun pozzetto, sono stati aggiunti 100 µL di 1 mg/mL Crystal Violet. Dopo incubazione a 25°C per 30 min, il colorante in eccesso, insieme a quello rilasciato dalle cellule morte, è stato rimosso dai pozzetti, mentre quello intrappolato nelle cellule vive è stato solubilizzato con 200 µL di 10% acido acetico. L'assorbanza del colorante solubilizzato è stata misurata allo spettrofotometro, a 590 nm (massimo assorbimento del Crystal Violet). I dati sono stati espressi come percentuale di vitalità, assumendo come riferimento (100% di vitalità) il valore di assorbanza ottenuto dalle cellule coltivate in assenza di 24(S)OH-C. In alcuni esperimenti, 20 µM 24(S)OH-C è stato previamente incubato (5 h, 37°C) con DMEM

privo di siero e contenente 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanololo, 0,5% HSA, proteoliposomi con ApoA-I (2  $\mu\text{M}$  concentrazione finale dell'apolipoproteina, nella miscela di reazione) ed LPDS (concentrazione di 3 mg/mL di proteine, nella miscela di reazione). Miscele contenenti solo 24(S)OH-C oppure contenenti LPDS e proteoliposomi sono state usate rispettivamente come controllo negativo e positivo dell'esperimento. Al termine dell'incubazione, le miscele sono state utilizzate per trattare, per 5 h a 37°C, cellule differenziate come precedentemente descritto. Il terreno contenente le miscele è stato, quindi, rimosso e le cellule sono state ulteriormente incubate, per 16 h a 37°C, con DMEM contenente 0,2% HSA, prima di effettuare CVS per valutarne la vitalità.

### **3.8.3 Effetto dell'esterificazione di 24(S)OH-C sulla vitalità di cellule SH-SY5Y differenziate**

In alcuni esperimenti, 20  $\mu\text{M}$  24(S)OH-C è stato previamente incubato (5 h, 37°C) in DMEM privo di siero e contenente 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanololo, 0,5% HSA, proteoliposomi contenenti ApoA-I (2  $\mu\text{M}$  concentrazione finale dell'apolipoproteina) ed LPDS (concentrazione pari a 3 mg/ ml nella miscela di reazione). Miscele contenenti solo 24(S)OH-C oppure contenenti sia LPDS che proteoliposomi sono state usate, rispettivamente, come controlli negativi e positivi dell'esperimento. Al termine dell'incubazione, le miscele sono state utilizzate (come terreni coltura) per trattare, per 5 h a 37°C, cellule differenziate SH-SY5Y come precedentemente descritto. Il terreno è stato, quindi, rimosso da ogni pozzetto e le cellule sono state ulteriormente incubate, per 16 h a 37°C, con DMEM contenente 0,2% HSA, prima di CVS.

### **3.8.4 Analisi dell'incorporazione di 24(S)OH-C, in forma libera o esterificata, da parte di cellule SH-SY5Y differenziate**

Cellule SH-SY5Y, differenziate come sopra descritto, sono state incubate con DMEM, contenente 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanolo, 0,5% HSA e 20  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -24(S)OH-C (20  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ ), previamente trattato o non trattato con LPDS e proteoliposomi con ApoA-I. In particolare, la reazione di esterificazione è stata fatta incubando le miscele in DMEM a 37°C per 5 h. Aliquote di 60  $\mu\text{L}$  delle miscele sono state usate per incubare le cellule a diversi tempi (0,5, 1, 2, 4, 6 h), mentre un'aliquota da 30  $\mu\text{L}$  è stata trattata con esano per estrarre i lipidi e misurare il livello di esterificazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, come sopra descritto. Al termine delle incubazioni, il terreno è stato raccolto, centrifugato (800 g per 10 min), per allontanare eventuali detriti cellulari, ed analizzato (assieme ai lavaggi, come descritto appresso) allo scintillatore. Le cellule, invece, sono state ripetutamente lavate con DMEM (fino ad ottenere lavaggi totalmente privi di radioattività: tutti i volumi di lavaggio contenenti radioattività sono stati aggiunti al terreno) e, infine, sono state lisate con 0,1 M NaOH, per misurare la radioattività dell'ossisterolo internalizzato. I dati di incorporazione sono stati calcolati come percentuale della radioattività presente nei lisati rispetto al totale (somma della radioattività nei lisati e nei surnatanti dei terreni).

### **3.8.5 Analisi dell'incorporazione degli esteri di 24(S)OH-C, isolati mediante gel filtrazione, da parte di cellule SH-SY5Y differenziate**

Gli esteri 24(S)OH-CE sono stati isolati mediante gel filtrazione e, poi, utilizzati per trattare SH-SY5Y differenziate e verificarne l'eventuale incorporazione. In particolare, miscele di 200  $\mu\text{L}$ , contenenti 20  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, sono state preincubate (8 h, 37°C) con LPDS (3 mg/mL di proteine, nella miscela di reazione) e proteoliposomi con ApoA-I o ApoE (concentrazione proteica: 2  $\mu\text{M}$  nella miscela di reazione). Una miscela costituita da  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C ed LPDS, ma non contenente proteoliposomi, è stata preparata ed utilizzata

come controllo in coltura cellulare (come descritto in seguito). Dopo la preincubazione, i due tipi di proteoliposomi (contenenti ApoA-I e  $^3\text{H-24(S)OH-CE}$ , oppure contenenti ApoE e  $^3\text{H-24(S)OH-CE}$ ) sono stati isolati tramite cromatografia a esclusione molecolare, usando una colonna Sephacryl-S200 ( $1,5 \times 11$  cm), pre-condizionata in DMEM, ad una velocità di flusso pari a 6 mL/h. L'eluizione dei proteoliposomi è stata monitorata misurando sia la radioattività delle frazioni (da 0,3 ml ognuna), sia la loro assorbanza a 280 nm. I proteoliposomi isolati dalle miscele di controllo non sono risultati radioattivi. Le frazioni contenenti la più alta radioattività e assorbanza sono state unite e analizzate per TLC per verificare, a seconda della migrazione dei campioni, la presenza di  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  in forma libera o esterificata. I campioni sono stati concentrati, mediante filtri da centrifugazione Amicon Ultra (MW cut-off = 30.000 Da), e aliquote di proteoliposomi isolati, contenenti presumibilmente  $5 \mu\text{M } ^3\text{H-24(S)OH-CE}$  e  $0,4 \mu\text{M ApoA-I}$  o ApoE, sono state utilizzate per incubare (5 h,  $37^\circ\text{C}$ ) cellule SH-SY5Y differenziate e valutare l'incorporazione della radioattività. Al termine dell'incubazione, le miscele sono state rimosse dai pozzetti e le cellule sono state lisate come precedentemente descritto. Sia i surnatanti raccolti che i lisati cellulari sono stati analizzati allo scintillatore, per calcolare la percentuale di incorporazione della radioattività. I dati ottenuti sono stati paragonati all'incorporazione di  $5 \mu\text{M } ^3\text{H-24(S)OH-C}$  da solo o che era stato preincubato soltanto con LPDS. In alcuni esperimenti è stata saggiata la vitalità cellulare dopo incubazione con proteoliposomi contenenti  $^3\text{H-24(S)OH-CE}$  o con  $^3\text{H-24(S)OH-C}$  alla stessa concentrazione, mediante CVS, come precedentemente descritto.

### ***3.9 Procedura ELISA per la titolazione di ApoE, ApoA-I e Hpt nei campioni di plasma e CSF***

Aliquote da  $10 \mu\text{L}$  di campioni di plasma o CSF sono state miscelate con tampone di coating ( $7,3 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ ,  $1,5 \text{ mM NaN}_3$ , pH 9,6) e utilizzate per preparare diverse

diluizioni (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:700, 1:1000). Per ogni titolazione, è stata costruita una retta utilizzando proteine standard (ApoA-I, ApoE o Hpt) a concentrazioni scalari. Tutti i campioni preparati sono stati caricati su una micropiastra per ELISA (50  $\mu$ l di campione per pozzetto) e lasciati per una notte in frigo (4°C) per far bene aderire il campione alla plastica del pozzetto, mediante legami stabili, in modo proporzionale alla sua concentrazione (fase di *coating*). Le micropiastre sono state lavate per tre volte con il tampone EWB (20 mM Tris HCl pH 7,3, 130 mM NaCl, 0.05% Tween-20) e per tre volte con il tampone TBS (0,5 M NaCl, 20 mM Tris HCl a pH 7,3). Alla fase di *coating* è seguita quella di *blocking*: la micropiastra è stata incubata per 1 h a 37°C con una soluzione contenente BSA (20 mM Tris-HCl a pH 7,3, 130 mM NaCl, 0,5% BSA), per saturare la capacità di adsorbimento aspecifico della plastica. Dopo l'incubazione e i successivi lavaggi, i pozzetti sono stati riempiti con anticorpo primario, diluito in 60  $\mu$ L di tampone DB (0,025% BSA in EWB). In particolare, è stata utilizzata una diluizione 1:1500 per IgG anti-Hpt policlonale in coniglio, 1:3500 per IgG anti-ApoE, 1:800 per IgG anti-ApoA-I. La micropiastra è stata incubata per 1 h a 37°C e, poi, lavata come nelle tappe precedenti. La tappa successiva è consistita nell'incubazione della micropiastra con l'anticorpo secondario (70  $\mu$ L per ogni pozzetto), diluito nella stessa soluzione (tampone DB) in cui era stato preparato l'anticorpo primario, ma *presaturato* utilizzando un pool di sieri umani diluiti 1:20 in TBS. La presaturazione aveva lo scopo di formare immunocomplessi con proteine seriche umane che eventualmente avrebbero potuto reagire e, quindi, per neutralizzare anticorpi che avrebbero potuto legarsi aspecificamente alle proteine (diverse dall'anticorpo primario) legate al pozzetto. Nello specifico, Ab GAR-HRP a diluizione 1: 4500 e 1:2000 sono stati usati, rispettivamente, per rilevare IgG anti-Hpt e IgG anti-ApoA-I; Ab RAG-HRP a diluizione 1:12000 per rilevare IgG anti-ApoE. Gli anticorpi secondari sono stati incubati per 1h a 37°C. La fase di misura della quantità di antigene (sviluppo del colore) è stata effettuata aggiungendo 100  $\mu$ L di soluzione di

substrato per la perossidasi; tale soluzione è stata preparata mescolando 20 mg di o-fenilendiammina e 12  $\mu$ L di 30%  $H_2O_2$  con 50 ml di una soluzione costituita da 30 mM acido citrico e 75 mM  $NaHPO_4$  a pH 5.

### **3.10 Elettroforesi ed immunoblotting**

#### **3.10.1 Titolazione di LCAT nel CSF di individui sani e di pazienti con AD o SLA**

L'elettroforesi è stata condotta in condizioni denaturanti e riducenti (SDS-PAGE) su gel discontinuo di poliacrilammide, essenzialmente in accordo con il metodo di Laemmli (1970). Il gel di carica (*upper gel*) è stato preparato al 6% di acrilammide e conteneva 137 mM Tris-HCl a pH 6,8 e 0,1% SDS. Il gel di separazione (*lower gel*) è stato preparato al 12,5% di poliacrilammide (rapporto acrilammide: bisacrilammide pari a 37,5:1) e conteneva 300 mM Tris-HCl a pH 8,8 e 0,1% SDS; Ammonio persolfato e TEMED (N, N, N', N'-tetrametil, etilendiammina) sono stati usati come catalizzatori della reazione di polimerizzazione, secondo una procedura pubblicata (Laemmli, 1970). Le dimensioni del gel di separazione erano 8 cm (altezza)  $\times$  0,5 cm (larghezza)  $\times$  0,15 cm (spessore). Il tampone di corsa (pH 8,3) è stato preparato sciogliendo 14,4 g di glicina e 3 g di Tris 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 pH 8,6, 10% glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0,3% blu di bromofenolo, 5% SDS) secondo una procedura pubblicata (O'Farrell, 1975), sono stati incubati a 100°C per 5 minuti, prima di essere caricati sul gel. La corsa elettroforetica è durata circa 2 h a corrente costante (30 mA), ed è stata bloccata circa 20 min dopo che il colorante aveva raggiunto l'estremità inferiore del gel. Al termine della corsa, le proteine sono state trasferite (*Western blotting*) dal gel su una membrana di PVDF mediante migrazione in campo elettrico, secondo un protocollo pubblicato (Towbin et al., 1979), utilizzando per il trasferimento l'apparecchio *Semi-Dry*.



La membrana, previamente attivata in metanolo puro e poi equilibrata per circa 20 min in tampone di trasferimento (20 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanolo, pH 8,3), è stata posizionata su uno strato formato da cinque fogli di cellulosa a contatto con l'anodo; sulla membrana è stato adagiato il gel e, su di esso, altri cinque fogli di cellulosa: tutti i fogli sono stati imbevuti di tampone freddo. L'intensità di corrente applicata è stata 3,5 mA per cm<sup>2</sup> di membrana e il tempo di trasferimento è stato 60 min. Al termine del trasferimento, la membrana è stata lavata (4 volte, per 5 min ogni volta) in EWB (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7,3), prima di procedere con la fase di *blocking* (per saturare siti aspecifici della membrana, a cui gli anticorpi potrebbero legarsi), consistente nell'incubazione *overnight* a 4°C con 5% latte scremato in EWB. Dopo tre lavaggi in EWB, la membrana è stata incubata a 37°C per 1 h con l'anticorpo specifico anti-LCAT in coniglio, diluito 1: 1000 con 0,25% latte scremato in EWB. Quindi, dopo gli opportuni lavaggi, la membrana è stata incubata con l'anticorpo GAR-HRP, diluito 1:2000 con 0,25% latte scremato in EWB. Infine la membrana è stata lavata ancora abbondantemente in EWB, prima di procedere con la rivelazione, fatta per chemiluminescenza. Il reattivo di sviluppo della chemiluminescenza era costituito da 100 mM Tris-HCl a pH 8, 0,4 mM iodofenolo, 2,5 mM luminolo e 2,5 mM perossido di idrogeno.

### **3.10.2 Analisi dell'aplotipo di ApoE nei plasmi di individui controllo e di pazienti AD o SLA**

La ricerca dell'aplotipo di ApoE nei campioni di plasma di individui sani e pazienti AD e SLA è stata fatta essenzialmente seguendo alcune procedure pubblicate (Rebeck et al., 1998; Elliott et al., 2010). ApoE4 si può facilmente distinguere da ApoE2 ed ApoE3 tramite SDS-PAGE in condizioni non riducenti. La presenza di due residui di Arginina nelle posizioni 112 e 158 di ApoE4 fa sì che ApoE4 non possa formare dimeri, al contrario di ApoE2 (che possiede due residui di Cisteina nelle stesse posizioni) e di ApoE3 (che

possiede Cisteina in posizione 112 e Arginina in posizione 158). I campioni da analizzare sono stati preparati in condizioni non riducenti (in assenza, cioè, di  $\beta$ -mercaptoetanololo) e caricati su gel di acrilammide al 12%, preparato come descritto precedentemente. In dettaglio, sono stati prelevati 80  $\mu$ L da ogni campione di plasma e a questi sono stati aggiunti 40  $\mu$ L di solfato di destrano all'1,3% (0,65% di concentrazione finale) e 5  $\mu$ L di 4,75 M MgCl (0,2 M di concentrazione finale). I campioni sono rimasti per 2 h a temperatura ambiente e, poi, sono stati centrifugati per 60 min a 10000 g a 10°C. Il surnatante è stato scartato e le lipoproteine, precipitate, sono state riprese con un tampone denaturante ma non riducente (62,3 mM Tris-HCl pH 8,6, 10% glicerolo, 0,3% blu di bromofenolo, 5% SDS). I campioni sono stati, quindi, bolliti per 5 min e poi caricati su gel. Oltre ai campioni, sul gel sono stati caricati gli standard di ApoE4 (controllo positivo) ed ApoE3 (controllo negativo). Dopo corsa elettroforetica, durata circa 2 h a 30 mA, le proteine del gel sono state trasferite su membrana di PDVF usando l'apparecchio Semi-dry, come descritto in precedenza, ma trasferendo per 75 min a 50 V. Le membrane, così, ottenute sono state dapprima incubate per 1 h a 37°C con anticorpo murino specifico anti-ApoE4, diluito 1:2000 con 0,25% latte scremato in EWB, e, dopo opportuni lavaggi in EWB, con IgG GAM-HRP (diluito 1:3000 in EWB) per 1 h a 37°C. Infine la membrana è stata lavata ancora abbondantemente in EWB, prima di procedere con la rivelazione, fatta per chemiluminescenza, come già descritto. Una volta ottenuto il segnale per ApoE4, per distinguere fra i campioni omozigoti e gli eterozigoti per ApoE4, le membrane sono state lavate in EWB e re-incubate con anticorpi murini monoclonali anti-ApoE (1:2000) e poi con IgG GAM-HRP (1:4000); di nuovo, il segnale è stato rilevato per chemiluminescenza.

## RISULTATI E INTERPRETAZIONE DEI DATI

### *4.1 Esterificazione di 24(S)OH-C in vitro con acido esanoico fluorescente*

La prima evidenza che LCAT fosse in grado di esterificare il 24(S)OH-C è provenuta da esperimenti in cui l'ossisterolo è stato incubato (4 h a 37°C) con LPDS, come fonte dell'enzima, e proteoliposomi contenenti ApoA-I e NBD-PC, in TBS. In questi esperimenti, il controllo negativo era costituito da LPDS, preincubato con anticorpo monoclonale anti-LCAT prima di essere aggiunto alla miscela di reazione. Dopo l'incubazione, i lipidi sono stati isolati e analizzati tramite HPLC con rivelatore a fluorescenza. E' stata effettuata una cromatografia in fase inversa, usando acetonitrile/metanolo (60/40, v/v) come fase mobile. Un picco fluorescente è stato rilevato, con un tempo di ritenzione di 6,6 min (Fig. 5). L'area di questo picco è risultata significativamente più bassa ( $P < 0,01$ ) rispetto a quella ottenuta dall'iniezione dei lipidi della miscela di controllo negativo. Inoltre, questo picco non è stato affatto rilevato quando nella miscela di reazione non è stato aggiunto LPDS o 24(S)OH-C. I risultati hanno indicato, quindi, che LCAT è stato responsabile della produzione del materiale fluorescente, eluito a 6,6 min, ed hanno suggerito che tale materiale avrebbe potuto essere effettivamente il prodotto della esterificazione di 24(S)OH-C, con la catena acilica di NBD-esanoile legata ad uno o entrambi gli atomi di ossigeno dei gruppi ossidrilici di 24(S)OH-C. La cinetica dell'attività enzimatica è stata analizzata iniettando campioni provenienti da miscele incubate per tempi crescenti, e valutando l'incremento dell'area del picco di eluizione a 6,6 min (Fig. 6). Da questo esperimento di cinetica enzimatica, si evince che la quantità del prodotto di esterificazione è aumentata linearmente da 0 a 2 h di

incubazione, mentre non si è osservato un aumento significativo della quantità di prodotto dopo 4 h di incubazione.

