

**DOTTORATO di RICERCA in SCIENZE BIOMEDICHE XXIX CICLO  
(15° CICLO) - CURRICULUM GENERICO -**

**COORDINATORE PROF. ANDREA GIACOMETTI**



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE, SPECIALISTICHE ED  
ODONTOSTOMATOLOGICHE (DISCO)**

**Tutor : Prof. FERRETTI GIANNA**

**Dottoranda : ANTONIETTA URBANO**

**Titolo della tesi :**

**HDL, stress ossidativo e patologie neurodegenerative : Ruolo  
dell'enzima antiossidante paraoxonasi.**

# INDICE

<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
1. Il morbo di Alzheimer.....	8
1.1 Epidemiologia del morbo di Alzheimer.....	8
1.2 Morbo di Alzheimer.....	12
1.3 Cause e diagnosi della malattia.....	14
1.4. Alterazioni macroscopiche e microscopiche.....	18
1.4.1 Placche Senili .....	19
1.4.2 Grovigli Neurofibrillari.....	20
1.4.3 Genesi del peptide $\beta$ -Amiloide: aspetti strutturali e funzionali nel morbo di Alzheimer.....	21
1.4.4 Formazione e clearance dell' $A\beta$ .....	22
2. Perossidazione lipidica: ruolo nel morbo di Alzheimer .....	26
3. Lipoproteine ad alta densità: ruolo nelle patologie neurodegenerative...32	
3.1 Composizione lipidica e caratteristiche chimico-fisiche .....	32
3.2 HDL: composizione e funzione.....	39
3.2.1 Composizione apoproteica .....	39
3.2.2 Metabolismo e rimodellamento delle HDL.....	41
3.2.3 Funzioni delle HDL.....	44

4. Paraoxonasi: enzima-chiave per la funzionalità delle HDL.....	51
4.1 Sequenza aa e struttura.....	51
4.2 Attività della paraoxonasi e funzionalità delle HDL :	
HDL disfunzionali.....	54
4.3 Fattori che modulano l'attività di PON-1 .....	57
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>60</b>
<b>RISULTATI .....</b>	<b>70</b>
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>85</b>

# SCOPO DELLA TESI

La malattia di Alzheimer è la più comune causa di demenza nel mondo. Il 50-70% delle persone affette da demenza soffrono di malattia di Alzheimer. Si tratta di un processo degenerativo cerebrale che provoca un declino progressivo e globale delle funzioni intellettive, associato ad un deterioramento della personalità e della vita sociale. Il morbo di Alzheimer (AD) è associato con lo stress ossidativo e il processo infiammatorio. Nel plasma e nel fluido cerebrospinale dei pazienti è stato riportato un significativo incremento dei markers dell'ossidazione lipidica, proteica e degli acidi nucleici (*Schrang et al. 2013; Zhao et al. 2013; Pandurariu M. et al. 2013*). Elevati livelli di markers di danno ossidativo sono stati dimostrati in biopsie cerebrali di pazienti post-mortem. Lo stress ossidativo è favorito da alterazioni dei sistemi enzimatici di difesa antiossidante e da uno squilibrio nei livelli di alcuni metalli tra cui alluminio, rame e ferro. A livello cerebrale, il morbo di Alzheimer è caratterizzato dalla presenza di placche senili (SP), costituite dal peptide  $\beta$  Amiloide ( $A\beta$ ), e da grovigli neurofibrillari (NFT) della proteina Tau iperfosforilata, associata ai microtubuli (MAPT) (*Braak H. et al., 1991*). È noto che, il peptide  $A\beta$  svolge un ruolo chiave nella fisiopatologia dell'Alzheimer innescando una complessa cascata patologica che porta alla neurodegenerazione (*Gold T.E. et al 2013*), ed è probabile che svolga questo ruolo nei primi anni di insorgenza dei disordini neurodegenerativi. In studi precedenti è stato dimostrato che pazienti affetti da AD hanno alti livelli plasmatici di lipoproteine a bassa densità ossidate (ox-LDL) (*Bacchetti T. et al., 2015*). Oltre a ciò è stata notata una minore attività dell'enzima paraoxonasi-1 (PON1) nel plasma di pazienti affetti da AD comparati con controlli dello stesso range di età. La PON1 associata alle HDL è l'enzima responsabile dell'attività anti-infiammatoria e antiossidante delle HDL stesse (*Goswami et al., 2009; Kim DS et al., 2013*). Si è pertanto ipotizzato che le HDL dei pazienti mostrino alterazioni delle loro funzioni protettive.

Lo scopo della tesi consiste in una prima parte in un esame della letteratura sul ruolo del danno ossidativo e delle lipoproteine nella insorgenza del morbo di Alzheimer. Nella parte sperimentale

sono state investigate le alterazioni funzionali dell'HDL e l'attività della HDL- paraoxonasi-1. Inoltre, utilizzando le cellule endoteliali microvascolari (HMEC), è stata valutata la capacità delle HDL, isolate dal plasma dei controlli e dei pazienti AD, di proteggere dalla tossicità del peptide  $\beta$  Amiloide.

## ***Abbreviazioni***

SP : placche senili

A $\beta$ : peptide  $\beta$ -amiloide

NFT : Grovigli neurofibrillari della proteina Tau iperfosforilata

AD : Malattia di Alzheimer

PON-1 : Paraoxonasi-1

HMEC : Cellule endoteliali microvascolari

APP : Proteina precursore dell'amiloide

B-APP ( BACE1 ) : enzima di taglio della APP per formare il peptide  $\beta$ -amiloide

TBARS : 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances

# **INTRODUZIONE**

# ***1. Il morbo di Alzheimer***

## ***1.1 Epidemiologia del morbo di Alzheimer***

La malattia di Alzheimer fu descritta per la prima volta nel 1907 dal neuropatologo Alois Alzheimer (1863-1915).

Il paziente a cui per primo Alzheimer diagnosticò la malattia si chiamava Auguste Deter, una donna di 51 anni che manifestava diversi sintomi fra cui la perdita di memoria a breve termine. Alzheimer seguì con grande attenzione il caso Deter, impegnandosi in prima persona. Dopo la morte della donna, Alzheimer – con l'aiuto di altri medici tra cui l'italiano Gaetano Perusini – condusse l'autopsia e scoprì che il cervello manifestava una serie di anomalie che indicavano che la malattia aveva una causa "fisica". Dopo una serie di studi su altri casi, Alzheimer presentò nel 1907 i suoi risultati al Convegno psichiatrico di Tübingen, ma le sue convinzioni vennero accolte con scetticismo. Soltanto nel 1910 la malattia ebbe un nome, quando Emil Kraepelin, il più famoso psichiatra di lingua tedesca dell'epoca, ripubblicò il suo trattato "Psichiatria", nel quale definiva una nuova forma di demenza scoperta da Alzheimer, chiamandola appunto malattia di Alzheimer, da qui il termine si diffuse in tutta la comunità medica.

