

LE IPOCOLESTEROLEMIE PRIMITIVE

DAVIDE NOTO - SALVATORE AMATO - EMANUELA FERTITTA - FRANCESCA FAYER - VINCENZA VALENTI - MARIA C. GUELI - UGO DI BLASI - MICHELE PAGANO - ISABELLA NARDI - GASPARE CUSUMANO - PAOLO GULOTTA - ALESSANDRO RAFFA - TIZIANA DOVERI - MAURIZIO R. AVERNA

Università degli Studi di Palermo - Dipartimento di Medicina Clinica e Patologie Emergenti - (Direttore: Prof. A. Notarbartolo)

[Primitive hypocholesterolemia]

RIASSUNTO

La ipocolesterolemia è caratterizzata da un fenotipo biochimico determinato dalla presenza di livelli di colesterolo o apolipoproteina B inferiori al 5° percentile della distribuzione plasmatica. Le forme primitive, su base genetica, rappresentano quelle in cui il tratto fenotipico viene trasmesso verticalmente in un nucleo familiare. I difetti genetici alla base della ipocolesterolemia familiare sono molteplici, determinando una notevole eterogeneità clinica e fenotipica.

Negli ultimi anni nuove acquisizioni nel campo della genetica hanno consentito di caratterizzare i difetti molecolari alla base di tale patologia, sebbene in diversi nuclei familiari il difetto genetico non è stato ancora accertato. In questo articolo saranno illustrati i difetti genetici ed i quadri clinici delle più comuni forme genetiche fin ora identificate.

Parole chiave: Gene dell'apoB, geni candidati, mutazioni

SUMMARY

Hypobetalipoproteinemia (HBL) is characterized by cholesterol levels below the 5th percentile of the population distribution. Familial HBL (FHBL) is characterized by an inherited HBL trait within a family.

In the last years gene defects underlying some cases of FHBL, but not all, have been identified. The molecular basis of some gene defect and the clinical onset of FHBL are presented in this paper.

Key words: ApoB gene, candidate genes, mutations

Introduzione

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

Esistono tre tipi di deficit lipoproteici su base ereditaria, caratterizzati da ipocolesterolemia:

- la Sindrome di Anderson o "Chylomicron Retention Disease";
- la Sindrome di Bassen-Konzweig o Abetalipoproteinemia;
- la Ipobetalipoproteinemia Familiare (FHBL).

Malattia di Anderson

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

L'endoscopia mostra generalmente alterazioni tipiche della mucosa intestinale. Nel plasma dei soggetti affetti si nota assenza di lipoproteine contenenti apoB-48 e assenza di chilomicroni in fase postprandiale, mentre è possibile rilevare la presenza di lipoproteine contenenti apoB-100, sebbene in quantità ridotte. Inoltre risultano ridotti i livelli plasmatici di HDL, come i livelli totali di lipidi, colesterolo, fosfolipidi, carotenoidi e vitamine liposolubili.

Appare normale l'assorbimento degli acidi grassi e la loro esterificazione da parte delle cellule epiteliali.

Studi istologici condotti su biopsie intestinali hanno rilevato che i villi sono normalmente rappresentati e con lunghezza normale ma gli enterociti sono carichi di vacuoli contenenti materiale adiposo⁽¹⁾.

L'introduzione di una dieta a basso tenore di lipidi, integrata con vitamine liposolubili (A ed E) ed acidi grassi essenziali provoca una ripresa della crescita ed una attenuazione dei sintomi gastrointestinali. Recentemente sono state definite le basi molecolari responsabili della sindrome di Anderson; mutazioni del gene SARA2, nel cromosoma 5q31.1, codificante per la proteina Sar1b sono state associate a questo fenotipo⁽¹⁾.

La proteina Sar1-b è una proteina regolatrice legante il GTP, responsabile del complesso di rivestimento delle vescicole COPII adibite al trasporto delle particelle dal RER al Golgi. Le varianti attualmente descritte nel gene SARA2 sono mutazioni missenso che causano in Sar1b alterazioni della conformazione nella tasca di legame per il GTP, riducendo di conseguenza l'affinità di legame con lo stesso GTP e bloccando la formazione delle vescicole COP II.