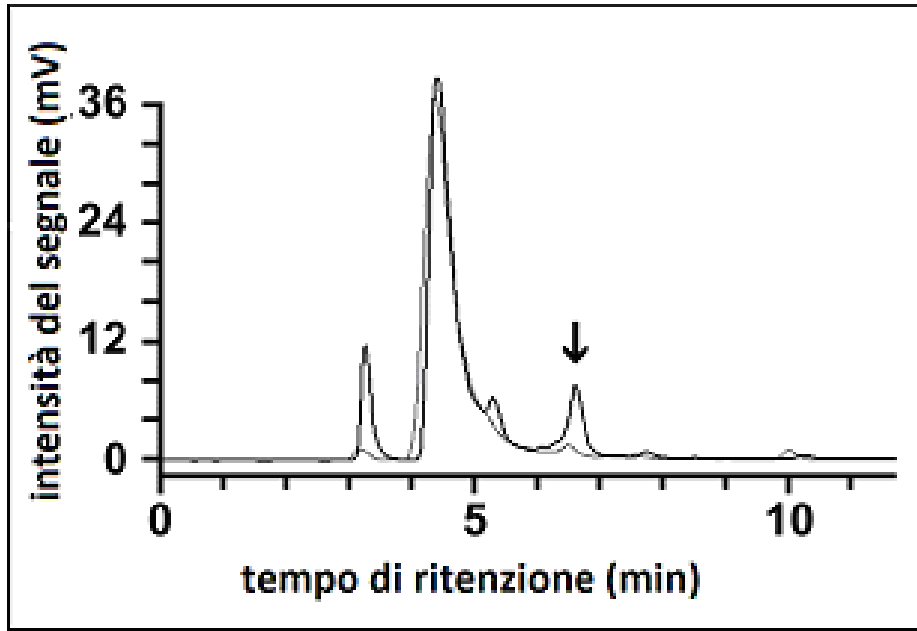


Figura 5 – Cromatogramma relativo all'iniezione del campione contenente prodotti fluorescenti dell'attività di LCAT (linea nera) e del campione incubato con anticorpo monoclonale anti-LCAT (linea grigia).

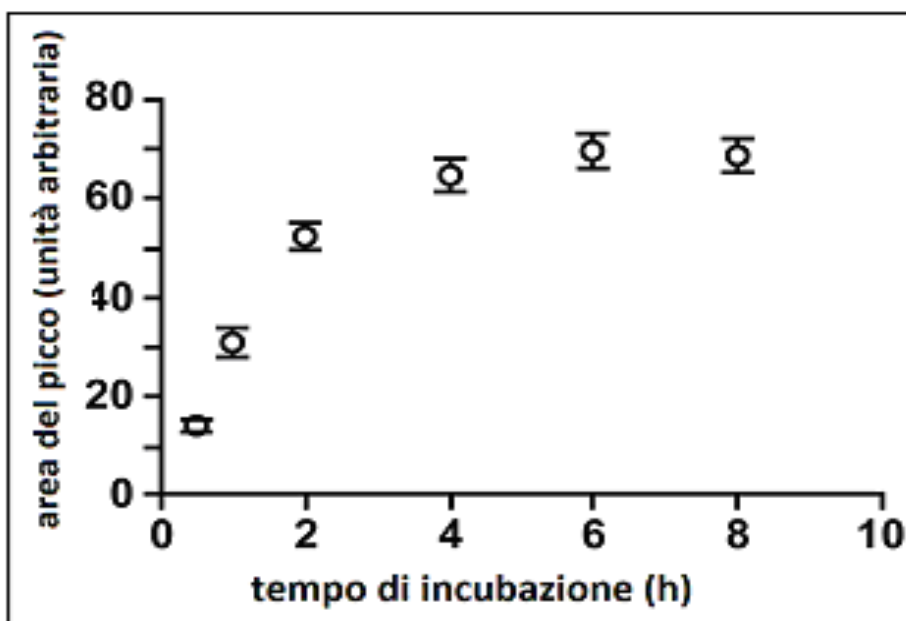


Figura 6- Aumento dell'area del picco prodotto da LCAT a differenti tempi di incubazione, in assenza di anticorpo anti-LCAT. I dati, da tre esperimenti indipendenti, sono espressi come medie  $\pm$  SD

I prodotti fluorescenti dell'incubazione di 24(S)OH-C con acido NBD-esanoico, preparati come sopra descritto, sono stati idrolizzati tramite trattamento alcalino, per confermare che si trattasse di prodotti di esterificazione. In particolare, dopo l'incubazione, ogni miscela di reazione è stata divisa in due aliquote identiche: una delle due (aliquota S) è stata trattata con KOH, mentre l'altra (aliquota NS) non è stata sottoposta ad idrolisi alcalina. I lipidi di entrambe le aliquote (S ed NS), estratti con esano, sono stati analizzati per HPLC in fase inversa, con acetonitrile come fase mobile (Fig. 7).

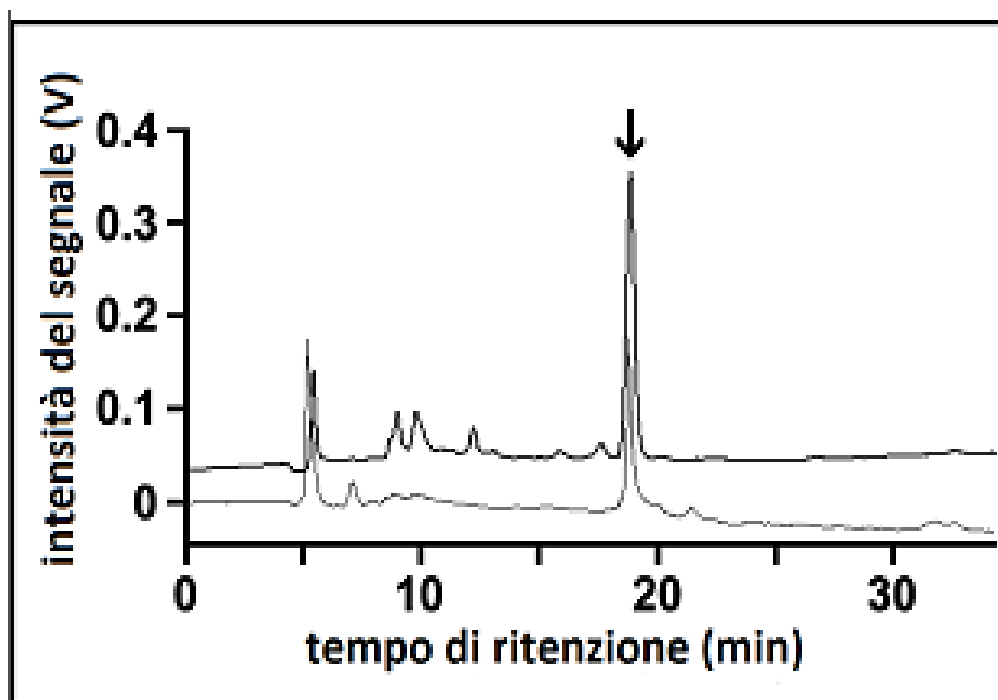


Figura 7 – Analisi HPLC dei prodotti fluorescenti, ottenuti incubando 24(S)OH-C con proteoliposomi (contenenti ApoA-I e NBD-PC) in presenza di LCAT. I lipidi, dopo l'incubazione, sono stati divisi in due uguali aliquote, di cui una (aliquota S) è stata sottoposta ad idrolisi alcalina e l'altra (aliquota NS) no. Il picco di 24(S)OH-C è stato rilevato misurando l'assorbanza a 205 nm dell'eluato (S: linea nera; NS: linea grigia). La figura mostra il cromatogramma di uno fra tre esperimenti indipendenti.

Come è possibile osservare nel cromatogramma, il picco di 24(S)OH-C, eluito dopo 18 min e rilevato misurando l'assorbanza a 205 nm, risulta maggiore nell'aliquota S che non in quella NS. Sono state misurate le aree dei due picchi, e la quantità di esteri di 24(S)OH-C prodotti da LCAT è stata calcolata come differenza tra l'area ottenuta da S (24(S)OH-C

totale presente nel campione) e quella da NS (24(S)OH-C rimasto in forma libera, dopo incubazione con l'enzima). Il risultato dell'esperimento, condotto in triplicato, indica che  $54,1 \pm 2,3\%$  di 24(S)OH-C è stato convertito in 24(S)OH-CE durante l'incubazione con LPDS e proteoliposomi.

#### 4.2 Analisi di massa del prodotto di esterificazione fluorescente di 24(S)OH-C

Il picco di materiale fluorescente, eluito per HPLC a 6,6 min (come descritto nel paragrafo precedente), è stato raccolto ed analizzato tramite spettrometria di massa, per poter confermare la presenza di 24(S)OH-C esterificato e per identificare il prodotto della reazione con LCAT come mono- o di-estere. Questa analisi ha dimostrato che la massa del materiale fluorescente è 663,3 u, in accordo con la forma protonata del monoestere risultante dalla formazione dell'addotto tra 24(S)OH-C ed acido esanoico fluorescente, con sottrazione di una molecola di  $H_2O$  ( $[M+H-H_2O]^+$ ), come mostrato in Fig. 8.

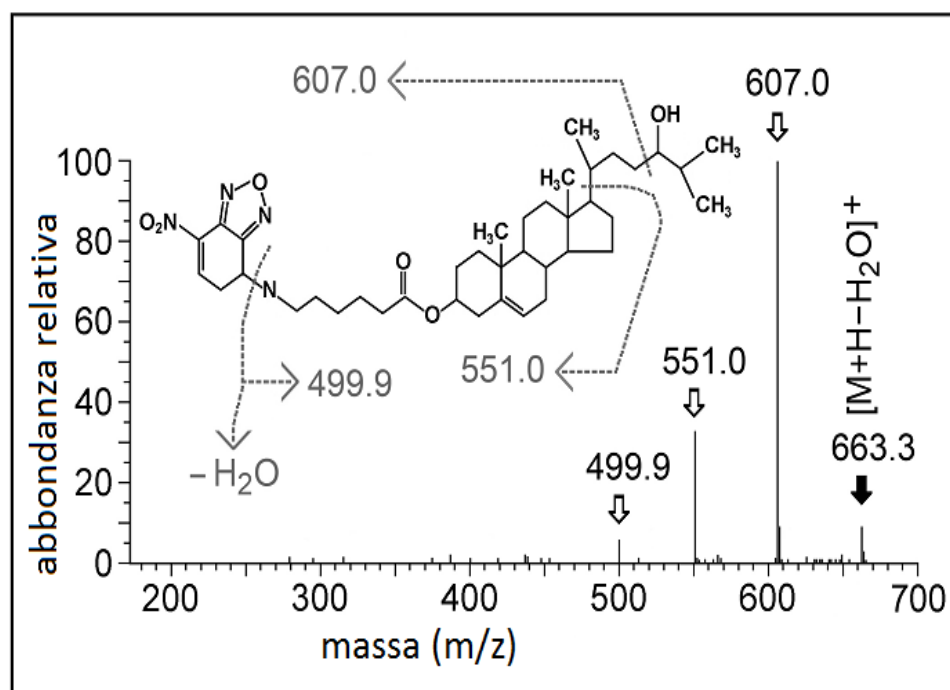


Figura 8 – Analisi MS dei prodotti di esterificazione di 24(S)OH-C con l'acido NBD-esanoico

La frammentazione di questo monoestere ha prodotto segnali compatibili con la struttura in cui solo il gruppo 3 $\beta$ -idrossile del 24(S)OH-C è risultato legato alla catena acilica col fluoroforo NBD, dimostrando che tale specifico monoestere rappresenta l'unico prodotto della reazione di esterificazione di 24(S)OH-C. Inoltre, l'analisi di frammentazione ha evidenziato che lo ione  $[M+H-H_2O]^+$  ha perso parte della catena laterale dell'ossisterolo (da C-24 a C-27), con produzione di un frammento di 607,0 u, che è compatibile con la formazione di un doppio legame carbonio-carbonio nella restante parte della catena laterale. Un frammento di 551,0 u risulta, invece, compatibile con la perdita completa della catena laterale dell'ossisterolo e con la formazione di un doppio legame carbonio-carbonio sul ciclopentano. Per confermare questi risultati, una miscela di reazione, simile a quella usata per preparare il monoestere fluorescente ma contenente proteoliposomi con ApoA-I e fosfatidilcolina naturale, è stata incubata per 5 h e, poi, i lipidi sono stati estratti e infine frazionati per HPLC, usando lo spettrometro di massa come rivelatore ed analizzatore delle molecole eluite (Fig. 9).

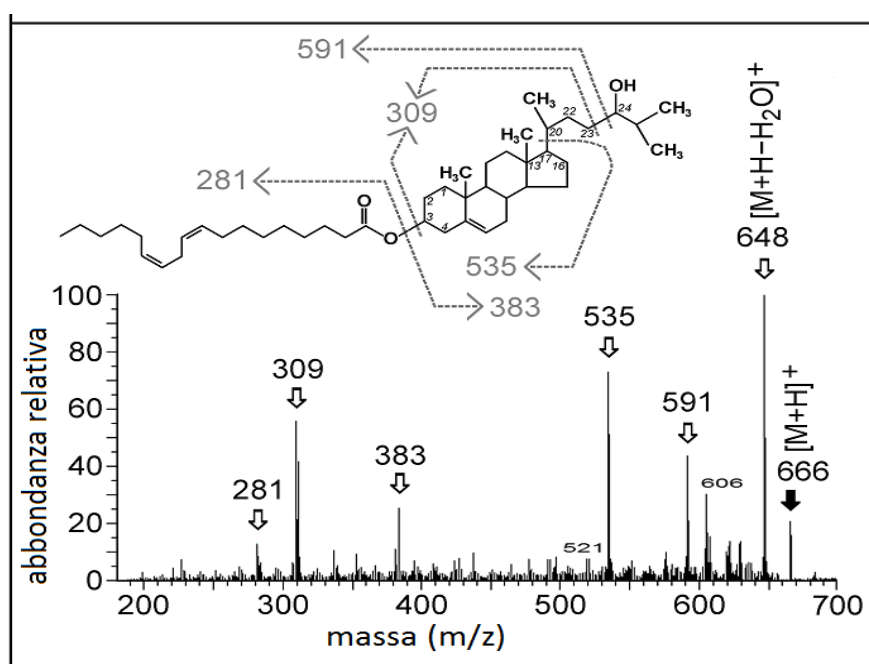


Figura 9 – Analisi MS del monoestere linoleico di 24(S)OH-C

Lo spettro di massa indica che, anche in questo caso, il picco base era  $[M+H-H_2O]^+$ , corrispondente al monoestere linoleico deprivato di una molecola di acqua (648 u). La frammentazione di questo monoestere ha confermato la rottura del legame tra C-23 e C-24 dell'ossisterolo, con perdita di una molecola di acqua e formazione di un doppio legame terminale sul risultante frammento di 591 u. Come nella frammentazione del monoestere fluorescente, anche in questo caso si è osservato un segnale a 535 u, compatibile con la perdita completa della catena laterale dell'ossisterolo e con la formazione di un doppio legame carbonio-carbonio sul ciclopentano. Frammenti di 309 u e 281 u sono compatibili, rispettivamente, col nucleo tetraciclico steroideo e con l'acido linoleico. Anche in questo caso, frammenti riconducibili al legame tra il gruppo acilico (ovvero linoleico, nella fattispecie) e l'ossidrile sul C-24 dell'ossisterolo non sono stati trovati. L'assenza di tali frammenti conferma che la catena acilica, nel monoestere, è legata soltanto all'anello A dell'ossisterolo (cioè sull'atomo di ossigeno legato a C-3).

#### ***4.3 Esterificazione di 24(S)OH-C da parte di LCAT: confronto tra la stimolazione enzimatica da parte di ApoA-I e quella da parte di ApoE***

L'esterificazione di 24(S)OH-C è stata prodotta incubando 24(S)OH-C triziato ( $^3\text{H}$ -24(S)OH-C) con LPDS (come fonte di LCAT) e con una sospensione di proteoliposomi contenenti ApoA-I o ApoE (come stimolatori dell'attività enzimatica). Dopo l'incubazione, i lipidi sono stati estratti e, poi, frazionati tramite TLC. Sia  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C che i suoi esteri ( $^3\text{H}$ -24(S)OH-CE) sono stati isolati e la radioattività è stata misurata mediante analisi allo scintillatore. I dati ottenuti hanno confermato l'avvenuta esterificazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, con un aumento della quantità di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-CE all'aumentare del tempo di incubazione e con un effetto di stimolazione di LCAT maggiore da parte di ApoA-I rispetto ad ApoE (Fig. 10). In una miscela di controllo, LPDS è stato preincubato con l'anticorpo anti-LCAT prima dell'aggiunta di proteoliposoma e  $^3\text{H}$ -



24(S)OH-C. Le miscele contenenti soltanto  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C e proteoliposoma o soltanto  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C ed LPDS sono state incubate, come controlli, e poi analizzate. In tutti i controlli,  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C non è risultato esterificato, a conferma del fatto che l'esterificazione richiede la presenza sia di LCAT, sia di fosfolipidi (come donatori di catena acilica), sia di una apolipoproteina stimolatrice dell'attività enzimatica. Il fatto che proprio LCAT, in LPDS, fosse l'enzima esterificante, è stato dimostrato (come nel caso, precedentemente descritto, della produzione di esteri fluorescenti) dal fatto che l'esterificazione non è avvenuta in presenza di anticorpi specifici anti-LCAT.

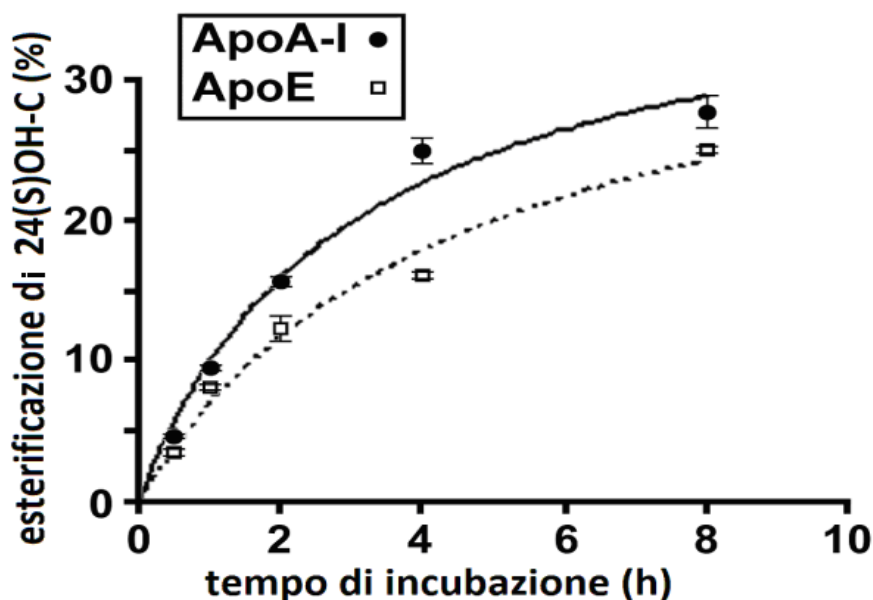


Figura 10 – Confronto dell'efficienza dei due principali attivatori di LCAT (ApoA-I ed ApoE) nella stimolazione dell'esterificazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C. ApoA-I: cerchi; ApoE:quadrati. I dati sono espressi come medie  $\pm$  SD da tre esperimenti indipendenti.