La malattia di Alzheimer è la più comune causa di demenza nel mondo. Il 50-70% delle persone affette da demenza soffrono di malattia di Alzheimer (*Figura 1*).

Si tratta di un processo degenerativo cerebrale che provoca un declino progressivo e globale delle funzioni intellettive, associato ad un deterioramento della personalità e della vita sociale. Progressivamente, l'ammalato perde l'autonomia nell'esecuzione degli atti quotidiani della vita e diventa completamente dipendente dagli altri. La malattia si può estendere tra gli 8 e i 15 anni. I sintomi possono essere: perdita rilevante della memoria (amnesia); cambiamenti di comportamento e alterazione della personalità; perdita d'iniziativa e d'interesse; problemi di linguaggio (afasia);



confusione; perdita di orientamento nello spazio e nel tempo; incapacità a riconoscere persone, cose e luoghi (agnosia); incapacità a compiere atti quotidiani della vita come lavarsi, vestirsi, mangiare (aprassia); deliri e/o allucinazioni; totale dipendenza da chi assiste.

Secondo il World Alzheimer Report 2016 della federazione internazionale Alzheimer's Disease International (Adi) in tutto il mondo oltre 47 milioni di persone sono affette da demenza. La demenza è in crescente aumento nella popolazione generale ed è stata definita secondo il Rapporto OMS una priorità mondiale di salute pubblica: “ nel 2010 35,6 milioni di persone risultavano affette da demenza con stima di aumento del doppio nel 2030, il triplo nel 2050, con ogni anno 7,7 milioni di nuovi casi (1 ogni 4 secondi) e una sopravvivenza media dopo la diagnosi di 4-8-anni. La stima dei costi è di 604 mld di dollari/anno con incremento progressivo e continua sfida per i sistemi sanitari. Tutti i Paesi devono includere le demenze nei loro programmi di salute pubblica; a livello internazionale, nazionale regionale e locale sono necessari programmi e coordinamento su più livelli e tra tutte le parti interessate". (Ginevra 11 aprile 2012).

Alcuni considerano solo la presenza di una lieve o severa demenza come indici rilevanti del morbo di Alzheimer, mentre altri includono una forma intermedia di demenza. Lo studio più accreditato indica che la demenza, intermedia o grave, colpisce il 15 % della popolazione oltre i 60 anni.

La prevalenza della demenza nei paesi industrializzati è circa dell' 8% negli ultrasessantacinquenni e sale ad oltre il 20% dopo gli ottanta anni. Secondo alcune proiezioni, i casi potrebbero triplicarsi nei prossimi 30 anni nei paesi occidentali.

L'Italia è uno dei paesi europei più anziani (età uguale o superiore a 65 anni) e quasi il 17% della popolazione, per un totale di 9,5 milioni, ha superato i 65 anni di età. Sono pertanto in aumento tutte le malattie croniche, in quanto legate all'età, e tra queste le demenze.

In Europa, secondo dati ISTAT al 1° gennaio 2013, l'Italia si colloca al secondo posto dopo la Germania, con un numero di anziani, di età uguale o superiore ai 65 anni, di 12.639.000, pari al 21,2% della popolazione totale. Anche l'indice di vecchiaia, definito come il rapporto percentuale tra la popolazione in età anziana (65 anni e più) e la popolazione in età giovanile (meno di 15 anni),

colloca l'Italia al secondo posto in Europa dopo la Germania, con un rapporto di 144 anziani ogni 100 giovani. Le proiezioni demografiche mostrano una progressione aritmetica di tale indicatore fino a giungere nel 2051 per l'Italia a 280 anziani per ogni 100 giovani. Il progressivo incremento della popolazione anziana comporterà un ulteriore consistente aumento della prevalenza dei pazienti affetti da demenza.

La demenza ha anche un enorme impatto economico.

Per quanto riguarda l'Italia gli affetti da demenza sono circa 1,2 mln e circa la metà sono malati di Alzheimer. Circa 3 milioni sono le persone direttamente o indirettamente coinvolte nell'assistenza dei loro cari.

In molte parti del mondo la consapevolezza della demenza sta crescendo, ma nella maggior parte del globo la diagnosi di tale malattia può condurre a isolamento sociale. Oggi si stima che il 94% delle persone che vivono con la demenza nei paesi a basso e medio reddito sono curati a casa.

In Italia, secondo una ricerca del Censis-Aima, il 18% vive solo con una badante e i costi diretti per l'assistenza superano gli 11 miliardi di euro, di cui il 73% a carico delle famiglie. L'età media dei malati è di 78,8 anni.

Il World Alzheimer Report stima che questi numeri aumenteranno di molto in futuro, e la demenza, incluso il morbo di Alzheimer, una delle maggiori sfide globali per la sanità pubblica e assistenza sociale che le popolazioni dovranno affrontare.

Oggi l'unico modo di una diagnosi certa dell'Alzheimer è attraverso l'identificazione delle placche amiloidi nel tessuto cerebrale, possibile solo con l'autopsia post-mortem. Nonostante i tanti investimenti, non esistono ancora farmaci in grado di fermare e far regredire la malattia e tutti i trattamenti disponibili puntano a contenerne i sintomi.



*Figura 1 : Principali cause di demenza.*

## ***1.2 Morbo di Alzheimer***

Il morbo di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa con molte caratteristiche note, ma sulla quale è ancora aperto il dibattito circa la causa esatta e i meccanismi di progressione. L'AD è la più comune forma di malattia neurodegenerativa ed è la causa primaria della demenza. I fattori che contribuiscono alla progressione della malattia sono molti, ma il fattore primario nella comparsa dell'AD è l'invecchiamento, tuttavia è molto importante distinguere il naturale invecchiamento dall'AD in quanto la maggior parte degli individui non sviluppano la malattia durante la vecchiaia, ma nonostante la medicina continui a progredire e si assista ad aumento della longevità, il tasso di insorgenza sta aumentando. La malattia di Alzheimer è caratterizzata dalla progressiva perdita sia delle capacità cognitive che della memoria a breve termine che a lungo termine portando a completa inabilità e infine a morte.