Abetalipoproteinemia

L'Abetalipoproteinemia è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da livelli estremamente bassi di colesterolo totale (20-50mg/dl), LDL-C ed apoB, con malassorbimento dei grassi, retinite pigmentosa, atassia, neuropatia ed acantocitosi. Nel plasma dei soggetti affetti si osserva assenza di lipoproteine contenenti apoB, lipoproteine a bassissima densità (VLDL) e lipoproteine a bassa densità (LDL). Inoltre si ha un ridotto trasporto e assorbimento di grassi che ha come conseguenza un bassissimo livello di colesterolo nel plasma⁽²⁾.

Nei bambini si presenta con steatorrea ed assenza della crescita, in giovani adulti vi può essere un declino neurologico con perdita dei riflessi tendinei. I gravi problemi neurologici sono dovuti ad un deficit, reversibile, nell'assorbimento di vitamina E⁽³⁾.

I difetti a carico della retina sono invece dovuti all'assenza combinata della vitamina A ed E. Il trattamento con la vitamina A nel primo stadio della malattia può ripristinare le funzioni della retina ma non ne può bloccare la graduale e progressiva degenerazione. Studi recenti hanno indicato che il difetto molecolare risiede nel gene codificante per la "Trygliceride Microsomal Transfer Protein" (MTP)

localizzato nel cromosoma 4q22-24 ed organizzato in 18 esoni⁽⁴⁾.

Delezioni dell'estremità C-terminale, di 30 amminoacidi, possono abolire l'attività dell'MTP o sopprimere la dimerizzazione con il protein disulphide isomerase (PDI) responsabile della stabilizzazione del complesso⁽⁴⁾.

Altre mutazioni permettono il legame con il PDI ma non hanno la capacità di trasferire i lipidi, questo dimostra che il dominio C-terminale contiene l'attività catalitica del complesso MTP. L'assenza completa di MTP nel topo è letale; l'inattivazione fegato-specifica del gene MTP elimina la produzione delle VLDL ed LDL⁽⁵⁾.

Inibendo farmacologicamente l'attività del complesso MTP si osserva sia in vitro che in vivo, una inibizione dose-dipendente della secrezione di lipoproteine contenenti apoB. La iper espressione dell'MTP negli epatociti stimola la produzione di apoB⁽⁶⁾.

Ipobetalipoproteinemia familiare

L'(FHBL) è una malattia genetica a trasmissione autosomica co-dominante caratterizzata da bassi livelli plasmatici di colesterolo ed apolipoproteina B⁽⁷⁾

Il fenotipo FHBL può derivare da due tipi di difetti molecolari: difetti legati al gene apoB o indipendenti da questo gene. La FHBL dovuta a mutazioni del gene apoB può essere associata alla presenza (forme visibili) o assenza (forme invisibili) di forme troncate di apoB evidenziabili nelle lipoproteine plasmatiche. La presenza nel plasma di apoB troncate è funzione della loro lunghezza.

Le forme troncate di apoB vengono identificate secondo la nomenclatura in centili; la proteina matura costituita da 4536 amminoacidi è denominata apoB-100 e le forme tronche vengono identificate con il numero percentuale di amminoacidi che le costituiscono rispetto alla proteina matura. ApoB troncate di dimensioni inferiori ad apo B-25/B-27 (cioè con dimensioni corrispondenti al 25-27% dell'apoB-100) non sono evidenziabili nel plasma in quanto non secrete in forma di lipoproteine⁽⁷⁾.

L'assenza di forme troncate di apo B visibili nelle lipoproteine plasmatiche può derivare da diversi fattori:

- mutazioni che determinano la formazione di apoB troncate di dimensioni inferiori al 25-27% della apoB matura (apoB-25/B-27);
- mutazioni del gene apoB che determinano

modificazioni della sequenza amminoacidica dell'apoB tali da prevenire l'assemblaggio intracellulare di lipoproteine o aumentare il catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB.

Nei soggetti affetti da FHBL, eterozigoti per mutazioni del gene dell'apoproteina B, circolano nel plasma almeno due popolazioni di particelle lipoproteiche contenenti apoB, quelle di sintesi epatica normale (VLDL, IDL e LDL) contenenti apoB-100, e lipoproteine contenenti le forme di apoB troncate di sintesi epatica o epatica ed intestinale^(2,8).