Per valutare i parametri cinetici  $K_m$  e  $V_{max}$  della reazione di LCAT con  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, sono state incubate quantità diverse di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C con LPDS e con proteoliposomi contenenti ApoA-I o ApoE. Dopo estrazione lipidica e TLC, è stata determinata la percentuale di esterificazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, sotto stimolazione delle due diverse apolipoproteine, per ogni concentrazione del substrato. I valori di  $K_m$  sono stati calcolati

dalla relazione fra concentrazione di substrato e attività enzimatica, in presenza di ApoA-I o di ApoE. I dati della cinetica sono stati inseriti direttamente nell'equazione Michaelis-Menten usando la regressione non lineare, utilizzando il software GraphPad Prism 5 per ottenere valori più accurati di  $K_m$  e  $V_{max}$ . I dati sono stati espressi graficamente con il metodo di Lineweaver-Burk (Fig. 11).

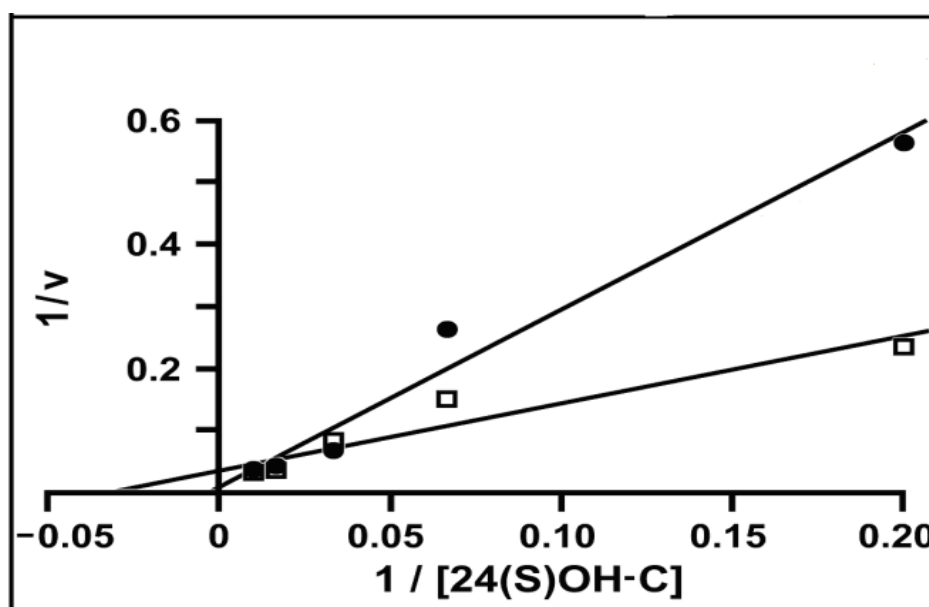


Figura 11- Metodo dei doppi reciproci (Lineweaver-Burk) per determinare i valori di  $K_m$  e  $V_{max}$  di LCAT per 24(S)OH-C sotto stimolazione di ApoA-I (cerchi) o di ApoE (quadrati).

In particolare, nelle condizioni sperimentali usate, sono stati trovati valori di  $K_m$  pari a 124,4  $\mu\text{M}$  ( $N=5$ ;  $r^2=0,9867$ ) in presenza di ApoA-I e 419,5  $\mu\text{M}$  ( $N=5$ ;  $r^2=0,9694$ ) in presenza di ApoE, che indicano che ApoA-I stimola l'esterificazione in vitro dell'ossisterolo meglio di ApoE. I valori di  $V_{max}$  sono risultati 80,9 e 202,4 per l'attività stimolata, rispettivamente, di ApoA-I e ApoE.

#### 4.4 Saggio di esterificazione del colesterolo in presenza di 24(S)OH-C

La capacità di 24(S)OH-C di competere con C per l'attività di LCAT è stata analizzata per confermare che proprio LCAT (unico enzima capace di esterificare C) esterifica 24(S)OH-

C. La competizione tra i due substrati è stata fatta incubando proteoliposomi, contenenti 1  $\mu\text{M}$  ApoA-I e 0,2  $\mu\text{M}$  C triziato ( $^3\text{H-C}$ ), con LPDS e quantità variabili di 24(S)OH-C (da 0 a 100  $\mu\text{M}$ ). Dopo incubazione, estrazione lipidica e TLC, è stata calcolata la percentuale di esterificazione di  $^3\text{H-C}$  nelle varie condizioni di concentrazione di 24(S)OH-C (Fig. 12).

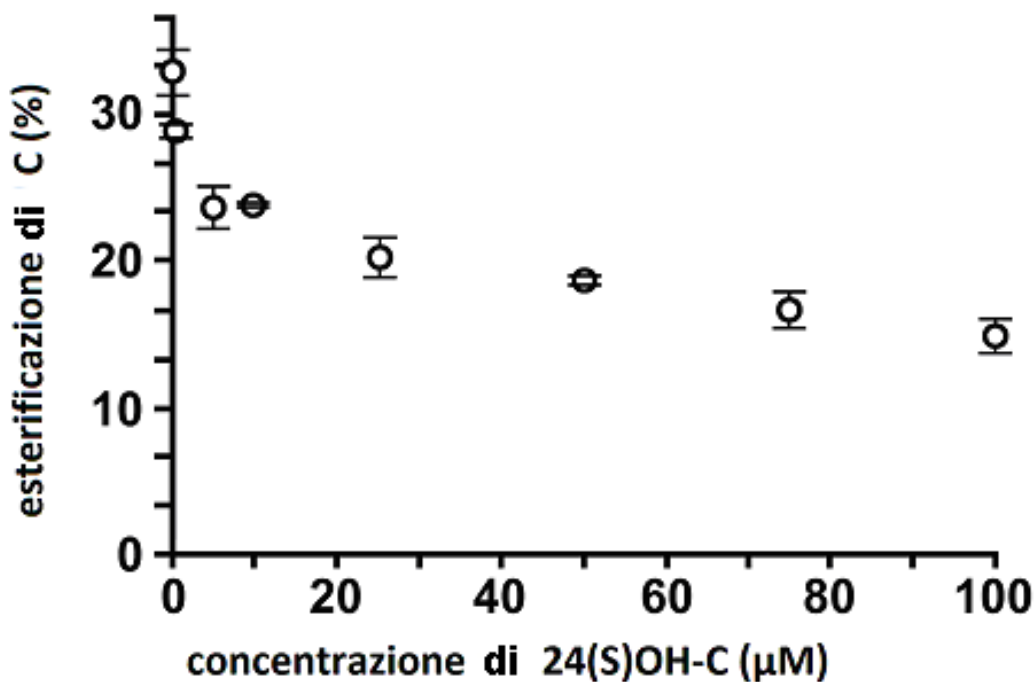


Figura 12– Competizione di 24(S)OH-C e  $^3\text{H-C}$  per l'attività di LCAT

Come mostrato in figura, l'esterificazione di  $^3\text{H-C}$  è risultata ridotta ( $p < 0,01$ ) al 76,3%, 75%, 64,6%, 60,2 o 44,2% in presenza di 5, 10, 25, 50 o 100  $\mu\text{M}$  24(S)OH-C rispettivamente. La capacità dell'enzima di esterificare  $^3\text{H-C}$  è risultata dimezzata in presenza di 75  $\mu\text{M}$  24(S)OH-C ( $p = 0,003$ ), ovvero in presenza di un eccesso molare (375 volte) di 24(S)OH-C su  $^3\text{H-C}$ . Il risultato indica chiaramente che 24(S)OH-C e C competono per l'attività di LCAT; sembra che LCAT mostri un'affinità più alta per C, nelle condizioni sperimentali utilizzate.

#### 4.5 Inibizione dell'attività di LCAT in presenza di Hpt

Studi precedenti (Spagnuolo *et al.* 2005; Cigliano *et al.* 2009) hanno dimostrato che alti livelli di Hpt limitano la disponibilità di ApoA-I e ApoE per la stimolazione di LCAT nell'esterificazione di C. E' ipotizzabile, dunque, che anche l'esterificazione di 24(S)OH-C, da parte di LCAT, sia inficiata dalla presenza di alti livelli di Hpt. A tale scopo, sono stati condotti esperimenti in cui 15  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -24(S)OH-C è stato incubato con proteoliposomi contenenti 0,5  $\mu\text{M}$  ApoA-I, in presenza di diverse quantità di Hpt (da 1 a 10  $\mu\text{M}$ ; rapporto molare Hpt/ApoA-I: 2, 5, 15, o 20). L'esterificazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C è risultata significativamente inibita con l'incremento del rapporto Hpt/ApoA-I (Fig. 13).

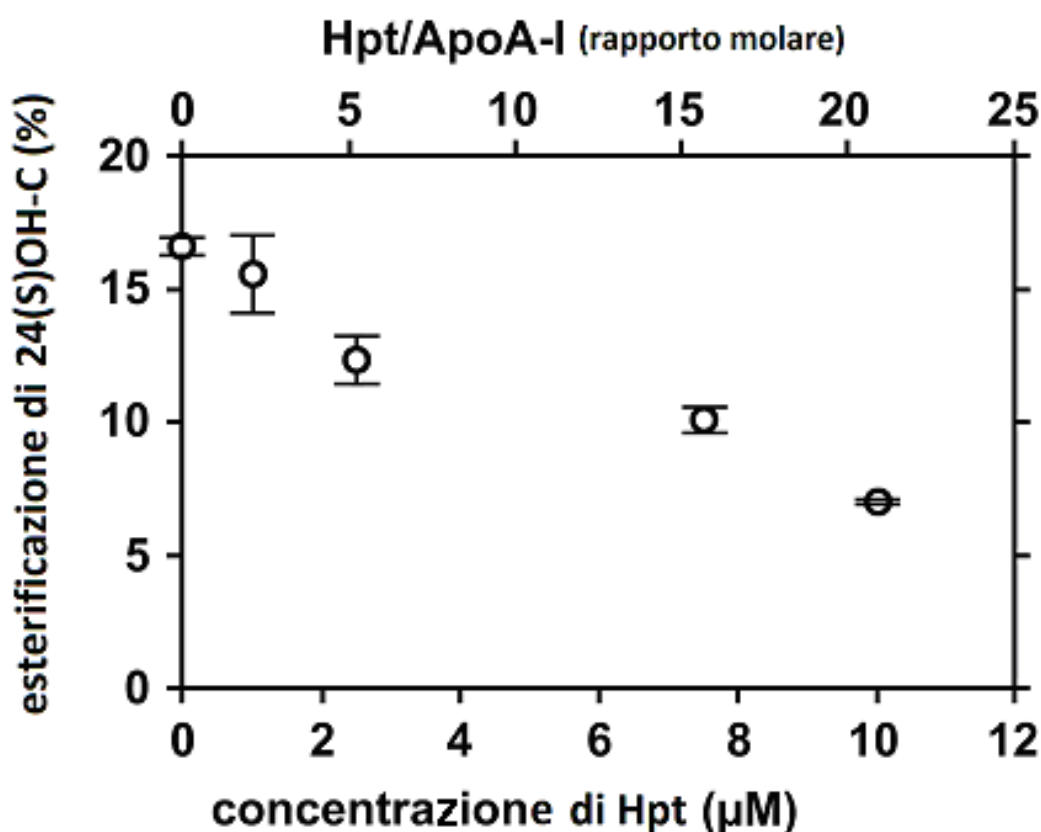


Figura 13 - Effetto di Hpt sull'esterificazione di 24(S)OH-C.

In particolare, 2,5, 7,5 o 10  $\mu\text{M}$  Hpt hanno rispettivamente ridotto la percentuale di esterificazione del 26% ( $p < 0,05$ ), 39% ( $p < 0,005$ ) o 58% ( $p < 0,005$ ). I dati indicano che

Hpt, quando presente in concentrazioni simili a quelle che si riscontrano durante la fase acuta dell'inflammazione, inficia l'effetto stimolatorio di ApoA-I su LCAT, riducendo drasticamente l'esterificazione di 24(S)OH-C. Si può, dunque, ipotizzare che l'aumento delle concentrazioni di Hpt nel cervello (ovvero nel fluido interstiziale di specifiche regioni cerebrali) possa riflettersi nell'accumulo di 24(S)OH-C in tale compartimento anatomico.

#### ***4.6 Influenza dello stress ossidativo sull'attività di LCAT***

LCAT è un noto bersaglio di specie ossidanti (Bielicki et al., 1995 (a); Graham et al., 1998; Bielicki et al., 1999; Chen and Loo, 1995; Bielicki et al., 1995 (b); Wang et al., 2000), capaci di degradarne struttura e funzione. Alcuni esperimenti sono stati fatti per valutare l'attività di LCAT su 24(S)OH-C in condizioni di stress ossidativo. In particolare, l'enzima è stato trattato a 30°C per 20 min con una miscela di ossidazione, basata sulla reazione di Fenton, costituita da 150 µM CuCl<sub>2</sub>, 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 µM acido ascorbico. L'ossidazione è stata, poi, bloccata con l'aggiunta di 1 mM acido ascorbico; quindi, alla miscela sono stati aggiunti 20 µM <sup>3</sup>H-24S-C e proteoliposomi contenenti ApoA-I. Dopo incubazione di 3 h a 37°C, l'attività di LCAT è stata analizzata sia nella miscela sottoposta a ossidazione, sia in due miscele di controllo, costituite cioè da LPDS preincubato in assenza della miscela di ossidazione e da LPDS aggiunto alla miscela, insieme a 20 µM <sup>3</sup>H-24S-C e proteoliposomi, dopo il blocco dell'ossidazione con acido ascorbico. Il risultato indica una netta riduzione dell'attività di esterificazione quando l'enzima è sottoposto a stress ossidativo (Fig. 14), e permette di affermare che LCAT, quando ossidato da fattori presenti nel CSF, perde gran parte della sua attività di esterificazione di 24(S)OH-C.

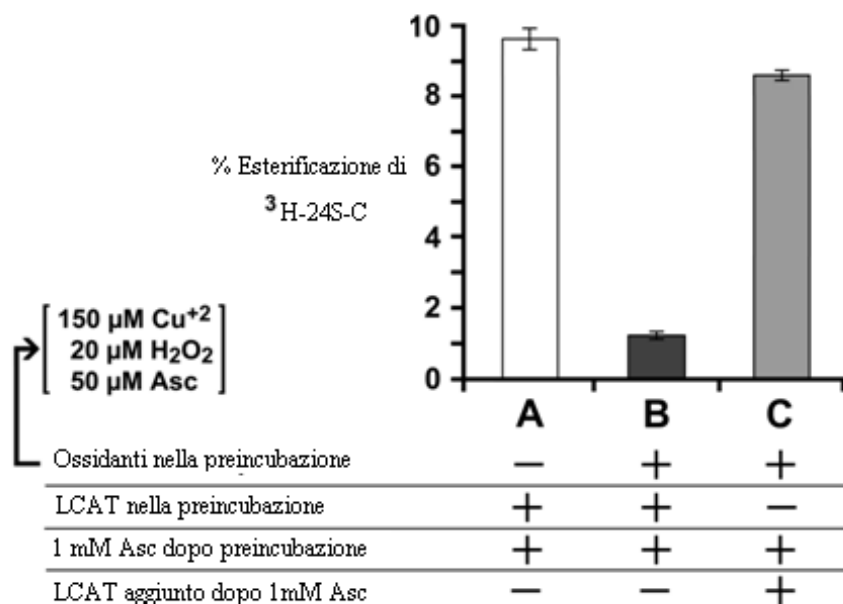
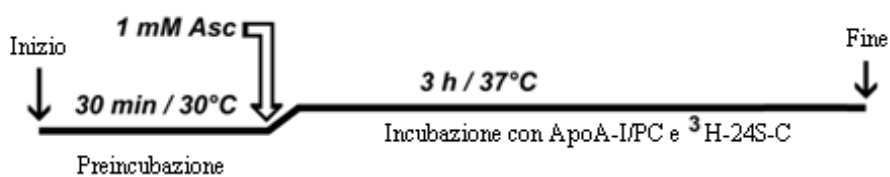


Figura 14- Attività di LCAT su 24(S)OH-C in condizioni senza stress ossidativo (A) o con stress ossidativo (B). La barra C rappresenta l'esterificazione prodotta da LCAT, aggiunto assieme a proteoliposomi e  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, dopo aver bloccato lo stress ossidativo con 1 mM acido ascorbico.

#### 4.7 Analisi ex vivo: esterificazione di 24(S)OH-C nel CSF

Una miscela di CSF (N=3) di soggetti sani è stata supplementata con  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C e, poi, incubata in presenza o in assenza di anticorpo anti-LCAT, al fine di verificare che l'esterificazione di 24(S)OH-C avvenisse con tutti i fattori (inclusi LCAT e proteoliposomi) presenti nel fluido nativo. I risultati della TLC e dell'analisi allo scintillatore delle miscele, incubate da 2 a 16 h, hanno evidenziato che tutto il macchinario biochimico necessario all'esterificazione di 24(S)OH-C è presente nel CSF (Fig. 15).

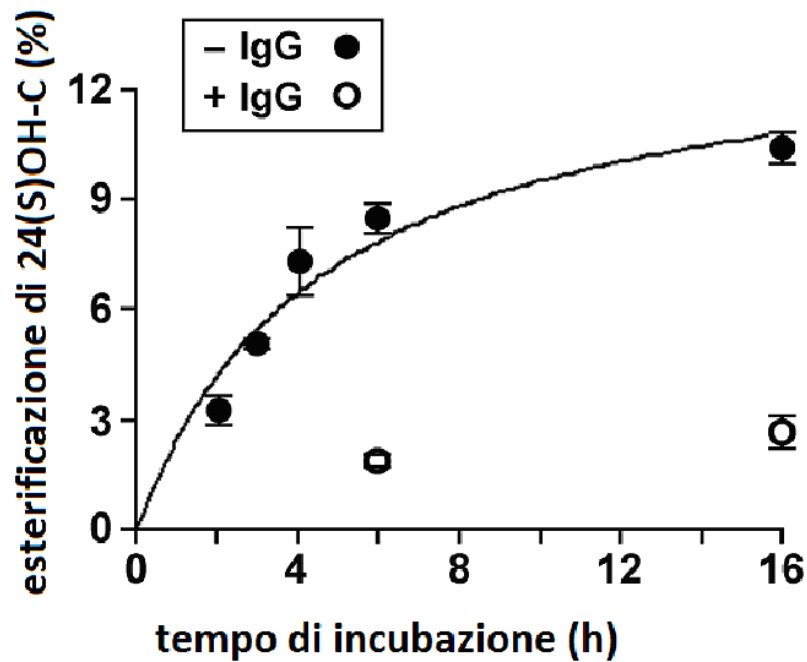


Figura 15– Cinetica di esterificazione di 24(S)OH-C nel CSF di individui sani in presenza (cerchi bianchi) o in assenza (cerchi neri) di anticorpo specifico anti-LCAT.