Il morbo di Alzheimer può manifestarsi, nel corso della vita, in varie forme. Lo stato di avanzamento della patologia viene calcolato con l'aiuto di un test, "Mini Mental State Examination" (MMSE). Consiste in un test di facile e rapida somministrazione, è attendibile nel determinare il grado del deficit cognitivo e nel monitorare la progressione in condizioni di demenza. Il test è composto da 30 item, in parte verbali, in parte di performance, che esplorano orientamento spazio-temporale, memoria a breve termine, attenzione, calcolo mentale, linguaggio (nelle componenti di comprensione, ripetizione, denominazione, lettura e scrittura), aprassia costruttiva; in base alle risposte e allo svolgimento dei test verrà dato un punteggio. Il punteggio può variare da un massimo di 30, cioè il soggetto ha risposto in modo corretto a tutti i quesiti e non mostra alterazioni mnemoniche o di linguaggio, fino ad un minimo di 0, che indica una situazione molto compromessa. Nel caso del morbo di Alzheimer un punteggio 0-9 indica una forma di Alzheimer grave. Sulla base del MMSE, è possibile distinguere 5 forme del morbo di Alzheimer che variano in relazione al fattore età :

- Deterioramento cognitivo lieve (MCI) : con saltuaria perdita della memoria. Le attività

cognitive giornaliere restano intatte e non ci sono evidenze cliniche che fanno presupporre l'avvento del morbo di Alzheimer;

- ⤴ Malattia di Alzheimer lieve : con eventi di smemoratezza, brevi periodi di perdita della memoria, domande ripetute, perdita di interessi, compromissione delle attività giornaliere;
- ⤴ Malattia di Alzheimer moderata : progressione del deficit cognitivo, sindrome disesecutiva, attività ulteriormente deteriorate della vita quotidiana, sviluppo di segni comportamentali della patologia;
- ⤴ Malattia di Alzheimer Severa : agitazione, alterazione del sonno, richiesta di assistenza nel vestire, nell'alimentazione. Stabili segni comportamentali e fisiologici propri del morbo di Alzheimer ;
- ⤴ Malattia di Alzheimer molto Severa : perdita dell'attività cognitiva, incontinenza, perdita delle competenze psicomotorie di base.

Clinicamente, è possibile distinguere due forme della malattia:

- Malattia di Alzheimer a esordio precoce, in pazienti con età inferiore a 65 anni ;
- Malattia di Alzheimer a esordio tardivo, in pazienti con età superiore ai 65 anni

Vige anche un'altra classificazione di questa patologia. In base alle cause del suo sviluppo è possibile distinguere:

1. Morbo di Alzheimer familiare (FAD), causato da mutazioni autosomiche dominanti nel gene del precursore della proteina amiloide (APP) (Goate A et al., 1991) o della presenilina (PS1, PS2) (Schellenberg G.D et al., 1992 ) ;
2. Morbo di Alzheimer sporadico (SAD), che colpisce circa il 98% dei soggetti affetti con cause che rimangono elusive.

Chiaramente, bloccare la progressione della malattia o, nei migliori dei casi, prevenirla offrirebbe notevoli benefici in termini sociali ed economici. Le attuali terapie sono semplicemente palliative e rallentano solo temporaneamente il declino cognitivo.

### ***1.3 Cause e diagnosi della malattia***

L'1-6% tra tutti i casi di morbo di Alzheimer è a esordio precoce (età < 60-65 anni) e il 60% di questi è familiare, principalmente ereditato in modo autosomico dominante ( *Tabella 1*).

CAUSE	% DI CASI
Alterazioni cromosomiche ( Sindrome di Down)	< 1%
Familiari	~ 25%
✦ Morbo di Alzheimer a esordio tardivo	15 - 25%
✦ Morbo di Alzheimer a esordio precoce	< 2%
Sconosciute	~ 75%

***Tabella 1: Principali cause di Alzheimer e relativa incidenza ( Pagon R.A et al., 2012).***

I fattori principali che contribuiscono allo sviluppo della patologia sono fattori genetici; sono, però, molto importanti anche i fattori ambientali (virus, tossine).

Tutti i soggetti affetti da sindrome di Down ( trisomia 21) sviluppano caratteri propri del morbo di Alzheimer dopo i 40 anni (*Margallo-Lana M. et al., 2004*).

Il 25 % dei casi di morbo di Alzheimer è Familiare (due o più membri della famiglia sviluppano la malattia). I casi familiari appaiono avere lo stesso fenotipo patologico e clinico dei casi non familiari e possono essere distinti solo seguendo la storia familiare o tramite test di genetica molecolare. I casi di morbo di Alzheimer familiare possono, inoltre, essere classificati in due distinte categorie: morbo di Alzheimer Familiare a esordio tardivo e morbo di Alzheimer Familiare a esordio precoce.

#### Morbo di Alzheimer Familiare a esordio tardivo (AD2)

Diversi studi supportano il fatto che AD2 è un complesso disordine che include una molteplicità di geni.

- ♣ È documentata l'associazione di una o due copie di APOE allele e4 (genotipo e2\e4,e3\e4,e4\e4) con AD2 (*Jarvik G. et al., 1996*). Con un meccanismo sconosciuto APOE e4 sembra influenzare l'età di esordio della malattia , spostandola verso un'età più precoce (Tabella 2);
- ♣ La variante allelica p.Arg47His in TREM2 è un significativo fattore di rischio. Sebbene questa variante in eterozigosi è molto rara, aumenta la sua incidenza nei soggetti affetti da AD2;

APOE Genotipo	Soggetti normali controlli (n=304)	Individui con AD (n=233)	Individui con AD e storia familiare positiva di Demenza (n=85)
E2/e2	1.3%	0%	0%
E2/e3	12.5%	3.4%	3.5%
E2/e4	4.9%	4.3%	8.2%
E3/e3	59.9%	38.2%	23.5%
E3/e4	20.7%	41.2%	45.9%
E4/e4	0.7%	12.9%	18.8%

**Tabella 2:** Percentuale d'incidenza del genotipo APOE in controlli e soggetti Alzheimer ( Jarvik et al., 1996 ).

▲ Altri potenziali geni sono :

- SORL, coinvolta nel traffico della proteina APP;
- A2M, alpha-2-macroglobulina;
- GST01 e GST02;
- CALHM1, influenza l'omeostasi del calcio e un polimorfismo a singolo nucleotide nella sua sequenza è associato con AD2;
- Clusterina (CLU, APOJ).

Una mutazione in APP (Amyloid Precursor Protein) sembra essere protettiva nei confronti dell'AD2. Tale mutazione (p.Ala673Thr) si presenta nel sito in cui l'enzima di taglio B-APP ( BACE1 ) taglia la proteina precursore dell'amiloide ( APP ) per formare il peptide  $\beta$  Amiloide.



### Morbo di Alzheimer a esordio precoce familiare (EOFAD)

Ad oggi sono stati identificati tre sottotipi di EOFAD (AD1, AD3, AD4).

I geni coinvolti nei rispettivi sottotipi (*Bertam L. et al., 2007*) sono riassunti nella *Tabella 3*.