Le forme troncate di apoB più corte dell'apoB 48 sono sintetizzate sia dal fegato che dall'intestino, mentre le forme troncate più lunghe dell'apoB-48 vengono probabilmente sintetizzate soltanto dal fegato e, le concentrazioni di apoB-100 nel plasma in pazienti con FHBL sono minori dell'atteso 50%⁽⁹⁾ proveniente dalla sintesi dell'allele normale dell'apoB.

Diversi studi hanno evidenziato che questa minore secrezione possa essere dovuta ad una ridotta sintesi^(8,9), e la minore sintesi di apoB troncate possa essere dovuta sia ad una maggiore degradazione dell'mRNA mutato⁽⁷⁾, sia anche perché le particelle lipoproteiche contenenti le forme troncate di apoB vengono eliminate molto più rapidamente rispetto alle particelle che presentano la proteina matura^(8,9).

Tutte le mutazioni, eccetto una, del gene dell'apoB riportate fino ad ora (circa 40 diverse mutazioni) in soggetti con FHBL determinano la sintesi di forme troncate dell'apoB⁽⁷⁾. In particolare secondo studi condotti da Fouchier et al.⁽¹⁰⁾ su famiglie olandesi e spagnole, la prevalenza di mutazioni del gene dell'apoB responsabili di fenotipi FHBL dovute a forme troncate, è di circa il 52%.

Da tutti gli studi condotti è emerso comunque che il gene dell'apoB è responsabile solo in parte del fenotipo FHBL, altre cause sono da attribuire a mutazioni localizzate su altri geni. La possibilità di forme di FHBL non legate al gene apoB trova inoltre riscontro, nell'osservazione che in alcune grandi famiglie l'analisi dell'aplotipo ha dimostrato una assenza di co-segregazione del fenotipo FHBL con il gene apoB.

Queste forme di FHBL possono essere dovute a difetti di altri geni che controllano l'assemblaggio, la secrezione o il catabolismo delle lipoproteine contenenti apoB. Un "wide genome scan" per la ricerca di nuovi loci di suscettibilità per FHBL è stato condotto da Pulai et al. su una famiglia di 38 individui⁽¹¹⁾. La prima fase di genotipizzazione, uti-

lizzando un set di 387 marcatori cromosomici tetra, tri e dinucleotidici con un potere di risoluzione di 10 CM, è stata condotta presso il Marshfield Medical Research Foundation, Marshfield, WI.

Successive analisi di linkage hanno mostrato l'esistenza di questa associazione in altre sei famiglie con FHBL. Per circoscrivere il locus di suscettibilità, è stata condotta un'analisi dell'aplotipo in una delle famiglie dove era presente un fenomeno di cross over nella regione critica. Questa analisi è riuscita a circoscrivere la regione di suscettibilità da 10cM a 2cM⁽¹²⁾, nella regione 3p21.

Knoblauch et al., hanno identificato una famiglia araba (la famiglia è costituita da 96 individui fenotipizzati e genotipizzati) con Ipercolesterolemia Familiare (FH), in cui i soggetti affetti avevano concentrazioni normali di LDL e non avevano segni di malattia aterosclerotica. La mutazione del LDL-recettore (LDL-R) in questa famiglia è stata identificata ed il difetto risiede nella coda citoplasmica del recettore e causa un difetto di internalizzazione con attività quasi assente del LDL-R. Knoblauch et al. hanno verificato l'ipotesi che in questa famiglia vi fosse un gene responsabile dei bassi livelli di colesterolo per mezzo di analisi di linkage. In effetti un locus genico è presente sul cromosoma 13q (tra i marcatori D13S254 e D13S129).

Con questo si è dimostrata dell'esistenza di un linkage tra un locus sul cromosoma 13q responsabile di bassi livelli di LDL inattesi in soggetti affetti da FH⁽¹³⁾. Clinicamente, i soggetti eterozigoti sono solitamente asintomatici; i soggetti omozigoti possono essere asintomatici o possono presentare caratteristiche fenotipiche e cliniche molto simili ai soggetti con abetalipoproteinemia⁽²⁾.