In particolare,  $10.5 \pm 2.68\%$  di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C è risultato esterificato dopo 16 h di incubazione. Questa percentuale, relativamente bassa, di esterificazione può essere attribuita al fatto che, nel campione di CSF analizzato, la maggior parte di 24(S)OH-C presente nel fluido si trovasse già associato alle lipoproteine del CSF in forma esterificata. Tuttavia, la limitata esterificazione in una miscela di controllo, contenente l'anticorpo anti-LCAT, indica inequivocabilmente che, durante l'incubazione, parte di 24(S)OH-C libero è stato esterificato da LCAT presente nel CSF.

#### 4.8 Valutazione dell'effetto tossico di 24(S)OH-C su cellule SH-SY5Y

L'effetto neurotossico di 24(S)OH-C su cellule SH-SY5Y, precedentemente dimostrato da alcuni studi (Kölsch et al. 1999, 2001; Yamanaka et al. 2011), è stato confermato incubando le cellule con diverse quantità di 24(S)OH-C per 5 h, come mostrato in fig.16.

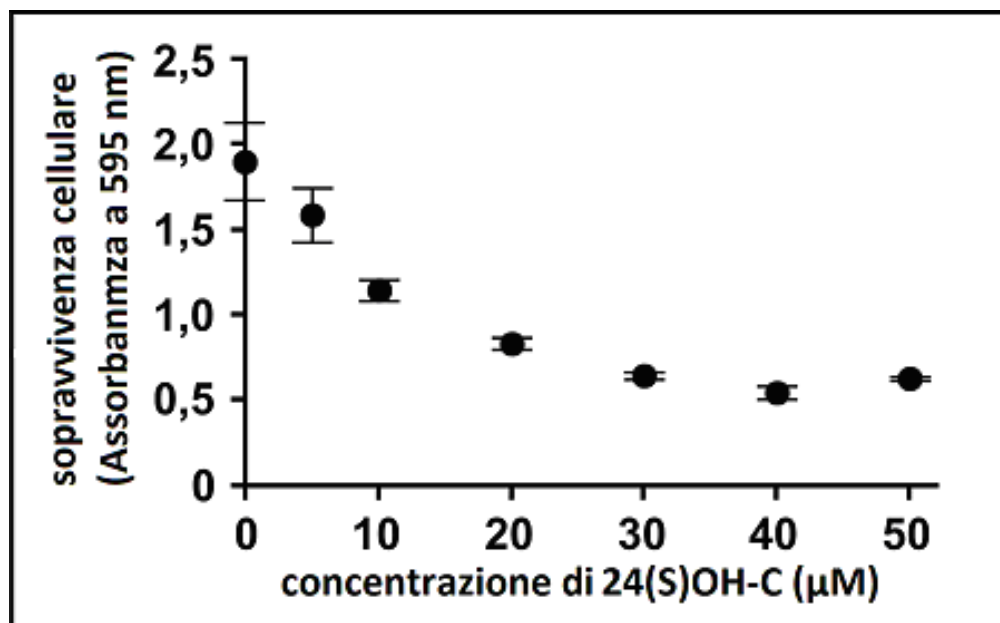


Figura 16– Sopravvivenza di cellule SHSY-5Y trattate con concentrazioni crescenti di 24(S)OH-C per 5 h. La vitalità cellulare è stata saggiata mediante CVS (come descritto in Metodi).

Il trattamento con 10 o 20 µM 24(S)OH-C ha ridotto la vitalità cellulare a 58% ( $p < 0,05$ ) o a 43% ( $p < 0,01$ ) rispettivamente. La concentrazione 20 µM è stata scelta per i successivi esperimenti con LPDS (come fonte di LCAT) in terreno di coltura. In particolare, 20 µM  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, incubato con LPDS (3 mg/mL) e proteoliposomi con ApoA-I (2 µM ApoA-I nella miscela di reazione), ha raggiunto la sua massima esterificazione ( $49,3 \pm 2,9\%$ ) dopo 5 h a 37°C. Questo tempo di incubazione è stato, quindi, utilizzato per valutare la sopravvivenza delle cellule messe a contatto con  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, preincubato in presenza o in assenza di LPDS e proteoliposomi con ApoA-I. L'analisi della vitalità cellulare, effettuata tramite il saggio CVS, ha evidenziato una differenza significativa ( $p < 0,0001$ ) fra cellule trattate con  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C preincubato con LCAT più proteoliposomi e cellule trattate con solo  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C. In particolare, 38% delle cellule è sopravvissuto al trattamento per 5 h con 20 µM  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C, mentre 68% è sopravvissuto al trattamento per 5 h con 20 µM  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C previamente incubato con LPDS e proteoliposomi per 5 h (Fig. 17, Fig. 18).



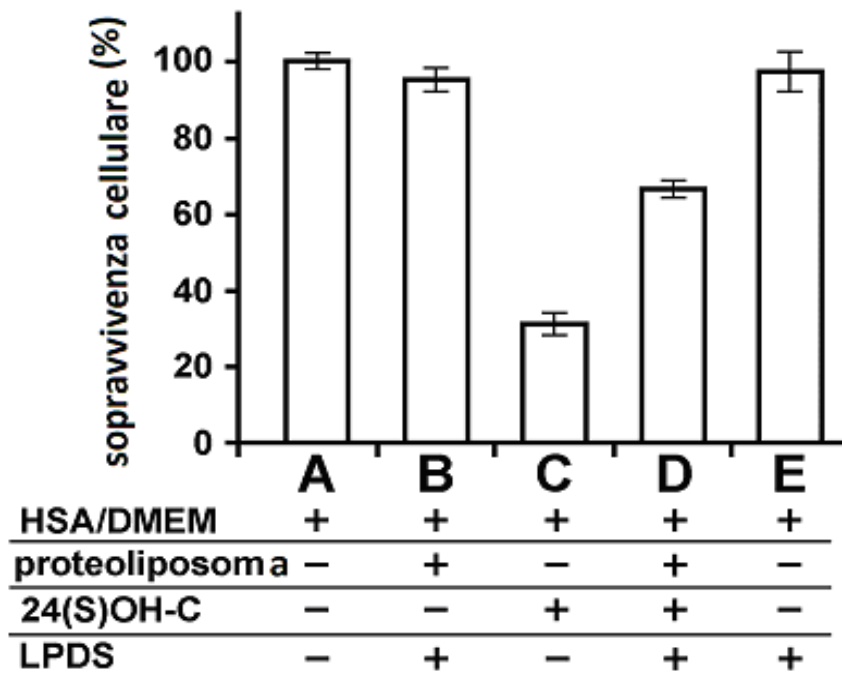


Figura 17- Sopravvivenza delle cellule trattate con 24(S)OH-C preincubato (barra D) o non preincubato (barra C) con LPDS e proteoliposomi. La composizione delle miscele di reazione A, B, C, D e E è indicata nella tabella sottostante l'istogramma.

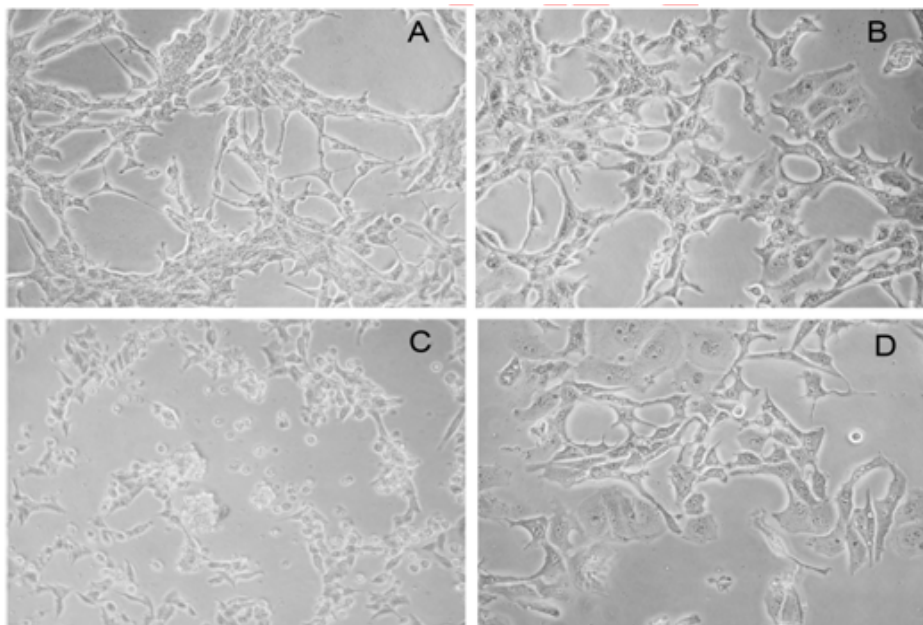


Figura 18- Immagini di microscopia ottica (ingrandimento: 10 x 20) delle cellule incubate con solo terreno di coltura (A), oppure con terreno contenente LCAT e proteoliposomi con ApoA-I e PC (B), con 20  $\mu$ M 24(S)OH-C (C) o con 20  $\mu$ M 24(S)OH-C preincubato con LPDS e proteoliposomi (D). La composizione dei terreni è la stessa indicata nella tabella di Fig. 16.

Questo risultato suggerisce che LCAT, esterificando 24(S)OH-C, lo converte in una forma meno tossica per le cellule. Si può ipotizzare che 24(S)OH-CE, così come gli esteri del colesterolo, siano “intrappolati” nel *core* delle lipoproteine (ovvero dei proteoliposomi presenti nelle miscele di reazione) per via della loro natura idrofobica. Questo processo avrebbe dimezzato, negli esperimenti, la concentrazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C disponibile ad attraversare la membrana plasmatica delle cellule, riducendone, così, la tossicità.

#### ***4.9 Analisi dell'incorporazione di 24(S)OH-C e di 24(S)OH-CE in cellule SH-SY5Y***

Sono stati condotti esperimenti per analizzare la quota di 24(S)OH-C che viene incorporato nelle cellule, sia in forma libera che in forma esterificata. Dopo una preincubazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C per 5 h in terreno di coltura, in presenza o assenza di LPDS e proteoliposomi (con 2  $\mu\text{M}$  ApoA-I nelle miscele di reazione), le miscele sono state messe a contatto con le cellule differenziate. Il terreno, rimosso dalle cellule a tempi diversi, è stato analizzato per il contenuto di radioattivo, così come le cellule trattate, che sono state lisate e analizzate allo scintillatore. La percentuale di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C incorporato è stata calcolata come rapporto fra radioattività (dpm) rilevata nei lisati e radioattività (dpm) totale, cioè la somma della radioattività presente nel lisato e di quella nel terreno. Il risultato dell'esperimento indica che l'incorporazione dell'ossisterolo da parte delle cellule è aumentata durante le prime due ore di incubazione, per poi raggiungere una fase di *plateau*. L'incorporazione di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C nelle cellule è risultata, ad ogni tempo di incubazione, nettamente più bassa quando l'ossisterolo è stato previamente incubato con LCAT e proteoliposomi. In dettaglio,  $5,3 \pm 0,4\%$  o  $13,5 \pm 0,4\%$  ( $p=0,0007$ ) di  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C totale, rispettivamente dalle miscele preincubate o non preincubate con LPDS e proteoliposomi, è stato incorporato dalle cellule dopo 4 h di incubazione (fig. 19).

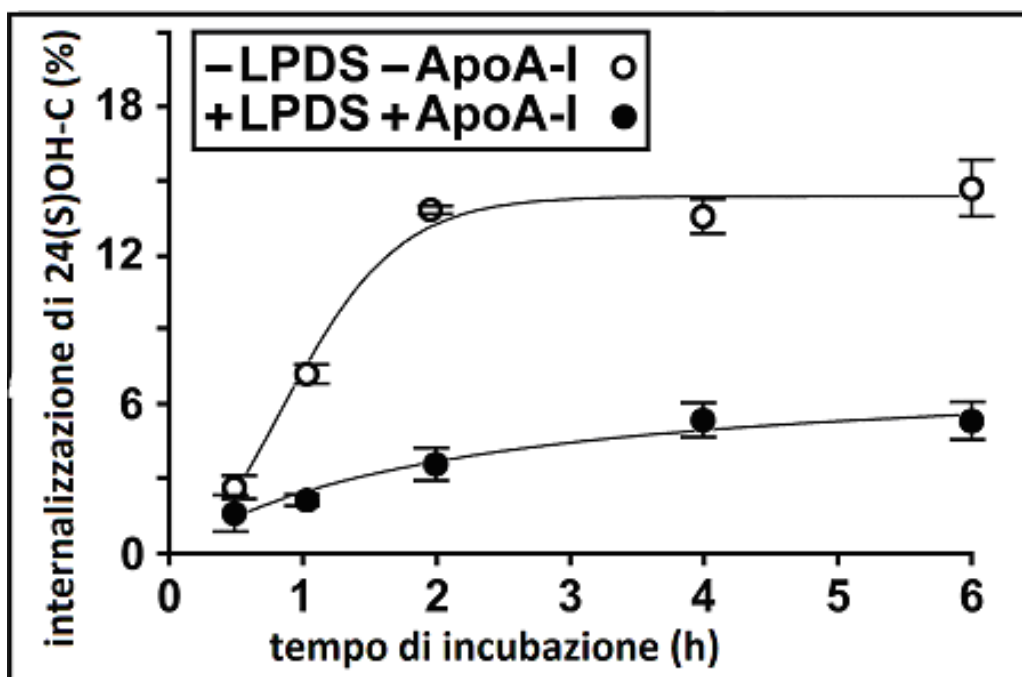


Figura 19- Incorporazione di  $^{24}\text{(S)OH-C}$ , preincubato per 5 h con (cerchi neri) o senza (cerchi bianchi) LPDS e proteoliposomi, in cellule SH-SY5Y.

Non sono emerse differenze significative, invece, fra l'incorporazione di  $^3\text{H-}^{24}\text{(S)OH-C}$  da solo o di  $^3\text{H-}^{24}\text{(S)OH-C}$  preincubato con solo LPDS (dati non mostrati). Questo risultato indica che la presenza dell'enzima e dello stimolatore ApoA-I (assieme alla disponibilità di donatori di catene aciliche, cioè i fosfolipidi del proteoliposoma) rappresentano una condizione necessaria per la produzione di  $^{24}\text{(S)OH-CE}$  e, di conseguenza, per la riduzione dell'effetto tossico di  $^{24}\text{(S)OH-C}$  sui neuroni.

#### ***4.10 Analisi dell'incorporazione degli esteri di $^{24}\text{(S)OH-C}$ , inglobati in proteoliposomi isolati per gel filtrazione, in cellule SH-SY5Y***

Per dimostrare che la forma esterificata di  $^{24}\text{(S)OH-C}$  (cioè  $^{24}\text{(S)OH-CE}$ ) non fosse tossica e non entrasse nelle cellule, sono stati allestiti degli esperimenti mirati dapprima ad isolare i proteoliposomi, contenenti  $^3\text{H-}^{24}\text{(S)OH-CE}$ , da una miscela di reazione e, successivamente, a trattare con questi proteoliposomi le cellule SH-SY5Y differenziate. I proteoliposomi marcati, derivanti da incubazione di  $^3\text{H-}^{24}\text{(S)OH-C}$  con LPDS e

proteoliposomi (composti da fosfatidilcolina ed 2  $\mu\text{M}$  ApoA-I) per 8 h a 37°C, sono stati isolati, per gel filtrazione, da  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C libero o legato all'albumina presente nella miscela di reazione (Fig. 20).

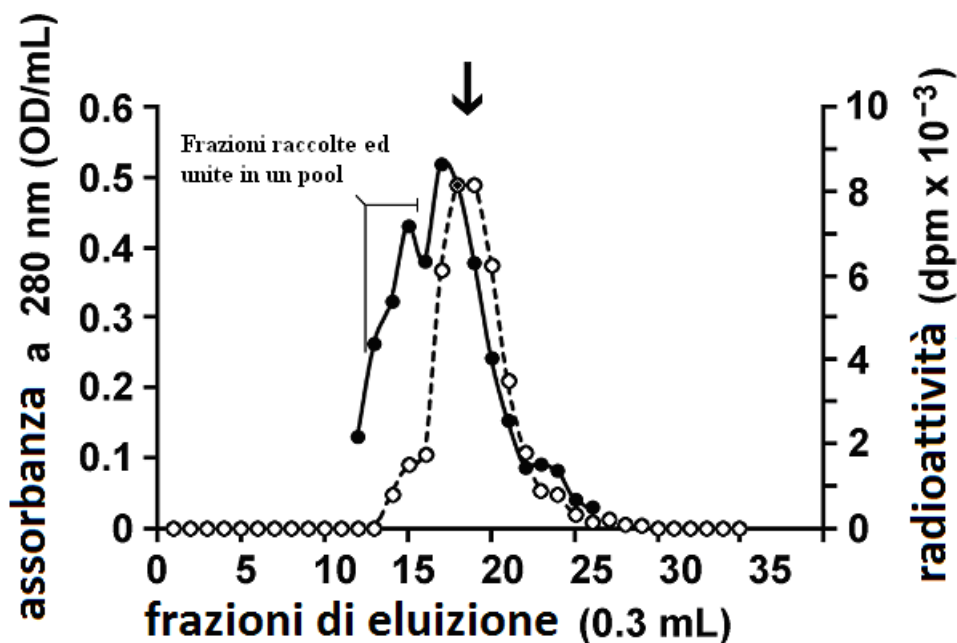


Figura 20- Eluizione dei proteoliposomi, previamente marcati per incubazione con  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C nella miscela di esterificazione, da colonna di Sephacryl S-200 ( $1.5 \times 11$  cm). Il monitoraggio del materiale eluito è stato effettuato sia tramite misura dell'assorbanza a 280 nm, che tramite misura della radioattività. Le frazioni con il maggiore rapporto tra radioattività (cerchi neri) ed assorbanza (cerchi bianchi), contenenti i proteoliposomi, sono indicate. La freccia segnala l'eluizione dell'albumina, come indicata da una cromatografia di controllo con sola albumina e  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C.