	Incidenza %	Principale gene coinvolto	Proteina
AD3	20% - 70%	PSEN1	Presenilina-1
AD1	10% - 15%	APP	Proteina Amiloide $\beta$ A4
AD4	Raro	PSEN2	Presenilina-2

**Tabella 3 :** *Incidenza dei tre sottotipi di Alzheimer familiare a esordio precoce con relative percentuali di incidenza e geni coinvolti nella patologia.*

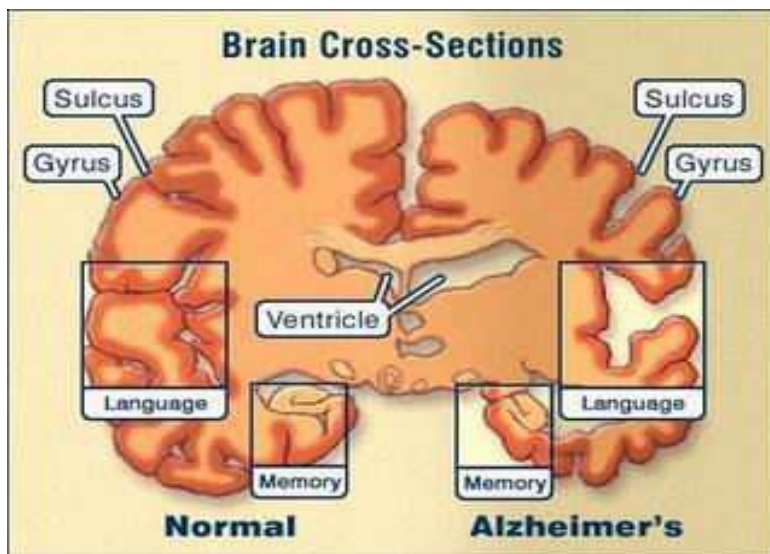
In soggetti con tali mutazioni è evidente una produzione alterata del peptide  $\beta$  amiloide, cambiamenti nella quantità del peptide  $\beta$ 42 rispetto al  $\beta$ 40 e un aumento nella produzione di fibrille. Mutazioni in PSEN1 e PSEN2 sono direttamente correlate alla produzione del peptide amiloide e alterano il taglio di APP da parte della  $\gamma$ -secretasi con conseguente aumento di  $A\beta$  42 rispetto a  $A\beta$  40 (*Bettens K. Et al., 2013*).

Stabilire una diagnosi di Alzheimer implica individuare segni clinici e neuropatologici specifici.

La ricerca di evidenze neuropatologiche da autopsia resta il golden standard per la diagnosi.

## 1.4. Alterazioni macroscopiche e microscopiche

La caratteristica macroscopica più evidente del cervello di un soggetto affetto da malattia di Alzheimer è la marcata atrofia che determina un'aumentata ampiezza dei solchi cerebrali e l'incremento del volume ventricolare, come illustrato in *Figura 2*.



**Figura 2** : Cervello invecchiato di paziente sano e di paziente affetto da malattia di Alzheimer.

L'atrofia è legata principalmente alla degenerazione neuronale, che comporta riduzione del numero di spine dendritiche e di giunzioni sinaptiche, fenomeno determinato da meccanismi apoptotici.

Patologicamente, il morbo di Alzheimer è caratterizzato dalla presenza di placche senili (SP) costituite dal peptide  $\beta$  Amiloide ( $A\beta$ ) e da grovigli neurofibrillari (NFT) della proteina Tau iperfosforilata, associata ai microtubuli (MAPT) (*Braak H. et al., 1991*).

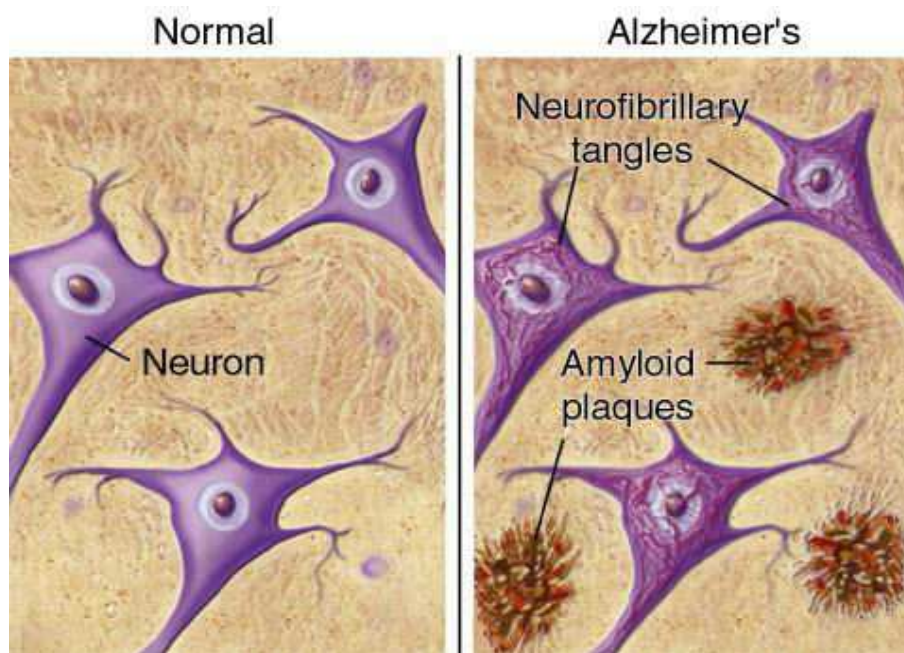
È noto che, il peptide  $A\beta$  svolge un ruolo chiave nella fisiopatologia dell'Alzheimer innescando una complessa cascata patologica che porta alla neurodegenerazione (*Gold T.E. et al 2013*), ed è probabile che svolga questo ruolo nei primi anni di insorgenza dei disordini neurodegenerativi.

### 1.4.1 Placche Senili

La comparsa di placche senili, è uno dei primi eventi associati al morbo di Alzheimer. Sono strutture a localizzazione extracellulare di forma rotondeggiante con un diametro di 50-200  $\mu\text{m}$ .

Il meccanismo con cui avviene l'accumulo del peptide  $\beta$  Amiloide resta ancora ignoto (*Chuang J.Y et al., 2012*).

Le placche comprendono una zona centrale costituita da aggregati fibrillari del peptide  $A\beta$  circondata da neuriti distrofiche con prolungamenti assonali tortuosi e dilatati. Attorno alle placche sono presenti due tipi di cellule gliali attivate: le cellule microgliali e gli astrociti. Questo tipo di placche si trovano anche nel cervello di persone anziane sane ma in numero molto più ridotto (*Figura 3*).



**Figura 3** : Placche amiloidi composte da un nucleo centrale costituito dall' accumulo della proteina  $\beta$ -amiloide e grovigli neurofibrillari, ammassi neurofibrillari intracitoplasmatici.

Ciò che ha suscitato un grande interesse tra i ricercatori riguarda l'enzima di taglio nel sito  $\beta$  di APP ( “  $\beta$ -site APP cleaving enzyme I ” o BACE I), essenziale per la generazione del  $A\beta$ . Topi knockout per BACE I non producono  $A\beta$  e non sviluppano la patologia dell'Alzheimer.

Il fatto che BACE I dia il via alla formazione del peptide  $A\beta$ , e l'osservazione che i livelli di BACE I sono elevati in questa malattia, fornisce uno spunto per sviluppare una terapia inibendo BACE I. Recenti studi indicano, però, che l'abolizione completa di BACE I potrebbe essere associata ad alterazioni comportamentali e fisiologiche ( *Cole S.L et al., 2007* ).