In colture primarie di epatociti di topo geneticamente modificato per ricombinazione omologa, esprime un fenotipo FHBL eterozigote con produzione di apoB troncata, è stato dimostrato che l'accumulo di trigliceridi e la formazione quindi di "fatty liver" è dovuta ad una diminuita capacità di "export" di apoB troncata e trigliceridi⁽²⁾. Le mutazioni del gene dell'apoB responsabili di FHBL⁽²⁾ sono generalmente responsabili della sintesi di varie forme troncate di apoB.

Recentemente Burnett J.R. et al.,⁽¹⁴⁾ hanno identificato una mutazione missenso del gene dell'apoB non associata ad una forma troncata, la R463W, responsabile di Ipoabetalipoproteinemia Familiare.

Esperimenti in vitro hanno dimostrato che questa mutazione è responsabile di un aumento

della degradazione cellulare dell'apoB, probabilmente interferendo con il dominio di riconoscimento dell'apoB per la MTP.

Infatti l'amminoacido 463 si trova all'interno del dominio 1 dell'apoB che contiene elementi importanti per il corretto folding della proteina, per l'interazione del complesso MTP con l'apoB e per l'assemblaggio delle lipoproteine.

Bibliografia

- 1) Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. *Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders.* Nat Genet. 2003 May; 34(1): 29-31.
- 2) Kane JP, Havel RJ. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D., eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* Vol. II. 7th ed. New York, McGraw Hill, 1995; 1853-1885.
- 3) Kayden HJ, Traber MG. *Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans.* J Lipid Res 1993. 34: 343-358.
- 4) Sharp D, Ricci B, Kiennzle B, Lin MC, Wetterau JR. *Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure.* Biochemistry 1994. 33: 9057-9061.
- 5) Chang BH-J, Liao W, et al. *Liver specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse.* J. Biol. Chem. 1999; 274: 6051-6055.
- 6) Liao W, Yeung S-CJ, Chan L. *Proteasome-mediated degradation of apolipoprotein B targets both nascent peptides cotranslationally before translocation and full-length apolipoprotein B after translocation into the endoplasmic reticulum.* J Biol Chem. 1998; 273: 27225-27230.
- 7) Schonfeld G. *Familial hypobetalipoproteinemia: a review.* J. Lipid Res. 2003. 44, 878-883.
- 8) Krul ES, Tang J, Kettler TS, Clouse RE, Schonfeld G. *Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production.* Biochemical & Biophysical Research Communications. 1992, 189(2): 1069-76.
- 9) Parhofer KG, Barret PHR, Aguilar-Salinas CA, Schonfeld G. *Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in human apoB-89, apoB-75, apoB-54.8, and apoB-31 heterozygotes.* J Lipid Res 1996. 37: 844-852.
- 10) Fouchier SW, Sankatsing RR, Peter J, Castillo S, Pocovi M, Alonso R, Kastelein JJ, Defesche JC. *High frequency of APOB gene mutations causing familial hypobetalipoproteinemia in patients of Dutch and Spanish descent.* J Med Genet. 2005 Apr; 42(4): e 23.
- 11) Pulai JJ, Neuman RJ, Groenewegen AW, Wu J, Schonfeld G. *Genetic heterogeneity in familial hypobetalipoproteinemia: linkage and non-linkage to the apoB gene in Caucasian families.* American Journal of Medical Genetics 1998. 76(1): 79-86.
- 12) Neuman RJ, Yuan B, Gerhad DS, Liu KY, Yue P, Duan S, Aversa M, Schonfeld G. *Familial hypobetalipoproteinemia found linked to chromosome 3p in 6 kindreds.* J Lipid Res 2002; 43: 407-415.
- 13) Knoblauch H, Muller-Myhsok B, Busjahn A, et al. *A cholesterol-lowering gene maps to chromosome 13q.* Am J Hum Genet 2000; 66(1): 157-66.
- 14) Burnett JR, Shan J, Miskie BA, Whitfield AJ, Yuan J, Tran K, McKnight CJ, Hegele RA, Yao Z. *A novel non-truncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia.* J Biol Chem. 2003 Apr 11; 278(15): 13442-52.

Request reprints from:

Dott. MAURIZIO R. AVERNA
 Department of Clinical Medicine and Emerging Disease
 Via del Vespro, 141
 90127 Palermo
 (Italy)