I proteoliposomi, così isolati, sono stati usati per trattare le cellule differenziate come descritto in precedenza. Dall'analisi della radioattività, presente nel terreno rimosso dalle cellule e nei lisati cellulari, è emerso che  $^3\text{H}$ -24(S)OH-CE non è stato incorporato nelle cellule. La radioattività ( $3700 \pm 177$  dpm), infatti, è risultata presente solo nei terreni con cui le cellule sono state trattate e che sono stati rimossi dopo incubazione di 5 h. Analizzando la vitalità cellulare (mediante CVS) nelle varie condizioni, inoltre, non sono emerse differenze significative fra le cellule trattate con i proteoliposomi marcati e le cellule di controllo ( $96,8 \pm 3,2\%$  vs  $100 \pm 3,4\%$  di sopravvivenza, rispettivamente). Gli stessi risultati, ottenuti incubando le cellule con miscele contenenti proteoliposomi preparati con

ApoA-I, sono stati ottenuti anche preparando miscele di reazione contenenti proteoliposomi con ApoE come stimolatore dell'enzima (dati non mostrati).

Questi esperimenti suggeriscono che  $^3\text{H}$ -24(S)OH-CE, intrappolato all'interno delle lipoproteine, sia confinato all'ambiente extracellulare, non inficiando in alcun modo la vitalità cellulare. Si può supporre, quindi, che LCAT sia in grado di "detossificare" 24(S)OH-C mediante la sua esterificazione, e che gli esteri inglobati nei proteoliposomi siano del tutto innocui per i neuroni in coltura.

#### ***4.11 Analisi dell'attività di LCAT nei campioni di CSF e plasma di individui controllo e pazienti affetti da malattie neurodegenerative***

L'ipotesi che l'efficienza di LCAT sia più bassa nei pazienti con malattie neurodegenerative è stata avvalorata da analisi condotte su campioni di plasma e CSF di soggetti sani (controllo) e pazienti affetti da malattie neurodegenerative (AD, SLA), processati come descritto dettagliatamente in Metodi. In breve, ciascun campione biologico è stato supplementato con 24(S)OH-C deuterato (come standard interno) e, poi, diviso in due aliquote, di cui una (denominata S) è stata sottoposta a saponificazione e l'altra (denominata NS) no: da entrambe le aliquote è stata estratta la componente lipidica mediante esano, per il successivo frazionamento degli ossisteroli dai lipidi meno polari, che è stato ottenuto tramite estrazione in fase solida (SPE). UPLC, con rilevazione (mediante spettrometria di massa) del materiale eluito, ha permesso l'isolamento del 24(S)OH-C dalla miscela di ossisteroli. L'ammontare dell'esterificazione, in ogni campione, è stato calcolato come differenza fra la quantità di 24(S)OH-C rilevata nell'aliquota S (che rappresenta il 24(S)OH-C totale presente nel campione al momento del prelievo) e la quantità di 24(S)OH-C nell'aliquota NS dello stesso campione (cioè la quantità di 24(S)OH-C non esterificato presente nel campione al momento del prelievo). I dati ottenuti, normalizzati usando lo standard interno, sono stati espressi come rapporto

24(S)OH-CE/24(S)OH-C (Fig. 21). In particolare, il rapporto 24(S)OH-CE/24(S)OH-C è risultato  $1,18 \pm 0,22$  e  $0,73 \pm 0,23$  rispettivamente nel CSF dei pazienti SLA e AD, e  $2,15 \pm 0,25$  nel CSF dei controlli, con differenze altamente significative ( $P < 0,0001$ ) fra malati e controlli. Dall'analisi dei campioni di plasma degli stessi individui, il rapporto 24(S)OH-CE/24(S)OH-C è risultato  $1,86 \pm 0,36$  e  $0,86 \pm 0,18$  rispettivamente in SLA e AD e  $3,5 \pm 0,44$  nei controlli.

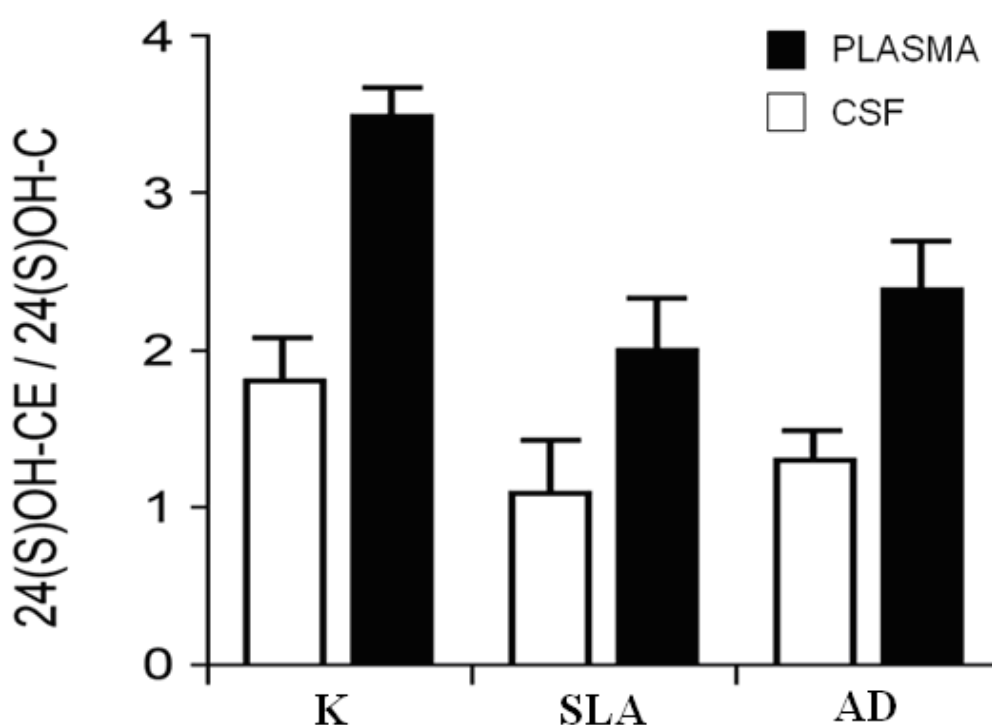


Figura 21- Rapporto 24(S)OH-CE/24(S)OH-C in campioni di plasma e CSF da pazienti SLA e AD e da soggetti sani (controllo: K).

I valori del rapporto 24(S)OH-CE/24(S)OH-C, individuati nei CSF e nei plasmi omologhi, mostrano una correlazione positiva ( $r=0,91$ ), rappresentata dall'equazione  $y = 1,669 x - 0,188$ , dove  $y$  rappresenta il rapporto nel plasma e  $x$  rappresenta quello nel CSF (Fig. 22).

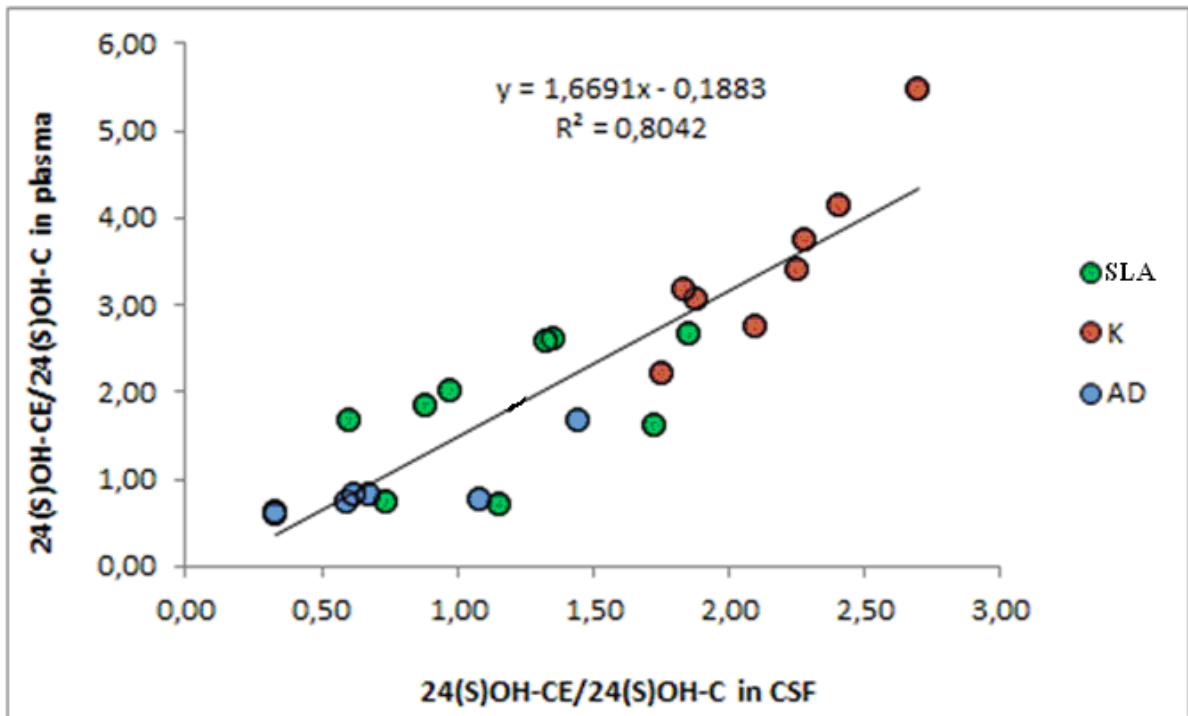


Figura 22 - Correlazione fra livelli degli esteri del 24(S)OH-C nel plasma e nel CSF da pazienti SLA e AD e da controlli (K)

La misura del livello di esterificazione nel plasma può, dunque, sostituire quella nel CSF per avere informazioni sull'attività di LCAT nel SNC. Il fatto che, nel plasma, il livello di esterificazione di 24(S)OH-C sia risultato superiore, per tutti i soggetti analizzati, rispetto al valore riscontrato nel CSF dipende, probabilmente, dall'attività della forma plasmatica di LCAT, che può contribuire ad incrementare il rapporto 24(S)OH-CE/24(S)OH-C. Tuttavia, questo incremento, del 62,0 , 17,9 e 62,3 % rispettivamente in soggetti con SLA, AD e nei controlli, non impedisce che sia stabilita una correlazione positiva tra rapporto 24(S)OH-CE/24(S)OH-C nel CSF e nel plasma per ciascun individuo.

Successivamente, sono stati analizzati 60 campioni di plasma (30 da controlli e 30 da pazienti AD). Dei pazienti si conoscevano età, sesso e indice MMSE (*Mini Mental State Examination*), che risulta tanto più basso quanto più grave è la compromissione delle abilità cognitive. Dalle analisi effettuate, il livello di 24(S)OH-CE nel plasma dei pazienti è risultato significativamente più basso di quello riscontrato nei soggetti sani. In particolare, nei pazienti di controllo,  $70,38 \pm 10,34$  % di 24(S)OH-C è risultato esterificato, mentre

soltanto  $35,06 \pm 14,45$  % di 24(S)OH-C è risultato esterificato nei campioni dai pazienti AD ( $p < 0.0001$ ). I risultati ottenuti hanno permesso di individuare una soglia di discriminazione, fra valore fisiologico e patologico, compresa fra 52 e 42% (Fig. 23).

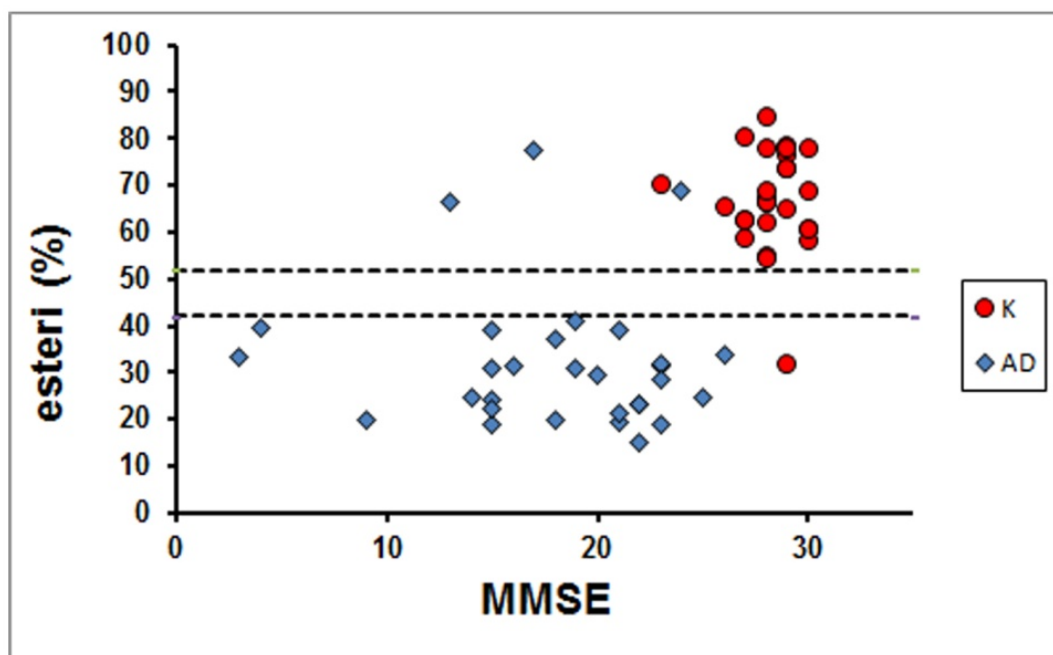


Figura 23- Livelli plasmatici degli esteri del 24(S)OH-C in campioni K (N=30) e AD (N=30) classificati in base all'indice MMSE.

Analizzando i dati con una matrice di confusione, che considera veri e falsi positivi (TP e FP) e veri e falsi negativi (TN e FN), è stato possibile calcolare che livelli plasmatici degli esteri inferiori a 42% diagnosticano AD con specificità  $>97\%$ , sensibilità  $>90\%$  e precisione  $>97\%$ . L'accuratezza, calcolata con la formula  $(TP+TN)/(TP+TN+TN+FN)$ , è risultata maggiore di 93% (Fig. 24).



		PAZIENTI CON ALZHEIMER		
		Condizione positiva	Condizione negativa	
24(S)OH-CE (%) Esito dello screening di campioni plasmatici	Esito positivo del test	Veri Positivi (TP) = 33	Falsi Positivi (FP) = 1	Valori predittivi positivi (precisione) = $TP / (TP + FP)$ = $33 / (33 + 1) = 0.9706$
	Esito negativo del test	Falsi Negativi (FN) = 4	Veri Negativi (TN) = 37	Valori predittivi negativi = $TN / (FN + TN)$ = $37 / (4 + 37) = 0.9024$
		Sensibilità = $TP / (TP + FN)$ = $33 / (33 + 4) = 0.8919$	Specificità = $TN / (FP + TN)$ = $37 / (1 + 37) = 0.9737$	

Figura 24- Matrice di confusione per la valutazione della sensibilità, specificità e precisione di una percentuale di 24(S)OH-CE, compresa tra 46 e 54%, come soglia di discriminazione tra pazienti AD e controlli. I valori trovati sono comunemente espressi in termini percentuali.

Un risultato interessante è emerso dall'analisi di campioni plasmatici di pazienti con lieve difficoltà cognitiva (MCI, *mild cognitive impairment*), condizione che si manifesta precocemente e che può precedere Alzheimer: i casi in cui la malattia effettivamente si sviluppa (generalmente da 1 a 5 anni dopo la manifestazione di MCI) con chiara sintomatologia AD, sono denominati *converter*; invece, i casi in cui la malattia non si sviluppa sono denominati *non-converter*. Analisi preliminari, effettuate su 10 campioni di soggetti MCI *converter* e 10 campioni di soggetti MCI *non-converter*, hanno evidenziato un livello di 24(S)OH-CE significativamente ( $p < 0,0005$ ) più basso nei *converter* rispetto ai *non converter*, con buoni valori di precisione (87,5%), accuratezza (83,3%), specificità (88,9%) e sensibilità (77,8%). Questo risultato è molto importante perché candiderebbe l'attività di LCAT come marcatore precoce di neurodegenerazione.

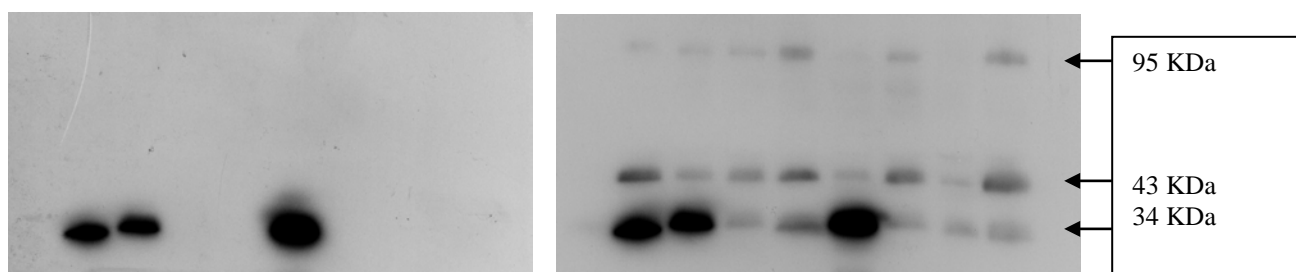
#### ***4.12 Analisi delle concentrazioni di Hpt, ApoA-I e ApoE in campioni da pazienti AD, SLA e da soggetti sani***

In tutti i campioni di CSF analizzati per il livello di 24(S)OH-CE, sono state anche titolate le proteine maggiormente coinvolte nel metabolismo di 24(S)OH-C, per comprendere se il deficit enzimatico fosse correlato ad una minore produzione dell'enzima in condizioni neurodegenerative o ad una ridotta espressione degli stimolatori di LCAT nel cervello (ApoA-I ed ApoE, la cui presenza è essenziale per un'adeguata attività enzimatica), o alla presenza di alti livelli di Hpt (compatibili con processi infiammatori in atto). I livelli di ApoE, ApoA-I e Hpt, misurati con procedura ELISA, non hanno mostrato differenze significative tra soggetti sani (N=8) e pazienti SLA (N=10) o AD (N=7). In dettaglio, la concentrazione trovata per ApoE è risultata  $2,03 \pm 1,18$ ,  $2,45 \pm 0,92$  e  $1,56 \pm 1,16$   $\mu\text{g/mL}$  rispettivamente nel CSF dei pazienti SLA, AD e nei controlli; per Hpt è stata trovata una concentrazione di  $2,45 \pm 0,92$   $\mu\text{g/mL}$  nel CSF di pazienti SLA,  $2,41 \pm 0,48$   $\mu\text{g/mL}$  nel CSF di pazienti AD e  $1,25 \pm 0,85$   $\mu\text{g/mL}$  nel CSF dei controlli; per ApoA-I, infine, i valori trovati erano  $7,77 \pm 3,45$ ,  $4,84 \pm 4,48$  e  $3,77 \pm 1,74$   $\mu\text{g/mL}$  rispettivamente in SLA, AD e nei controlli.