### ***1.4.2 Grovigli Neurofibrillari***

I grovigli neurofibrillari (NFT) sono fasci di filamenti elicoidali appaiati (PHF, “paired helical filaments”), formati dalla proteina citoscheletrica  $\tau$  iperfosforilata. Essi si accumulano nel corpo cellulare (*Hotzman D.M et al., 2001*) dei neuroni prevalentemente nell'ippocampo, nella corteccia entorinale, nell'amigdala e nei nuclei del proencefalo basale. La proteina  $\tau$  è stata identificata come un fattore essenziale per la formazione dei microtubuli, da cui l'inclusione nella categoria MAP (“microtubule-associated protein”). Un funzionamento ottimale di  $\tau$  prevede un meccanismo dinamico di fosforilazione/defosforilazione in siti specifici, ad opera di chinasi come GSK-3 e Cdk-5. L'iperfosforilazione, all'interno della regione di legame ai microtubuli, blocca l'interazione tra  $\tau$  e i microtubuli, mentre la fosforilazione in siti adiacenti riduce questa interazione.

Ne deriva una destabilizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli, con terminale morte neuronale. Oltre all'iperfosforilazione, anche altre modifiche della proteina Tau sono necessarie, come l'acetilazione, il troncaggio e la nitratura (*Arnold C.S. et al., 1996*).

Il rapporto meccanicistico tra la formazione di grovigli neurofibrillari e placche senili è ancora poco compreso (*Brion G.P et al., 1998*).

### ***1.4.3 Genesi del peptide $\beta$ -Amiloide: aspetti strutturali e funzionali nel morbo di Alzheimer***

Il peptide  $\beta$ -Amiloide ha un ruolo centrale nella patologia dell'Alzheimer e sembra essere uno dei principali markers precoci nella progressione della malattia. È noto che l'  $A\beta$  formi agglomerati extracellulari chiamate placche senili (SP), ma più recentemente si è scoperto che le forme più tossiche di  $A\beta$  non sono le insolubili (Sps), ma gli oligomeri più solubili. Sono proprio questi oligomeri che appaiono coinvolti nei meccanismi molecolari del danno ossidativo causare il danno ossidativo a livello delle cellule nervose coinvolgendo la membrana cellulare e mitocondriale.

L' $A\beta$  deriva da un taglio proteolitico di un precursore proteico integrato nella membrana cellulare, la proteina precursore del  $\beta$  amiloide ( $\beta$ APP) . Quattro isoforme di  $\beta$ APP contengono il peptide  $A\beta$ , costituite da 695, 714, 751 o 770 aminoacidi (*Citron M. et al., 1995*).

La genesi di  $A\beta$  può avvenire se APP è tagliato dalla  $\alpha$ -secretasi all'interno del dominio  $A\beta$  generando un pathway “ non - amiloidogenico”.

Recentemente, le secretasi implicate in tale meccanismo sono state identificate:

1.  $\alpha$  secretasi, sopprime la produzione di  $\beta$ -amiloide;
2.  $\beta$ -secretasi, nota come “  $\beta$ -site APP cleaving enzyme I” (BACE), una nuova aspartilproteasi (*Hussain I. et al., 1999*);
3.  $\gamma$ -secretasi appare come un complesso multiproteico che consiste nella Presenilina 1 o 2 (PS1 o PS2), nicastrina, Aph1 e Pen2.

La produzione del peptide  $A\beta$  è un normale evento fisiologico.

Nel pathway non-amiloidogenico, infatti, la  $\alpha$ -secretasi taglia il precursore APP nel dominio  $A\beta$  prima nel residuo Lys-16 e in seguito in corrispondenza del residuo Leu 17. I prodotti derivanti da questo taglio proteolitico sono: l'ectodominio APP $\alpha$  secreto, insieme ai frammenti CTF e C83 (10 kD) che vengono successivamente tagliati dalla  $\gamma$ - secretasi. In seguito a quest'ultimo taglio si forma un frammento non-amiloidogenico di 3kD, p3.

Nel pathway amiloidogenico, invece, il taglio di  $\beta$ APP da parte di BACE I è un prerequisito essenziale per l'inizio della genesi del  $A\beta$ .

Il primo taglio avviene nella sequenza  $A\beta$  in corrispondenza del residuo Asp1, formando l'estremità N-terminale del peptide. Questo taglio libera due frammenti proteici: l'ectodominio APP secreto,  $APPs\beta$ , e il frammento C-terminale che resta legato alla membrana (CFT "carboxyl terminal fragment"), C99. C99 è successivamente tagliato dalla  $\gamma$ -secretasi, generando il C-terminale di  $A\beta$  e un dominio intracellulare APP (AICD).

Il taglio da parte del complesso della  $\gamma$ -secretasi non è preciso; mentre la maggior parte dei peptidi  $A\beta$  rilasciati dalla  $\gamma$ -secretasi terminano a livello dell'amminoacido 40 ( $A\beta$ 40), una piccola porzione peptidica termina con l'amminoacido 42 ( $A\beta$ 42) (*Figura 4*). Molte mutazioni, tipiche delle forme di Alzheimer Familiare, causano una produzione eccessiva del peptide  $A\beta$ 42.