#### ***4.13 Analisi del fenotipo di ApoE nei campioni di plasma da pazienti AD e SLA e da soggetti sani***

Tecniche di elettroforesi ed *immunoblotting*, sui plasmi di pazienti AD, SLA e dei controlli, hanno permesso anche di individuare la presenza dell'allele *apoE4*, utilizzando un anticorpo che riconosce specificamente l'isoforma ApoE4 dell'apolipoproteina. Se presente in omozigosi, ApoE4 compare con un'unica banda elettroforetica (con migrazione compatibile col peso molecolare di 34 KDa), in condizioni denaturanti ma non riducenti. Le stesse membrane utilizzate per rivelare ApoE4 sono state, poi, reincubate con l'anticorpo che riconosce genericamente ApoE (cioè senza distinguere fra le tre isoforme): la comparsa di bande a pesi molecolari superiori (95 e 43 KDa, corrispondenti

rispettivamente a dimeri ApoE-ApoE ed a dimeri formati da ApoE ed ApoA-II) nei campioni in cui era già stato rilevato il segnale per ApoE4, hanno dimostrato che questi stessi campioni provenivano da individui eterozigoti ApoE4/ApoE3. Infatti questi dimeri e complessi si formano con aplotipi ApoE2 ed ApoE3, ma ApoE2 forma anche un trimero (con due molecole di ApoA-II, per un peso molecolare di 58 KDa), che non è stato rilevato. In particolare, un paziente SLA e due AD mostravano la presenza di ApoE4 (eterozigosi ApoE3/ApoE4). Neppure la presenza di ApoE4, dunque, sembra associata con i minori livelli di 24(S)OH-CE nei pazienti.



*Figura 25- Lastre di sviluppo di immunocomplessi chemiluminescenti presenti sulla stessa membrana, incubata prima con anticorpi anti-ApoE4 (lastra a sinistra) e poi con anticorpi anti-ApoE (lastra a destra). La presenza di bande da 43 KDa e 95 KDa in tutti i campioni, anche quelli risultati positivi per ApoE4, dimostra che tre campioni sono eterozigoti per ApoE4 (ApoE3/ApoE4).*

#### **4.14 Analisi della massa di LCAT nei CSF da pazienti AD, SLA e da controlli**

La massa (cioè la quantità di molecole) di LCAT è stata analizzata nei CSF dei pazienti AD, SLA e nei controlli, tramite elettroforesi ed *immunoblotting*, utilizzando un anticorpo specifico anti-LCAT. Le bande degli immunocomplessi, rivelate sulle lastre di sviluppo della chemiluminescenza prodotta dagli anticorpi secondari, sono state analizzate per individuare eventuali differenze fra malati e controlli; l'analisi è stata fatta in riferimento ad una retta di calibrazione della chemiluminescenza sviluppata da quantità note di plasma deprivato di lipoproteine (LPDS), caricate insieme ai campioni, su ogni gel preparato.

Dalle analisi di densitometria dei tracciati elettroforetici non sono emerse differenze significative tra i campioni dei controlli e quelli dei malati AD. Un discorso a parte può essere fatto per la massa di LCAT nei campioni da pazienti SLA. Analizzando l'attività di LCAT in funzione della sua massa nei campioni controllo e SLA, è emerso che alcuni campioni SLA con attività enzimatica più alta hanno mostrato di avere anche una massa di LCAT più alta, mentre altri campioni con attività enzimatica molto inferiore al normale hanno mostrato una massa di LCAT maggiore del normale (Fig. 26).

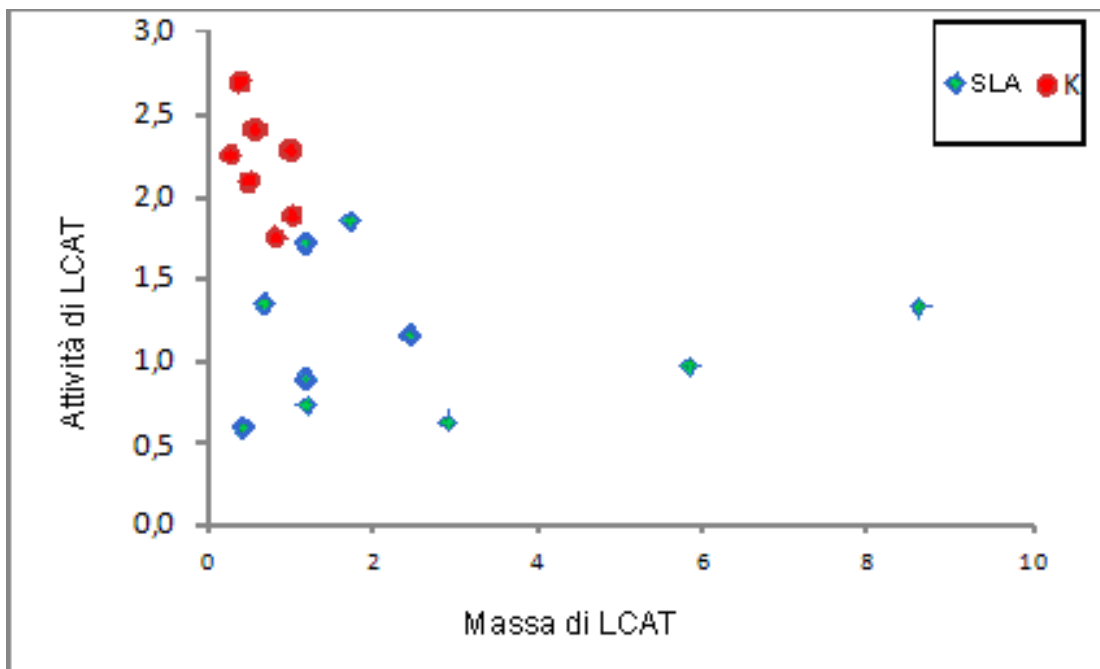


Figura 26 - Attività di LCAT in funzione della sua massa nei CSF da pazienti SLA e da controlli (K)

L'ipotesi più interessante, per spiegare tale fenomeno, è quella secondo cui l'accumulo di substrato (24(S)OH-C), che non viene correttamente smaltito da LCAT in condizioni di neurodegenerazione, possa funzionare da stimolo (via recettori nucleari LXR) per gli astrociti per l'ulteriore secrezione di LCAT. L'ipotesi è sostenuta dal fatto che alti livelli di 24(S)OH-C, in coltura di astrociti, sembrano stimolare effettivamente la secrezione di LCAT nel terreno (dati preliminari, non mostrati). Tuttavia, per quanto riguarda AD, non

essendoci sostanziali differenze nell'espressione di LCAT e delle proteine maggiormente coinvolte nella reazione di esterificazione del 24(S)OH-C, resta da chiarire se la ridotta attività dell'enzima, in questa patologia, possa essere associata ad altri fattori di rischio neurodegenerativo come, per esempio, lo stress ossidativo il peptide A $\beta$ , che sono noti inibire l'enzima *in vitro*.

## DISCUSSIONE

24(S)OH-C, un metabolita polare di C, è prodotto quasi esclusivamente nel cervello (Björkhem e Meaney, 2004; Björkhem, 2006), ed è strettamente coinvolto nei processi di allontanamento di C cerebrale (Lütjohann et al., 1996; Björkhem, 2006). Infatti, 24(S)OH-C non solo diffonde liberamente attraverso la BBB per raggiungere il fegato con la circolazione ematica, ma è in grado di regolare sia la sintesi endogena di C nei neuroni, sia l'efflusso di C dalle cellule (Abildayeva et al., 2006; Repa et al., 2000; Withney et al., 2002; Wang et al., 2008; Chen et al., 2011). Nonostante queste sue funzioni suggeriscano che esso possa essere un metabolita protettivo nel cervello, è stato recentemente proposto un suo possibile coinvolgimento nella patogenesi di malattie neurodegenerative (Poli et al., 2013) ed un suo effetto neurotossico, dovuto essenzialmente alla sua azione pro-ossidante *in vitro*, anche a basse concentrazioni (Gamba et al., 2011; Poli et al., 2013, Kölsch et al., 1999 e 2001, Testa et al., 2012). All'ipotesi che 24(S)OH-C possa essere un fattore eziologico si aggiunge l'evidenza che alti livelli di questo ossisterolo sono stati riscontrati nel CSF di pazienti affetti da MCI e AD (Schönknecht et al., 2002). Per questi motivi, la titolazione di 24(S)OH-C nel CSF fornisce informazioni sul metabolismo di C nel SNC ed è stata proposta come possibile biomarcatore di neurodegenerazione (Hughes et al., 2013; Leoni e Caccia 2011). E' possibile che l'accumulo di 24(S)OH-C, nel fluido interstiziale e nel CSF, rifletta un inefficiente smaltimento attraverso la BBB. Siccome 24(S)OH-C plasmatico circola essenzialmente in forma esterificata, per lo più in associazione ad HDL ed LDL (Burkard et al., 2007) e siccome la quantità di lipidi smaltita via lipoproteine è di gran lunga superiore a quella che diffonde liberamente, sembra ragionevole supporre che l'esterificazione di 24(S)OH-C sia un modo per aumentare lo smaltimento di 24(S)OH-C dal cervello. Sebbene sia molto probabile che alterazioni nei livelli di 24(S)OH-C possano

dipendere da danni a livello della BBB oppure da un'alterazione dell'attività di esterificazione, ad oggi non c'è letteratura sull'efficienza di esterificazione di 24(S)OH-C in pazienti con malattie neurodegenerative o sull'utilità di misurare il livello di 24(S)OH-CE come biomarcatore di neurodegenerazione.

E' noto che la distribuzione di C, fra le varie lipoproteine plasmatiche, dipende in parte dall'esterificazione (Glomset, 1962; Jonas, 1991), in parte dallo scambio di lipidi fra le lipoproteine (Tall et al., 1987 e 1993). Inoltre, l'esterificazione di C, catalizzata da LCAT, è cruciale per RCT dalle cellule periferiche al fegato (Glomset, 1968; Jonas, 1991; Rader et al., 2009). Pertanto, l'esterificazione di 24(S)OH-C, anch'essa catalizzata da LCAT ed associata all'inclusione di 24(S)OH-CE in lipoproteine simili a HDL, potrebbe servire a modulare il trasporto di questo ossisterolo verso cellule e tessuti extracerebrali, prevenendone così l'accumulo in quantità tossiche nel SNC e, in particolare, nel fluido interstiziale cerebrale (ovvero nel CSF).

Sia 25(S)OH-C che 27(S)OH-C vengono esterificati da LCAT (Szledacsek et al., 1996; Lin and Morel, 1995). In questo lavoro di Tesi è dimostrato, utilizzando vari approcci sperimentali, che LCAT plasmatico esterifica anche 24(S)OH-C. Gran parte degli esperimenti descritti in questo lavoro provengono da esperimenti *in vitro*, in cui è stato utilizzato LPDS come fonte di LCAT, piuttosto che l'enzima purificato. Il fatto, però, che LCAT sia effettivamente l'enzima coinvolto nell'esterificazione di 24(S)OH-C è stato dimostrato innanzitutto con la produzione di esteri fluorescenti, che è risultata drasticamente ridotta quando LPDS è stato preincubato con anticorpo monoclonale anti-LCAT. Inoltre, la produzione di esteri, fluorescenti o triziati, si è verificata solo in presenza di proteoliposomi contenenti ApoA-I o ApoE, che sono proprio i maggiori attivatori di LCAT *in vitro* e *in vivo* (Jonas, 1991; Zhao et al., 2005; Curtiss, 2006). Infine, l'esterificazione di 24(S)OH-C è risultata significativamente più bassa sia in presenza di alte concentrazioni della proteina infiammatoria Hpt (simili a quelle che si trovano in

circolo durante l'infiammazione), sia quando LCAT è stato sottoposto a stress ossidativo, una condizione nota per degradare l'attività di questo enzima (Bielicki et al., 1995 (a); Graham et al., 1998; Bielicki et al., 1999; Chen e Loo, 1995; Bielicki et al., 1995 (b); Wang et al., 2000). Questi risultati sono in accordo con i dati relativi all'attività di LCAT plasmatico per l'esterificazione di C, come riportato in letteratura (Spagnuolo et al., 2005; Cigliano et al., 2009). In questo lavoro, la cinetica dell'esterificazione di 24(S)OH-C è stata studiata usando proteoliposomi sia preparati con acidi grassi naturali, che marcati con lipidi fluorescenti. Sebbene i risultati non possano essere paragonati, per via della differenza nei donatori della catena acilica, entrambe le cinetiche confermano che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la percentuale di esterificazione cresce linearmente durante le prime due ore, in accordo con dati precedentemente pubblicati per l'attività di LCAT nell'esterificazione di 27(S)OH-C (Szledacsek et al., 1995) e inoltre confermano che, in entrambi i casi, la massima esterificazione si ottiene dopo 8 ore di incubazione.

L'attività di LCAT è stata analizzata anche *ex vivo*, aggiungendo  $^3\text{H}$ -24(S)OH-C ad una raccolta di CSF proveniente da individui sani, come tracciante dell'esterificazione da parte di LCAT presente nel CSF. L'esperimento ha dimostrato che LCAT presente nel SNC è in grado di esterificare 24(S)OH-C. La percentuale di esterificazione di 24(S)OH-C, tuttavia, non ha superato 10%, anche dopo 16 h di incubazione. Questa efficienza, apparentemente bassa, dell'attività di LCAT cerebrale, può essere attribuita al fatto che, nel CSF, gran parte di 24(S)OH-C si trova già in forma esterificata, in associazione alle lipoproteine presenti nel fluido (Lütjohann et al., 1996; Papassotiropoulos et al., 2002).

Dal momento che 24(S)OH-C possiede più di un gruppo ossidrilico, è stato analizzato quali e quanti di questi fossero esterificati. L'analisi dello spettro di massa dei prodotti della reazione di esterificazione, sia fluorescenti che non, ha confermato l'effettiva produzione di esteri 24(S)OH-CE nella miscela di reazione ed ha permesso di caratterizzare questi prodotti come monoesteri con catene aciliche legate all'anello A della



struttura tetraciclica steroidea. Questo risultato è in accordo con l'informazione che steroli con un gruppo 3 $\beta$ -ossidrile ed una configurazione *trans* degli anelli A/B agiscono come accettori di catene aciliche nella reazione di esterificazione mediata da LCAT (Piran and Nischida, 1979; Kitabatake et al., 1979). Inoltre, è noto che LCAT è in grado di formare diesteri di 27(S)OH-C ma non di altri ossisteroli, in presenza di proteoliposomi contenenti ApoA-I (Szedlacsek et al., 1995). Gli esteri di 24(S)OH-C, tuttavia, non sono stati mai analizzati finora e avrebbero potuto ospitare la catena acilica anche soltanto sul C-24 di questo ossisterolo. L'analisi dello spettro di massa di 24(S)OH-C ha indicato che l'esterificazione avviene solo in posizione 3 $\beta$ , probabilmente perché il gruppo ossidrile in posizione C-24 non raggiunge il corretto posizionamento per il sito attivo di LCAT, come suggerito per altri ossisteroli (Szedlacsek et al., 1995).

La capacità dei due principali attivatori di LCAT (ApoA-I e ApoE), nel modulare l'esterificazione di 24(S)OH-C, è stata confrontata. I dati ottenuti dimostrano che l'esterificazione di 24(S)OH-C è stimolata più da ApoA-I che da ApoE, e sono in accordo con quanto presente in letteratura a riguardo dell'esterificazione di C da parte di LCAT (Zorich et al., 1985; Rye et al., 2006).

E' noto che particelle simili alle HDL, presenti nel cervello e formate prevalentemente da astrociti e microglia (La Du et al., 2000), contengono ApoE come proteina maggioritaria. Tuttavia, ApoA-I, sebbene non sintetizzata nel cervello (Beffert et al., 1998), è stata trovata nel CSF umano (Pitas et al., 1987; Demeester et al., 2000; Koch et al., 2001), probabilmente derivata dalla circolazione sanguigna (Dietschy and Turley, 2001) o dalla secrezione delle cellule endoteliali vascolari cerebrali, in risposta a citochine infiammatorie (Möckel et al., 1994). Dal momento che la concentrazione di ApoE nel CSF è più alta di quella di ApoA-I (Harr et al., 1996; Demeester et al., 2000), ma la sua efficienza nella stimolazione di LCAT è inferiore, è ipotizzabile che le due apolipoproteine contribuiscano in egual modo alla regolazione dell'attività di LCAT nel cervello.

Tra i fattori che possono influenzare l'attività di LCAT, è stato analizzato l'effetto di Hpt, proteina della fase acuta dell'infiammazione, come sopra accennato. La presenza di Hpt nel cervello è stata precedentemente descritta (Chen et al., 1998; Lee et al., 2002; Borsody et al., 2006; Zhao et al., 2009) ed il suo livello nel CSF è stato suggerito come biomarcatore di neurodegenerazione (Argüelles et al., 2010; Huang et al., 2011). Tuttavia, il ruolo di questa proteina nella fisiopatologia del cervello non è stato, ad oggi, chiarito. Dal momento che alti livelli di Hpt, come quelli che si trovano in circolo durante la fase acuta dell'infiammazione, inficiano l'esterificazione di C da parte di LCAT (Spagnuolo et al., 2005; Cigliano et al., 2009), si è ipotizzato che anche l'esterificazione di 24(S)OH-C potesse essere inibita da Hpt. I dati riportati in questo lavoro di tesi dimostrano che alti livelli di Hpt possono inibire anche l'esterificazione di 24(S)OH-C. Questo suggerisce che, in condizioni infiammatorie, possa venir meno l'effetto protettivo dell'esterificazione di 24(S)OH-C, con conseguente accumulo di quantità di 24(S)OH-C tossiche per i neuroni.

Un altro fattore che caratterizza le malattie neurodegenerative è lo stress ossidativo. LCAT è un noto bersaglio di specie ossidanti (Chen and Loo, 1995; Graham et al., 1998; Subbiah e Liu, 1996; Davit-Sprout et al., 1999; Bielicki et al., 1995 (b); Wang et al., 2000; Bielicki et al., 1995 (a); Wang, e Subbiah, 2000; Bielicki et al., 1999), che possono alterarne struttura e funzioni. Per questo motivo, l'esterificazione di 24(S)OH-C è stata studiata dopo aver sottoposto LCAT a condizioni di stress ossidativo. I risultati degli esperimenti hanno evidenziato una riduzione significativa dell'attività enzimatica, quando LCAT è stato pretrattato con una miscela basata sulla reazione di Fenton. Le concentrazioni di acido ascorbico e rame utilizzate erano comprese negli intervalli di valori trovati nel CSF, come descritto dalla letteratura (Hozumi et al., 2011; Tallaksen et al., 1992; Reiber et al., 1993; Bowman et al., 2009), mentre il perossido di idrogeno è stato utilizzato a concentrazioni inferiori rispetto a quelle trovate tossiche per cellule nervose in coltura (Known et al., 2001; Geracitano et al., 2005; Chang et al., 2008; Nisticò et al.,

2008). La funzione enzimatica è stata trovata danneggiata dallo stress ossidativo, che, d'altra parte, è noto stimolare la sintesi di 24(S)OH-C (Ohyama et al., 2006). In condizioni di stress ossidativo l'attività di LCAT può, quindi, diminuire a livelli tali che non consentono di esterificare efficientemente 24(S)OH-C.

In questo lavoro di Tesi, è stato dimostrato che 24(S)OH-C compete con C come substrato di LCAT. Non è possibile, tuttavia, stabilire chi, fra 24(S)OH-C e C, rappresenti il migliore accettore della catena acilica nella reazione di esterificazione; infatti, negli esperimenti descritti, <sup>3</sup>H-24(S)OH-C è stato utilizzato in forma libera, mentre C è stato preparato in associazione ai proteoliposomi, per prevenire la sua micellizzazione spontanea in fase acquosa. Non è possibile determinare correttamente e confrontare i valori di  $K_m$  per l'esterificazione dei due substrati, essenzialmente perché non è possibile stimare la quantità di C effettivamente disponibile per l'enzima. Infatti, la componente lipidica dei proteoliposomi era probabilmente costituita da strati concentrici di lamelle idrofobiche, intercalati da strati di soluzione acquosa: C disponibile per l'esterificazione era presente solo sullo strato superficiale, mentre C presente negli strati più interni non era disponibile come substrato ed era impossibile stabilire la percentuale della quantità utilizzata, effettivamente esposta all'enzima. Comunque, è possibile che, in condizioni fisiologiche (dove C fuoriesce dalla membrana plasmatica all'ambiente extracellulare, mediante trasportatori ABC), le quantità di C e 24(S)OH-C disponibili per LCAT siano paragonabili o l'affinità dell'enzima sia maggiore per il secondo substrato, in quanto livelli simili di esteri di 24(S)OH-C e di C sono stati riscontrati nel CSF umano, sebbene la concentrazione di C sia circa 2000 volte più alta rispetto a quella di 24(S)OH-C (Papassotiropoulos et al., 2002).

Gli esteri di 24(S)OH-C, così come gli esteri di C, sono accumulati nelle lipoproteine, sulla cui superficie avviene la reazione di esterificazione, e quindi, presumibilmente, vengono trasportati in circolo in associazione ad esse. In questo modo, 24(S)OH-C

potrebbe essere rapidamente rimosso dal SNC e tale meccanismo potrebbe prevenire l'accumulo di questo ossisterolo neurotossico. In base a questa ipotesi, è stato dimostrato che cellule incubate con una dose tossica di 24(S)OH-C riescono a sopravvivere se la stessa dose viene pretrattata con LCAT. Questo risultato suggerisce che LCAT possa contrastare l'effetto tossico di 24(S)OH-C convertendolo in forma esterificata e favorendone la compartimentalizzazione nelle lipoproteine in soluzione. Gli esteri appena formati, infatti, sarebbero sequestrati e tenuti lontani dalle cellule e potrebbero essere non più nocivi per esse. Questa ipotesi è stata confermata anche da esperimenti di incorporazione di 24(S)OH-C (in forma libera e in forma trattata con LCAT) in neuroni differenziati in coltura, che hanno dimostrato l'assenza totale di incorporazione di 24(S)OH-CE da parte delle cellule. L'esterificazione di 24(S)OH-C, quindi, ne riduce la quota disponibile per la diffusione attraverso la membrana plasmatica. Questo processo potrebbe essere, dunque, protettivo dalla tossicità di 24(S)OH-C *in vivo*, poiché riduce il suo ingresso nelle cellule e, inoltre, potrebbe contribuire al suo allontanamento, in forma di monoestere, dal SNC.

Sebbene alcuni studi riportino che pazienti con deficit ereditario di LCAT sviluppano prematuramente aterosclerosi e compromissione delle funzioni cerebrali (Teisberg and Gjone, 1981; Shojania et al., 1983) e sebbene una ridotta attività di LCAT sia stata riscontrata in pazienti affetti da AD (Knebl et al., 1994; Demeester et al., 2000) o da sclerosi multipla (Albers et al., 1992), l'assenza di LCAT non è comunemente ritenuta associata a patologie cardiovascolari o neurodegenerative. In tale contesto, uno studio ha dimostrato che un deficit di LCAT non impedisce RCT, ma può diventare limitante per questo processo solo in caso di totale assenza dell'enzima (Tanigawa et al., 2009). L'esterificazione di 24(S)OH-C sembrerebbe, quindi, non essere fondamentale per lo smaltimento di questo ossisterolo neurotossico o per lo smaltimento di C, anch'esso neurotossico. Dunque, la funzione di LCAT nel SNC potrebbe non essere cruciale se altri

fattori, come livelli più alti di ApoE o ApoJ (Hirsch-Reinshagen et al., 2004 e 2009 Hirsch-Reinshagen e Wellington, 2007), o l'aumento di efflusso cellulare di C, agissero per sostenere il trasporto di C in circolo. Allo stesso modo, la diffusione libera di 24(S)OH-C potrebbe, di per sé, bastare per garantire l'eliminazione di basse concentrazioni di 24(S)OH-C dal SNC in condizioni normali. Tuttavia, se questi fattori fallissero nel mantenere l'omeostasi di C e di 24(S)OH-C nel SNC, a causa, per esempio, di stress ossidativo che danneggia le funzioni delle proteine, o in caso di incremento della sintesi di C (con conseguente aumento di 24(S)OH-C), la presenza di LCAT potrebbe risultare essenziale. Parimenti, se 24(S)OH-C si accumulasse nel fluido interstiziale del SNC fino al punto che concentrazioni fisiologiche di ApoA-I e di ApoE non fossero sufficienti per il trasporto di questo ossisterolo al fegato, LCAT potrebbe intervenire e l'esterificazione di 24(S)OH-C, con l'accumulo di 24(S)OH-CE nelle lipoproteine, garantirebbe una massiva eliminazione dell'ossisterolo neurotossico. La funzione di LCAT, forse non strettamente necessaria in condizioni normali, potrebbe essere, quindi, cruciale per rispondere a gravi alterazioni dei livelli di C e di 24(S)OH-C nel SNC. Tuttavia, evidenze convincenti del ruolo neuroprotettivo di LCAT, ad oggi, non esistono in letteratura, e sono necessari ulteriori studi per verificare se bassi livelli di LCAT nel SNC siano associati ad accumulo e tossicità di 24(S)OH-C e se l'attività dell'enzima possa contribuire a mantenere la concentrazione di 24(S)OH-C sotto la soglia di tossicità. D'altra parte, le analisi *ex vivo* condotte su campioni di plasma e CSF di soggetti sani o individui affetti da MCI o da malattie neurodegenerative (AD o SLA) sembrano suggerire l'esistenza di un nesso fra esterificazione di 24(S)OH-C e fenomeni neurodegenerativi. Nei campioni dei pazienti è stata osservata, infatti, una riduzione significativa del livello di 24(S)OH-CE nel CSF (che drena ossisteroli, proteine ed altre molecole dal fluido interstiziale cerebrale) rispetto ai controlli. Dunque, la misura dell'esterificazione di 24(S)OH-C nel CSF rappresenta l'attività di LCAT e, quindi, riflette due condizioni del SNC che sono negativamente

correlate: la capacità di smaltimento degli steroli, come esteri di acidi grassi accumulati in lipoproteine dirette al circolo, e lo stress ossidativo, di cui l'enzima è un biosensore. In altri termini, la misura di 24(S)OH-CE nel CSF rappresenta un potenziale biomarcatore di condizioni di ipercolesterolemia e di stress ossidativo, accertati fattori di rischio neurodegenerativo. Poiché 24(S)OH-C si accumula nel CSF in conseguenza all'accumulo di colesterolo e dello stress ossidativo e poiché queste condizioni rappresentano eventi precoci e neurotossici, il biomarcatore può risultare alterato già nelle fasi iniziali della malattia, prima, cioè, che i sintomi siano manifesti. Il livello del biomarcatore, che diminuisce in condizioni di neurodegenerazione, può essere determinato anche nel plasma o nel siero ematico, perché 24(S)OH-C, trasportato in circolo, è essenzialmente di origine cerebrale e la sua esterificazione, che dipende da LCAT (presente nel SNC), non viene sostanzialmente modificata nel plasma di pazienti con AD. I risultati delle nostre analisi hanno, infatti, mostrato una correlazione positiva fra i livelli degli esteri nel CSF plasma e quelli nei plasmidi omologhi: il livello di esterificazione di 24(S)OH-C nel plasma riflette quello nel SNC per ciascun individuo. L'analisi del biomarcatore nel siero o nel plasma può, dunque, sostituire quella nel CSF per avere informazioni sull'attività di LCAT nel SNC, con il vantaggio di poter monitorare la condizione cerebrale con un semplice prelievo di sangue ed evitare, invece, un prelievo invasivo (puntura lombare) come quello del CSF.

Anche C è esterificato da LCAT nel fluido interstiziale del SNC, per cui anche la misura dei livelli di esteri di C potrebbe riflettere l'attività enzimatica nel cervello. Però, a differenza di quanto accade per 24(S)OH-C, una notevole quantità di C, di origine epatica o alimentare, viene esterificata nel sangue dalla forma plasmatica di LCAT, separata da quella presente nel SNC per la presenza della BBB. Questa massiva esterificazione plasmatica di C altera moltissimo il rapporto fra esteri e forme libere di C di origine

nervosa. Pertanto, i livelli plasmatici di esteri di C, al contrario di quelli di 24(S)OH-CE, non possono essere utilizzati come biomarcatori dell'attività di LCAT nel SNC.

Il deficit di attività di LCAT, emerso nei tre tipi di neurodegenerazione studiati, potrebbe dipendere da cause diverse come, ad esempio, la ridotta espressione del gene per LCAT, l'insufficiente stimolazione da parte di ApoE e/o ApoA-I, la degradazione ossidativa della funzione enzimatica oppure l'aumento della concentrazione di Hpt. Va inoltre specificato che, fra gli aplotipi di ApoE, ApoE4 stimola LCAT meno di ApoE2 ed ApoE3 (Rye et al., 2006): questo fatto spiegherebbe perché ApoE4 rappresenta, come è ben noto, un fattore di rischio neurodegenerativo in AD. I livelli di ApoE, ApoA-I e Hpt, misurati con procedura ELISA nel CSF di pazienti con AD o SLA, non hanno evidenziato differenze significative tra pazienti e controlli, mentre la quantità di LCAT, rilevata tramite elettroforesi e immunoblotting, è risultata maggiore in alcuni pazienti con SLA. Ulteriori esperimenti sono necessari per stabilire se tale aumento rifletta l'aggravarsi di SLA e, quindi, potrebbe rappresentare un elemento per la diagnosi differenziale tra AD e SLA. L'aplotipo ApoE4, anch'esso cercato con elettroforesi ed immunoblotting, è stato trovato solo in un paziente SLA ed in due pazienti con AD, ma in condizioni di eterozigosi (ApoE3/ApoE4). Poiché né minori livelli di LCAT, ApoA-I e/o ApoE, né maggiori livelli di Hpt, né la presenza di ApoE4 sono risultati associati con i minori livelli di esteri del 24(S)OH-C nel CSF dei pazienti, è ragionevole ipotizzare che le alterazioni funzionali dell'enzima siano state provocate essenzialmente da fenomeni di degradazione ossidativa.

Gran parte delle malattie neurodegenerative vengono diagnosticate solo quando si manifestano gravi sintomi. L'accertamento delle fasi iniziali della patologia renderebbe possibili interventi terapeutici precoci, per cui la diagnosi precoce risulta l'unico strumento per trattamenti tempestivi che possano prevenire l'aggravamento dei sintomi e la progressione della malattia. La rilevanza del biomarcatore, individuato in questo lavoro di Tesi, risiede, oltre che nella semplicità del prelievo ematico, anche nel fatto che 24(S)OH-

C è sintetizzato in risposta allo stress ossidativo e all'accumulo di C, eventi chiave delle fasi precoci di neurodegenerazione, come già menzionato. Quindi il biomarcatore, che svolgerebbe un ruolo chiave nello smaltimento di uno specifico fattore neurotossico, riflette una fase iniziale del processo neurodegenerativo e rappresenterebbe anche un potenziale bersaglio terapeutico.



## BIBLIOGRAFIA

1. Abildayeva K., Jansen P., Hirsch-Reinshagen V., Bloks V., Bakker A., Ramaekers F., de Vente J., Groen A., Wellington C., Kuipers F., Mulder M. 2006. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.***281**: 12799-12808.
2. Albers, J.J., S.M. Marcovina, and R.H. Christenson. 1992. Lecithin cholesterol acyltransferase in human cerebrospinal fluid: reduced level in patients with multiple sclerosis and evidence of direct synthesis in the brain. *Int.J.Clin.Lab Res.* **22**: 169-172.
3. Argüelles S., Venero J.L., García-Rodríguez S., Tomas-Camardiel M., Ayala A., Cano J., Machado A. 2010. Use of haptoglobin and transthyretin as potential biomarkers for the preclinical diagnosis of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* **57**:227-34
4. Balestrieri M., Cigliano L., De Simone M.L., Dale B., and Abrescia P. 2001. Haptoglobin inhibits Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in human ovarian follicular fluid. *Mol. Reprod. Dev.* **59**: 186-91
5. Beffert U., Danik M., Krzywkowski P., Ramassamy C., Berrada F., Poirier J. 1998. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.***27**:119-142.
6. Bielicki J.K., Forte T.M., and McCall M.R. 1995 (a). Gas-phase cigarette smoke inhibits plasma lecithin-cholesterol acyltransferase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1258**: 35-40
7. Bielicki J.K., McCall M.R., Vanderberg J.J.M., Kuypers F.A., and Forte T.M. 1995 (b). Copper and gas-phase cigarette inhibit plasma lecithin-cholesterol cytransferase activity by different mechanisms. *J. Lip. Res* **36**: 322-31
8. Bielicki J.K., and Forte T.M. 1999. Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lip. Res.* **40**:948-954
9. Bielska, A.A., Schlesinger P., Covey D.F., and Ory D.S. 2012. Oxysterols as non-genomic regulators of cholesterol homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.***23**: 99-106.
10. Biesambaeva R.U., Mursgalieva A.T., Dzhumalieva L.M., Shaikenov T.E. Mevkh A.T. 1990. Identification of haptoglobin as an endogenous inhibitor of prostaglandin

- H synthase in the cytosol fraction of primary cells from sheep vesicular glands. *FEBS* **269**: 125-127.
11. Björkhem I., Meaney S., Diczfalusy U. 2002. Oxysterols in human circulation: which role do they have. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**:247–53.
  12. Björkhem I., Leoni V., Meaney S. 2010. Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism. *J Lip Res*, **51**: 2489-2503.
  13. Björkhem I. and Meaney S. 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol* **24**: 806-815.
  14. Björkhem, I., Cedazo-Minguez A., Leoni V., Meaney S. 2009. Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* **30**:171-179
  15. Blennow K., De Leon M.J., Zetterberg H. 2006 Alzheimer's disease. *Lancet* **368**:387–403.
  16. Borsody M., Burke A., Coplin W., Miller-Lotan R., Levy A. 2006. Haptoglobin and the development of cerebral artery vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurology* **66**:634-640
  17. Bowman G.L., Dodge H., Frei B., Calabrese C., Oken B.C., Kaye J.A., Quinn J.F. 2009. Ascorbic Acid and Rates of Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis* **16**:93-98
  18. Brooks C.J., Steel G., Gilbert J.D., Harland W.A. 1971. Lipids of human atheroma. 4. Characterisation of a new group of polar sterol esters from human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **13**: 223-237.
  19. Brown A., Jessup W. 2009. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Elsevier.* **30**:111-122
  20. Bu G., 2009. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease, pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **10** : 333-344.
  21. Burkard I., von Eckardstein A., Waeber G., Vollenweider P., Rentsch K. M. 2007. Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis* **194**: 71-78
  22. Canepa E., Borghi R., Viña J., Traverso N., Gambini J., Domenicotti C., Marinari U.M., Poli G., Pronzato M.A., Ricciarelli R. 2011. Cholesterol and amyloid- $\beta$ : evidence for a cross-talk between astrocytes and neuronal cells. *J. Alzheimers Dis.* **25**: 645-653.
  23. Chang S., Jiang X., Zhao C., Lee C., Ferriero D.M. 2008. Exogenous low dose hydrogen peroxide increases hypoxia-inducible factor-1alpha protein expression and

- induces preconditioning protection against ischemia in primary cortical neurons. *Neurosci Lett* **441**: 134-8
24. Chen C., Loo G. 1995. Effects of peroxy radicals on Lecithin/Cholesterol Acyltransferase activity in human plasma. *Lipids* **30**:627-31
  25. Chen C.H. and Albers J.J. 1985. Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by apolipoproteins E-2, E-3, and A-IV isolated from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* **836(3)**:279-85.
  26. Chen C.H. and Albers J.J. 1982. Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lip. Res.***23**: 680-691.
  27. Cid M.C., Grant D.S., Hoffman G.S., Auerbach R., Fauci A.S., Kleinman H.K. 1993. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* **91**: 977-985.
  28. Cigliano L., Pugliese C.R., Spagnuolo M.S., Palumbo R., Abrescia P. 2009. Haptoglobin binds the antiatherogenic protein apolipoprotein E - impairment of apolipoprotein E stimulation of both lecithin:cholesterol acyltransferase activity and cholesterol uptake by hepatocytes. *FEBS J.* **276**:6158-71
  29. Curtiss L.K., Valenta D.T., Hime N.J., Rye K.A. 2006. What Is So Special About Apolipoprotein AI in Reverse Cholesterol Transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**: 12-19
  30. Davit-Spraul A., Théron P., Leroy A., Palmade-Rieunier F., Rousset C., Moatti N., Legrand A. 1999. Inhibition of lecithin cholesterol acyltransferase by phosphatidylcholine hydroperoxides. *FEBS Lett* **447(1)**:106-10.
  31. Deisenhammer F., Egg R., Giovannoni G., Hemmer B., Petzold A., Sellebjerg F., Teunissen C., Tumanig H. 2009. EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. *Europ J Neurol* **16**: 760–770
  32. Demeester N., Castro G., Desrumaux C., De Geitere C., Fruchart J.C., Santens P., Mulleners E., Engelborghs S., De Deyn P.P., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Labour C. 2000. Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin:cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J. Lip. Res.* **41**: 963-974.
  33. Dietschy J.M. and Turley S.D. 2004. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lip. Res.* **45**: 1375-1397.