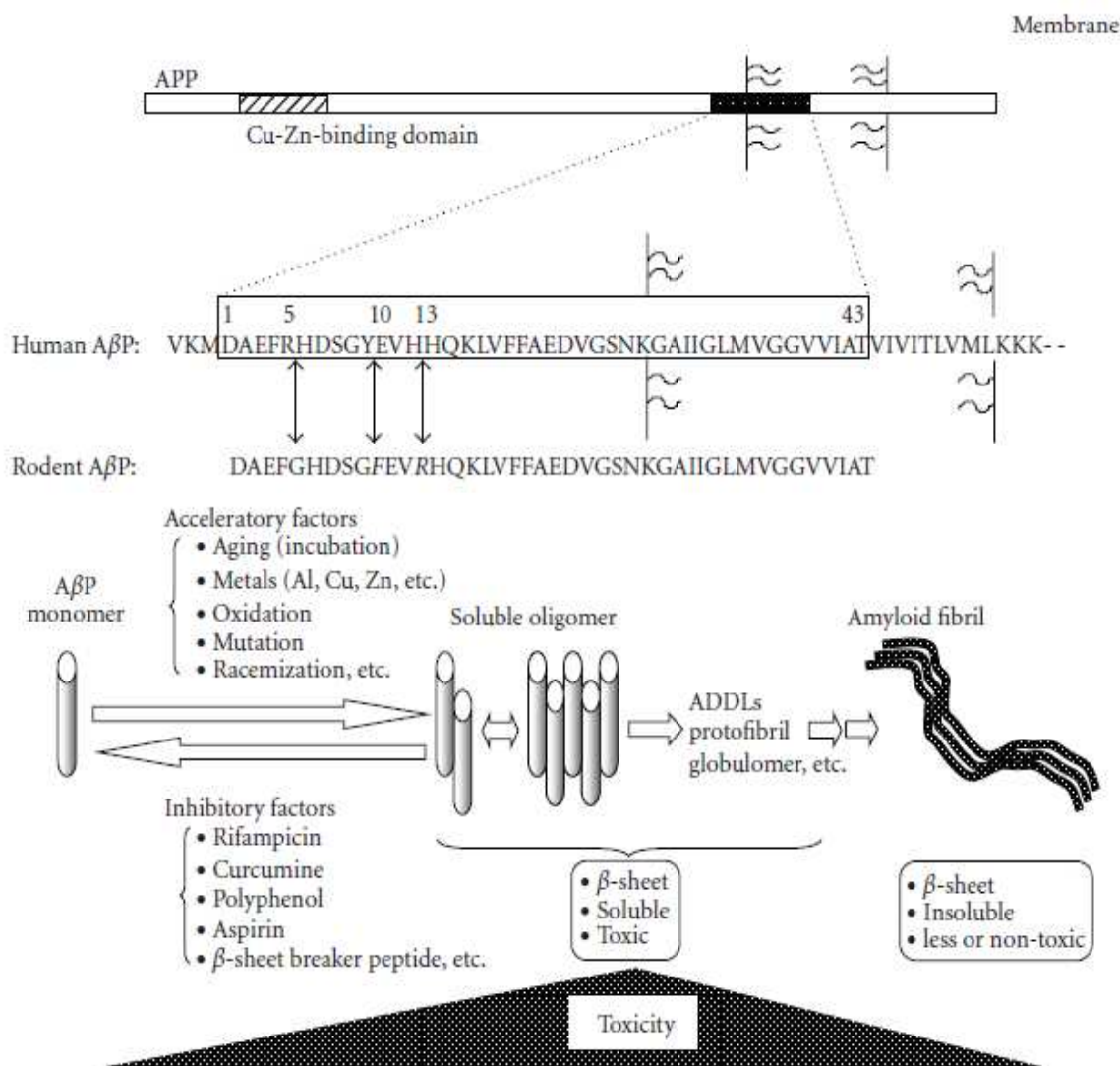
Oltre alle placche amiloidi parenchimali, circa l'80% dei pazienti AD presenta accumulo di  $A\beta$  nelle pareti di capillari, arteriole e piccole e medie arterie della corteccia cerebrale e leptomeninge, nota come angiopatia cerebrale amiloide (CAA) (*Attems et al., 2011*). I depositi di  $A\beta$  all'interno della tunica portano all'atrofia e alla sostituzione acellulare dello strato di cellule della muscolatura liscia vascolare (VSMC), che compromette la funzione vasomotoria e indebolisce la parete del vaso.

#### ***1.4.4 Formazione e clearance dell' $A\beta$***

La riduzione della clearance del peptide  $A\beta$  a causa dell'invecchiamento e dei determinanti genetici è considerata una delle principali cause di accumulo di  $A\beta$  nei tessuti del cervello e nella cerebrovascolarizzazione della maggior parte dei soggetti AD. L' $A\beta$  è catabolizzato da tre principali vie, due delle quali coinvolgono la cerebrovascolarizzazione (*Zlokovic, 2013*).

Innanzitutto, all'interno del cervello, l' $A\beta$  è degradato enzimaticamente da diverse peptidasi, soprattutto dalla neprilysina e dall'enzima che degrada l'insulina (IDE). L'espressione di neprilysina e IDE risulta diminuita nell'AD e in studi in cui viene aumentata l'espressione di questi enzimi che

riducono il carico di A $\beta$  e migliorano la funzione cognitiva nei modelli murini di AD, per questo stanno suscitando interesse come potenziale terapeutico (*Saido e Leissring, 2012*). In secondo luogo, A $\beta$  viene eliminato attraverso il flusso di massa lungo percorsi di drenaggio perivascolari nel liquido cefalorachidiano (CSF) e nei linfonodi cervicali (*Weller et al., 2008*). Il drenaggio perivascolare di diversi solventi del fluido interstiziale (ISF), compreso l'A $\beta$ , dal cervello è ipotizzato essere guidato dalle pulsazioni delle pareti cerebrovascolari. Poiché l'età irrigidisce e ostacola la contrazione dei vasi, il transito di A $\beta$  lungo percorsi di drenaggio perivascolare viene rallentato (*Schley et al. 2006*). Infine, l'A $\beta$  viene trasportato attraverso la barriera emato-encefalica (BBB) tramite la proteina 1 associata al recettore LDL (LRP1) nel flusso sanguigno per eventuali degradazioni nel fegato. In entrambi i soggetti AD e nei modelli murini AD, l'espressione nella BBB di LRP1 diminuisce, mentre l'espressione del recettore per prodotti di glicazione avanzata (RAGE), responsabile dell'influenza di A $\beta$  nel cervello, aumenta, ed è ritenuto un fatto che può provocare danni nell'AD, alterando l'omeostasi dell'A $\beta$  (*Sagare Et al., 2012*).



**Figura 4 :** *Secrezione del peptide Aβ da APP e sua oligomerizzazione.*

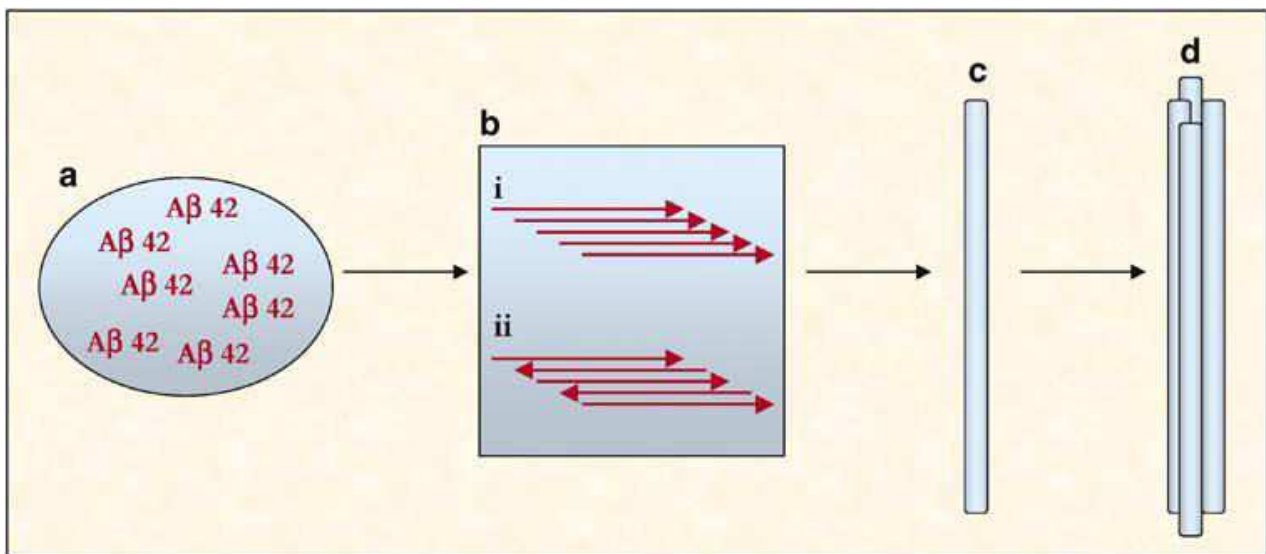
Il peptide Aβ è secreto tramite il taglio dell' N terminale di APP da parte della β-secretasi ( BACE ), seguito dal taglio intramembrana del C-terminale da parte della gamma-secretasi. APP si lega anche al rame o allo zinco.