34. Dzeletovic S., Babiker A., Lund E., Diczfalusy U. 1995. Time course of oxysterol formation during in vitro oxidation of low density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids*. **78(2)**:119-28.
35. El Ghmati S., Van Hoeyveld E., Van Strijp J., Ceuppens J., Stevens E. 1996. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J Immunol* **156**: 2542–2552.
36. Elliott D.A., Halliday G.M., Garner B. 2010. Apolipoprotein-E forms dimer in human frontal cortex and hippocampus. *BMC Neuroscience* **11**:23
37. Fielding C.J. 1986. Mechanisms of action of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. *Meth Enz.* **129**: 783-790.
38. Fragoso Y.D. and Skinner E.R. 1996. Cholesterol-loading of peripheral-tissues alters the interconversion of high-density-lipoprotein subfractions in rabbits. *Int J Biochem Cell Biol*, **28**:151-163.
39. Gamba P., Leonarduzzi G.; Tamagno E., Guglielmotto M., Testa G., Sottero B. Gargiulo S., Biasi F., Mauro A., Viña J., Poli G. 2011. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-b in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* **10**: 403-417
40. Geracitano R., Tozzi A., Berretta N., Florenzano F., Guatteo E., Viscomi M.T., Chiolo B., Molinari M., Bernardi G., Mercuri N.B. 2005. Protective role of hydrogen peroxide in oxygen-deprived dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *J Physiol* **568.1**: 97-110
41. Getz G.S., Reardon C.A., 2009. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lip. Res.* **50**: 156-161
42. Gill S., Chow S., Brown A.J. 2008 Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lip Res.* **47**: 391-404
43. Glomset J.A., Janssen E.T., Kennedy R., Dobbins J. 1966. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J Lip. Res.* **7**: 638-648.
44. Glomset, J.A. 1962. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim Biophys Acta* **65**:128-135.
45. Glomset, J.A. 1968. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lip. Res.* **9**: 155-67.
46. Graham A., Vinogradov D.V., Owen J.S. 1998 Effects of peroxynitrite on plasma components of the reverse cholesterol transport pathway. *FEBS Lett* **431**:327-32.

47. Greenow K., Pearce N., Ramji D.P. 2005. The key of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* **83**: 329-342.
48. Hanasaki K., Powell L., Varki A. 1995. Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. *J Biol. Chem.* **270**: 7543–7550.
49. Harr S.D., Uint L., Hollister R., Hyman B.T., Mendez A.J. 1996. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **66**: 2429-2435.
50. Hirsch-Reinshagen V., Donkin J., Stukas S., Chan J., Wilkinson A., Fan J., Parks J.S., Kuivenhoven J.A., Lütjohann D., Pritchard H., Wellington C.L. 2009. Lecithin:cholesterol acyltransferase synthesized by primary astrocytes esterifies cholesterol on glia-derived lipoproteins. *J Lip. Res.* **50**:885-93.
51. Hirsch-Reinshagen V., Wellington C.L. 2007. Cholesterol metabolism, apolipoprotein E, adenosine triphosphate-binding cassette transporters, and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**:325-32.
52. Hirsch-Reinshagen V., Zhou S., Burgess B.L., Bernier L., McIsaac S.A., Chan J.Y., Tansley G.H., Cohn J.S., Hayden M.R., Wellington C.L. 2004. Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J Biol. Chem.* **279**:41197-207
53. Honda, A., K. Yamashita, T. Hara, T. Ikegami, T. Miyazaki, M. Shirai, G. Xu, M. Numazawa, and Y. Matsuzaki. 2009. Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC-ESI-MS/MS. *J. Lip. Res.* **50**: 350-357.
54. Hozumi I., Hasegawa T., Honda A., Ozawa K., Y., Hashimoto K., Yamada M., Koumura A., Sakurai T., Kimura A., Tanaka Y., Satoh M., Inuzuka T. 2011. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* **303**: 95-99
55. Hu G., Antikainen R., Jousilahti P., Kivipelto M, Tuomilehto J. 2008. Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**: 1972-1979.
56. Huang Y.C., Wu Y.R., Tseng M.Y., Chen Y.C., Hsieh S.Y., Chen C.M. 2011. Increased prothrombin, apolipoprotein A-IV, and haptoglobin in the cerebrospinal fluid of patients with Huntington's disease. *PLoS One* **6**:e15809
57. Hughes T.M., Rosano C., Evans R.W., Kuller L.H. 2013. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia. *J Alzheimer Dis.* **33**: 891-911

58. Itagaki H., Hagino S., Kato S., Kobavashi T., Umeda M. 1991. An in vitro alternative to the Draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicol in vitro*. **5**: 139-143
59. Iuliano L. 2011. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms.
60. Jack Jr C.R., Knopman D.S., Jagust W.J. 2010 Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. **9**:119–28.
61. Jack Jr C.R., Lowe V.J., Weigand S.D., Wiste H.J., Senjem M.L., Knopman D.S., 2009 Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* **132**:1355–65.
62. Jonas, A. 1991. Lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**: 205-220.
63. Jue D., Shim B., Yang Y. 1983. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol. and Cell Biochem*. **51**: 141-147.
64. Kellner-Weibel G., Jerome W.G., Small D.M., Warner G.J., Stoltenborq J.K., Keainey M.A., Cariay M.H., Philips M.C., Rothblat G.H. 1998. Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **18**: 423-431.
65. Kitabatake K., Piran U., Kamio Y., Doi Y., Nishida T. 1979. Purification of human plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and its specificity towards the acyl acceptor. *Biochim. Biophys. Acta*. **573**: 145-154.
66. Kivipelto M., Solomon A. 2006. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease-epidemiological evidence. *Acta Neurol. Scand. Suppl.***185**: 50-57.
67. Knebl J., DeFazio P., Clearfield M.B., Little L., McConathy W.J., McPherson R., Lacko A.G. 1994. Plasma lipids and cholesterol esterification in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev*. **73**: 69-77.
68. Kölsch H., Lütjohann D., Tulke A., Björkhem I., Rao M.L. 1999. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res*. **818**: 171-175.
69. Kölsch H., Ludwig M., Lütjohann D., Rao M.L. 2001. Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17beta. *J. Neural. Transm.***108**: 475-488.

70. Kwon D., Choi C., Lee J., Kim K.O., Kim J.D., Kim S.J., Choi I.H. 2001. Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis. *J Neuroimmunol.* **113**:1-9
71. Ladu M.J., Reardon C., Van Eldik L., Fagan A.M., Bu G., Holtzmann D., Getz G.S. 2000. Lipoproteins in the Central Nervous System *Ann NY Acad Sci* **903**: 167–175
72. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
73. Lange Y., Ye J., Rigney M., Steck T.L. 1999 Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J. Lip Res.* **40**: 2264-2270
74. Langlois M.R. and Delanghe J.R. 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin. Chem.* **42**: 1589-1600.
75. Lee M.Y., Kim S.Y., Choi J.S., Lee I.H., Choi Y.S., Jin J.Y., Park S.J., Sung K.W., Chun M.H., Kim I.S. 2002 Upregulation of haptoglobin in reactive astrocytes after transient forebrain ischemia in rats. *J Cereb. Blood Flow Metab.* **22**:1176-1180
76. Leoni V. and Caccia C. 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* **164**:515–24.
77. Leoni V. and Caccia C. 2012. 24S-hydroxycholesterol in plasma: A marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. *Biochimie* **95**: 595-612
78. Lin C.Y. and Morel D.W. 1996. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. *J. Lip. Res.***37**: 168-178.
79. Lund E.G., Xien C., Kotti T., Turley S.D., Dietschy J.M., Russell D.W., 2003. Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals a Brain-specific Mechanism of Cholesterol Turnover. *J. Biol. Chem.* **278**: 22980–22988
80. Lütjohann D., Breuer O., Ahlborg G., Nennesmo I., Sidén Å and Diczfalusy U. 1996. Cholesterol homeostasis in human brain: Evidence for an age-dependent flux of 24-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* **93**: 9799-9804.
81. Mendez A.J., Oram J.F., Bierman E.L. 1991. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **266**:10104-10111.
82. Möckel B., Zinke H., Flach R., Weiss B., Weiler-Güttler H., Gassen H.G. 1994. Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium in vitro. *J. Neurochem.* **62**: 788-98

83. Nisticò R., Piccirilli S., Cucchiaroni M.L., Armogida M., Guatteo E., Giampà C., Fusco F.R., Bernardi G., Nisticò G., Mercuri N.B. 2008. Neuroprotective effect of hydrogen peroxide on an in vitro model of brain ischaemia. *Br J Pharmacol.* **153**:1022-9
84. O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021
85. Ohyama Y., Meaney S., Heverin M., Ekström L., Brafman A., Shafir M., Andersson U., Olin M., Eggertsen G., Diczfalusy U., Feinstein E., Björkhem I. 2006. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J. Biol. Chem.* **281**:3810-20
86. Oram J.F., Mendez A. J., Slotte J. P., Johnson T. F. 1991. High density lipoprotein apolipoproteins mediate removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol loaded fibroblasts. *Atheroscler. Thromb.* **11**: 403-414.
87. Papassotiropoulos A., Lütjohann D., Bagli M., Locatelli S., Jessen F., Buschfort R., Ptok U., Björkhem I., von Bergmann K. and Heun R. 2002. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J. Psychiatr. Res.* **36**: 27-32
88. Pfrieger FW. 2003. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta* **1610**: 271-280.
89. Piran U., Nishida T. 1979. Utilization of various sterols by lecithin:cholesterol acyltransferase as acyl acceptors. *Lipids.* **14**: 478-482.
90. Poli G., Biasi F., Leonarduzzi G. 2013. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology* **1**: 125-130.
91. Prasanthi J.R., Huls A., Thomasson S., Thompson A., Schommer E., Ghribi O. 2009. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Neurodegener.* **4**: 1
92. Puglielli L., Tanzi R.E., Kovacs D.M., 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.* **6**: 345–351.
93. Rader D.J., Alexander E.T., Weibel G.L., Billheimer J., Rothblat G.H. 2009. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J. Lip. Res* **50**: s189-s194.



94. Radhakrishnan A., Ikeda Y., Kwon H.J., Brown M.S., and Goldstein J.L. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 6511-6518
95. Rebeck G.W., Alonzo N.C., Berezovska O., Harr S.D., Knowles R.B., Growdon J.H., Hyman B.T., Mendez A.J. 1998. Structure and functions of human cerebrospinal fluid lipoproteins form individual with different ApoE genotypes. *Experimental Neurol.* **149**:175-1182
96. Reiber H., Ruff M., Uhr M. 1993. Ascorbate concentration in human cerebrospinal fluid (CSF) and serum. Intrathecal accumulation and CSF flow rate. *Clin. Chim. Acta* **217**:163-173
97. Repa J.J., Mangelsdorf D.J. 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 459-481.
98. Russel D.W. 2000. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* **1529**:126–35.
99. Rye K.A., Bright R., Psaltis M., and Barter P.J. 2006. Regulation of reconstituted high density lipoprotein structure and remodeling by apolipoprotein E. *J. Lip. Res.* **47**: 1025-1036
100. Sabatè R. and Estelrich J. 2005. Stimulatory and inhibitory effects of alkyl bromide surfactants on  $\beta$ -amyloid fibrillogenesis. *Langmuir* **21**: 6944-6949.
101. Salvatore A., Cigliano L., Bucci E.M., Corpillo D., Velasco S., Carlucci A., Pedone C., Abrescia P. 2007. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl transferase. *Biochemistry* **39**: 11158-68
102. Saotome K., Morita H., Umeda M. 1989. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicol in vitro.* **3**: 317-321.
103. Schönknecht P., Lütjohann D., Pantel J., Bardenheuer H., Hartmann T., von Bergmann K., Beyreuther K., Schröder J. 2002. Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosc. Lett.* **324**: 83-85
104. Shojania A.M., Jain S.K., Shohet S.B. 1983. Hereditary lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency. Report of 2 new cases and review of the literature. *Clin. Invest. Med.* **6**: 49-55.

105. Simons K. and Ikonen E. 2000. How cells handle cholesterol. *Science* **290**: 1721-1726.
106. Simons M., Keller P., DeStrooper B., Beyreuther K., Dotti C.G., Simons K., 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6460-6464.
107. Smith L.L., Teng J.I., Lin Y.Y., Seitz P.K. 1981. Sterol metabolism XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J. Steroid. Biochem.* **14**: 889-900.
108. Snipes G.J. and Suter U. 1997. Cholesterol and myelin. *Subcell Biochem* **28**: 173-204.
109. Sorci-Thomas M.G., Curtiss L., Parks J.S., Thomas M.J. Kearns M.W. 1997. Alteration in apolipoprotein A-1 22-mer repeat order results in a decrease lecithin:cholesterol acyltransferase reactivity. *J Biol. Chem.* **272**: 7278-7284.
110. Spagnuolo M.S., Cigliano L., D'Andrea L.D., Pedone C., Abrescia P. 2005. Assignment of the binding site for haptoglobin on apolipoprotein A-I. *J Biol. Chem.* **280**:1193-8.
111. Subbiaiah P.V. and Liu M., 1996. Disparate effects of oxidation on plasma acyltransferase activities: inhibition of cholesterol esterification but stimulation of transesterification of oxidized phospholipids. *Bioch. Biophys. Acta* **1301**: 115-126
112. Szedlaczek S.E., Wasowicz E., Hulea S. A., Nishida H.I., Kummerow F. A., Nishida T. 1995. Esterification of oxysterols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**: 11812-11819.
113. Tabas I. 2002. Cholesterol in health and disease. *J Clin. Invest.* **110**: 583–590
114. Tall A., Granot E., Brocia R., Tabas I., Hesler C., Williams K., Denke M. 1987. Accelerated transfer of cholesteryl esters in dyslipidemic plasma. Role of cholesteryl ester transfer protein. *J Clin. Invest.* **79**: 1217–1225
115. Tall, A.R. 1993. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lip. Res* **34**: 1255-1274.
116. Tallaksen C.M., Bøhmer T., Bell H. 1992. Concentrations of the water-soluble vitamins thiamin, ascorbic acid, and folic acid in serum and cerebrospinal fluid of healthy individuals. *Amer J Clin. Nutr.* **56**: 559-564
117. Tanigawa H., Billheimer J.T., Tohyama J., Fuki I.V., Ng D.S., Rothblat G.H., Rader D.J. 2009. Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* **120**:160-9.

118. Teisberg P. and Gjone E. 1981. Genetic heterogeneity in familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. *Acta Med. Scand.* **210**: 1-2.
119. Teng J.I. and Smith L.L. 1975. Sterol metabolism XXXVI. Hydroxy-cholesterol esters of the human aorta. *Texas Rep. Biol. Med.* **33**: 293-301.
120. Testa G., Gamba P., Di Scipio F., Sprio A.E., Salamone P., Gargiulo S., Sottero B., Biasi F., Berta G.N., Poli G. Leonarduzzi G. 2012. Potentiation of amyloid-b peptide neurotoxicity in human dental neuron-like cells by the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Free Rad. Biol. Med.* **53**:1708-1717
121. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354
122. Vance J.E. 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis. Mod. Mech.* **5**:746-755.
123. Wang K., Subbiaiah P.V. 2000. Importance of the free sulfhydryl groups of lecithin-cholesterol acyltransferase for its sensitivity to oxidative inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**: 268-277
124. Wang Y., Muneton S., Sjövall J., Jovanovic J.N., Griffiths W.J. 2008. The effect of 24S-hydroxycholesterol on cholesterol homeostasis in neurons: quantitative changes to the cortical neuron proteome. *J. Proteome Res.***7**:1606-1614
125. Whitney K.D., Watson M.A., Collins J.L., Benson W.G., Stone T.M., Numerick M.J., Tippin T.K., Wilson J.G., Wineagar D.A., Kliwer S.A. 2002. Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol Endocrinol.* **16**: 1378-1385.
126. Wilson H.M., Griffin B.A., Watt C., Skinner E.R. 1992. The isolation and characterization of high-density-lipoprotein subfractions containing apolipoprotein E from human plasma. *Biochem. J.* **284**: 477-481.
127. Wood A.J., Harrington R.C., Moore A. 1996. Controlled trial of a brief cognitive-behavioural intervention in adolescent patients with depressive disorders. *J Child Psychol Psychiatry* **37**: 737-746.
128. Xie C., Lund E.G., Turley S.D., Russell D.W., Dietschy J.M. 2003. Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *J. Lip. Res* **44**: 1780-1789.

129. Yamanaka K., Saito Y., Yamamori T., Urano Y., Noguchi N. 2011. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J. Biol. Chem.***286**: 24666-24673.
130. Zhang Y., Appelkvist E.L., Kristensson K, Dallner G. 1996. The lipid composition of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiol. Aging* **17**: 869-75.
131. Zhao X., Song S., Sun G., Strong R., Zhang J., Grotta J.C., Aronowski J. 2009. Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. *J Neurosci.* **29**:15819-2
132. Zhao Y., Thorngate F.E., Weisgraber K.H., Williams D.L., Parks J.S. 2005. Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry* **44**: 1013-1025
133. Zorich N., Jonas A., and Pownall H.J.1985. Activation of lecithin cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complexes with lipids. *J. Biol. Chem.***260**: 8831-883

## ABBREVIAZIONI

**24(S)OH-C**= 24-idrossicolesterolo

**Ab GAM-HRP**= anticorpi di capra coniugati con perossidasi di rafano anti IgG di topo

**Ab GAR-HRP**= anticorpo di capra coniugato alla perossidasi di rafano anti-IgG di coniglio

**Ab RAG-HRP**= anticorpi di coniglio coniugati con perossidasi di rafano anti IgG di capra

**ABCA1**= ATP-binding cassette A1

**AD**= Alzheimer's disease

**ApoA-I**= apolipoproteina A-I

**ApoE**= apolipoproteina E

**A $\beta$** = Peptidi di  $\beta$ -amiloide

**BBB**= barriera emato-encefalica

**BHT**= butilidrossitoluolo

**C**= colesterolo libero

**CE**= esteri del colesterolo

**CSF**= fluido cerebrospinale

**CVS**= saggio Crystal Violet

**EDTA**= acido etilendiamminotetraacetico

**HDL**= lipoproteine ad alta densità

**HPLC**= cromatografia liquida ad alta pressione

**HPR**= perossidasi di rafano

**Hpt**= aptoglobina

**HSA**= albumina di siero umano

**IL-1- IL-6**= interleuchine 1 e 6

**KBr**= bromuro di potassio

**KOH**= idrossido di potassio

**LCAT**= lecitina-colesterolo acil-transferasi  
**LDL**= lipoproteine a bassa densità  
**LPDS**= siero umano privato di lipoproteine  
**LXR**= Liver X receptor  
**MCI**= Mild Cognitive Impairment  
**NaCl**= cloruro di sodio  
**NBD**= 1-palmitoil-2-{6-[(7-nitro-2-1, 3-benzossadiazolo-4-il) ammino] esanoil}-sn-glicero-3-fosfocolina  
**NS**= non saponificato  
**PBS**= Fosfato Buffer Salino  
**PC**= fosfatidilcolina  
**PKC**= proteina-chinasi C  
**RA**=acido retinoico  
**ROS**= specie reattive dell'ossigeno  
**RTC**= trasporto inverso del colesterolo  
**S**= saponificato  
**SLA**= Sclerosi Laterale Amiotrofica  
**SNC**= sistema nervoso centrale  
**TBS**= Tris Buffer Salino  
**TLC**= cromatografia su strato sottile  
**TNF**= fattore di necrosi tumorale  
**UPLC**= Ultra Performance Liquid Chromatography  
**VLDL**= lipoproteine a densità molto bassa  
**MMSE**= Mini Mental State Evaluation  
**TP**= True Positive  
**FP**= False Positive  
**TN**= True negative  
**FN**= False negative