Il peptide Aβ umano e il peptide Aβ dei roditori differiscono per 3 amminoacidi ( arginina in posizione 5, tirosina in posizione 10 e istidina in posizione 13 ).

I monomeri di proteina Aβ formano strutture random-coil. Comunque, in condizione di età avanzata o in presenza di metalli in tracce come l'alluminio, lo zinco e il rame, il peptide Aβ si autoaggrega e oligomerizza ( dai dimeri alle protofibrille ), e quindi forma fibrille di amiloide insolubili. Anche se le proteine Aβ non sono tossiche, gli oligomeri di questa proteina inducono una forte morte neuronale.



La costruzione della fibrilla di amiloide è un processo a cascata, che coinvolge la formazione di strutture intermedie ( *Figura 5* ).



**Figura 5** : Amiloidogenesi: la formazione della fibrilla.

(a) accumulo dell'Aβ ; (b) aggregazione dell'Aβ (oligomerizzazione), attraverso un allineamento (i) parallelo o (ii) antiparallelo ; (c) formazione delle protofibrille ; (d) formazione della fibrilla matura.

Le proteine Aβ prima si fondono a formare piccoli oligomeri solubili che si uniscono a formare aggregati ad alto peso molecolare, così chiamate protofibrille. Le protofibrille infine superano i limiti di solubilità e vengono depositate come fibrille ( placche ) ( *Rochet & Lansbury, 2000 ; Dobson, 2003b* ). La corrente opinione dominante è che le placche di β-amiloide, che si depositano attorno ai neuroni, sono intrinsecamente tossiche ( *Bence et al., 2001; Bucciantini et al., 2002* ). Comunque, non è ancora chiaro come la loro formazione porti alla morte cellulare. Infatti, è difficile proporre un meccanismo comune di tossicità che abbia a che fare con ciascuna differente malattia. Studi con l'Aβ hanno dimostrato che piccoli aggregati oligomerici sono facilmente più tossici rispetto alle fibrille finali ( *Lambert et al., 1998; Walsh et al., 1999; Hardy & Selkoe, 2002* ). Questo concetto è spiegato dal fatto che la formazione della fibrilla rappresenta lo step finale di un processo a cascata, fornendo così un biomarker di neurodegenerazione.

## ***2. Perossidazione lipidica: ruolo nel morbo di Alzheimer***

Il termine stress ossidativo è stato introdotto per la prima volta nel 1989 da Sies che lo definì come uno squilibrio tra la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e i sistemi di difesa antiossidanti.

Un normale metabolismo genera radicali liberi dell'ossigeno e altre specie reattive dell'ossigeno che prendono parte in molti processi fisiologici, come la trasduzione del segnale.

Rientrano nei ROS:

- ⌘ *anione superossido ( $O_2^-$ )*
- ⌘ *perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ )*
- ⌘ *radicale ossidrilico ( $\bullet OH$ )*
- ⌘ *ossigeno singoletto  $^1O_2$*

Oltre ai ROS, esistono altri radicali chiamati “specie reattive dell'azoto” (RNS) che sono, ad esempio, l'ossido nitrico (NO) e il perossinitrito ( $ONOO^-$ ).

In condizioni fisiologiche la cellula mantiene al suo interno uno stato riducente grazie ad un bagaglio di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS. Se la generazione di ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula stessa, o si verifica una diminuzione dei meccanismi di detossificazione, si viene ad instaurare una nuova condizione che prende il nome di stress ossidativo.

Il danno ossidativo provoca alterazioni di tutte le macromolecole biologiche. L'ossidazione a carico delle basi del DNA determina la perdita di aromaticità e della planarità determinando distorsioni nell'architettura. Il DNA danneggiato, generalmente, va incontro a sostituzione e riparazione grazie

a enzimi specifici come glicosilasi e endonucleasi. Tuttavia se il sistema di riparazione è soggetto ad errori, la generazione successiva riceverà una molecola di DNA difettosa causando modificazioni dell'espressione genica.

L'ossidazione delle proteine causa alterazioni delle loro caratteristiche strutturali e proprietà chimico-fisiche come frammentazione, perdita della struttura terziaria, aggregazione, modificazione di carica e maggiore suscettibilità alla proteolisi. Queste alterazioni strutturali si riflettono in alterazioni funzionali come la perdita dell'attività enzimatica e il mancato riconoscimento recettore - ligando. Pertanto, le conseguenze del danno causato da radicali liberi a carico delle proteine si riflettono sulle funzioni cellulari come produzione di energia e mantenimento del potenziale di membrana.

L'ossidazione da parte di radicali liberi a carico dei lipidi è nota come perossidazione lipidica. I principali substrati sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e quindi coinvolge trigliceridi, fosfolipidi, sfingolipidi. Tuttavia, anche il colesterolo e gli esteri del colesterolo possono essere ossidati. Poiché la perossidazione lipidica e i prodotti della perossidazione lipidica sono coinvolti nei meccanismi molecolari di numerose patologie dismetaboliche, sono state studiate le vie di formazione dei metaboliti derivanti dall'ossidazione dei lipidi. Studi *in vitro*, condotti utilizzando diversi modelli sperimentali nei quali substrati lipidici (membrane, lipoproteine isolate, liposomi) sono stati trattati con agenti ossidanti in particolare rame e AAPH, Da questi studi è emerso che la perossidazione dei PUFA procede in varie fasi: iniziazione, propagazione e terminazione.

La perossidazione degli acidi grassi insaturi inizia con la sottrazione di un atomo di idrogeno da un doppio legame di un acido grasso polinsaturo (PUFA) da parte di un radicale libero o di uno ione metallico (fase di iniziazione) con conseguente formazione di un radicale (L•) sull'atomo di carbonio corrispondente. A questo, segue un riarrangiamento molecolare che porta alla formazione di dieni coniugati e alla successiva addizione di ossigeno molecolare in più siti con formazione di radicali perossidici (LOO•) che a loro volta possono sottrarre un atomo di idrogeno ad un'altra

molecola di acido grasso insaturo per formare un idroperossido (LOOH) e un altro radicale L• (fase di propagazione). I composti perossidati formati possono subire la frammentazione ossidativa generando una varietà di composti, detti prodotti secondari come la malondialdeide (MDA) e il 4-idrossinonenale (HNE) che sono composti altamente reattivi.

Questi possono reagire con gruppi amminici liberi di proteine, fosfolipidi o acidi nucleici formando legami covalenti stabili, tipo basi di Schiff, che inducono alterazioni strutturali di tali molecole biologiche.

Una volta consumato tutto l'ossigeno a disposizione o se intervengono sostanze antiossidanti che possono donare un atomo di idrogeno o un elettrone, ha luogo la fase di terminazione, dove i radicali formati reagiscono per dare prodotti finali non radicalici inattivi. La reattività degli acidi grassi aumenta con il numero di doppi legami, per cui l'acido arachidonico è quattro volte più reattivo dell'acido linoleico.

Elevate concentrazioni di acidi grassi polinsaturi sono presenti nella membrana cellulare, nelle membrane di organelli subcellulari e lipoproteine e, pertanto, essi rappresentano i principali bersagli della perossidazione lipidica.

Diversi meccanismi molecolari sono coinvolti nell'aumento della perossidazione lipidica nel morbo di Alzheimer. Come descritto precedentemente il danno ossidativo si verifica quando si ha uno squilibrio tra la produzione delle specie ossidanti e le difese antiossidanti.

Il cervello è il maggior consumatore di glucosio e ossigeno per produrre energia e, di conseguenza, c'è un'abbondante produzione di ROS. Il cervello contiene una concentrazione di acidi grassi polinsaturi relativamente alta, le macromolecole più vulnerabili all'azione dei ROS (*Bongarzone ER et al; 1995*).

Come accennato il glucosio è il substrato fondamentale nel metabolismo energetico del cervello, ma può indurre una modifica irreversibile delle proteine mediante due distinti meccanismi. Il primo consiste nella formazione dei radicali liberi in presenza di metalli di transizione e ciò potrebbe originare gruppi carbonilici reattivi. Il secondo prevede il coinvolgimento di una glicazione non

enzimatica che si traduce nella formazione di composti stabili noti come composti finali di glicazione o AGE (Advanced glycation and products) ( *Yan SD et al 1996* ).

È possibile evidenziare anche altri fattori che possono contribuire alla perossidazione nel morbo di Alzheimer.

I principali fattori sono la neuroinfiammazione, l'alterata omeostasi degli ioni metallici e il  $\beta$ -amiloide. Tra le cellule responsabili della sintesi di radicali liberi vi sono le cellule che compongono la microglia. La microglia consiste di cellule del sistema reticolo endoteliale che svolgono funzioni simili a quelle dei macrofagi presenti in altri tessuti.

Le cellule della microglia possono passare da uno stato quiescente ad una forma attivata, come i macrofagi. La microglia attivata, a seguito di stimoli specifici quali citochine proinfiammatorie, come IFN $\gamma$  (interferone  $\gamma$ ) o Il-1 $\alpha$  (interleuchina 1 $\alpha$ ), produce una elevata quantità di ROS, soprattutto anione superossido ( $O_2^-$ ) che viene rilasciato nell'ambiente extracellulare. Inoltre, le cellule gliali partecipano alla sintesi di altri radicali liberi, tra cui l'ossido nitrico (iNOS); in questo modo le cellule gliali sono attivate a produrre sostanze ossidanti, ossido nitrico e i suoi prodotti di ossidazione, che sono tossici per i neuroni ( *Floyd R.A. et al., 1999*).

Anche gli ossidanti stessi possono stimolare la trascrizione di geni proinfiammatori nelle cellule gliali, creando un circolo vizioso ( *Schwab C. et al., 2008; Rozemuller A.J. et al., 2005; Baldini F. et al. 2006* ).

Ioni metallici di transizione, come rame e ferro, possono indurre la perossidazione lipidica delle membrane e delle lipoproteine. Come mostrato nella reazione sottostante, i metalli di transizione possono indurre la produzione di radicali idrossile altamente reattivi mediante la reazione di Fenton ( *Arlt et al., 2002*).

In condizioni normali, i metalli di transizione nelle cellule cerebrali si trovano in una forma "protetta", legati a molecole quali la transferrina, ferritina e ceruloplasmina. In questa forma, non sono disponibili per catalizzare le reazioni dei radicali liberi. La perossidazione lipidica mediata da questi ioni sembra avere una rilevanza fisiologica nelle patologie neurodegenerative. Infatti, in

condizioni patologiche come nel morbo di Alzheimer, essi vengono rilasciati nella forma catalitica (Muller et al., 2012 ; Rottkamp C. A. et al., 2001; Ozcankaya R. et al., 2002). Inoltre, depositi di ioni metallici rappresentano una caratteristica comune di diverse patologie neurodegenerative (Bush Al. et al., 2000). Diversi studi mirati a chiarire il ruolo di questi ioni hanno evidenziato un'alterazione del metabolismo di ferro e/o rame, che potrebbe contribuire allo stress ossidativo periferico e una recente meta-analisi ha riscontrato un aumento dei livelli di ioni rame circolanti nella malattia di Alzheimer ( Bucossi et al., 2010 ; Schrag et al., 2011). Particolare attenzione è stata rivolta al rame non legato alla ceruloplasmina, e un recente studio ha riscontrato che un elevato rapporto rame/ferro non-eme in soggetti con MCI, predice un progresso verso la malattia di Alzheimer (Muller et al., 2012). Inoltre, il rapporto tra ceruloplasmina sierica e transferrina sierica aumenta nell'Alzheimer ( Squitti et al., 2006 ).

Infine, sebbene la funzione fisiologica del  $\beta$ -Amiloide, il principale componente delle placche senili, normalmente prodotto da neuroni, astrociti e altre cellule, resti sconosciuta, è importante notare la sua associazione con le lipoproteine dei fluidi corporei (plasma e CSF) e una sua similitudine con le apolipoproteine (Koudinov A.R. et al., 1997). Lo studio dei meccanismi molecolari con cui il  $\beta$ -amiloide esercita il suo ruolo neurotossico, ha dimostrato che le sue proprietà dannose possono essere mediate da alcune specie radicaliche dell'ossigeno (Behl C. et al., 1994). Diversi studi indicano il ruolo centrale del peptide  $A\beta$  nel promuovere l'accumulo di radicali liberi nei neuroni, nella glia e nelle regioni cerebrali vulnerabili di pazienti affetti dal morbo di Alzheimer. Oggi è chiaro che esiste una relazione tra i marcatori dello stress ossidativo, i depositi di amiloide e la degenerazione neurofibrillare (Huang et al., 2004). Infatti sono stati evidenziati elevati livelli di  $H_2O_2$  e produzione del radicale  $OH^-$  in cellule esposte al peptide (Behl C. et al., 1994). Numerosi studi hanno evidenziato come il  $\beta$ -amiloide è in grado di indurre un accumulo di prodotti di ossidazione, portando alla degenerazione di colture cellulari (Shearman MS et al., 1994). Negli ultimi anni è emerso che l'ossidazione indotta dal  $\beta$ -amiloide è mediata da ioni metallici come rame e ferro (Rottkamp CA et al., 2001). Il  $\beta$ -amiloide possiede tre residui di istidina

e uno di tirosina, tutti efficientemente chelati da ioni metallici di transizione. Come risultato, l'A $\beta$  lega rame, zinco e altri metalli che formano degli aggregati tramite interazioni specifiche. Gli aggregati di A $\beta$  hanno capacità pro-ossidanti, stimolando la formazione di specie reattive dell'ossigeno e l'induzione della perossidazione lipidica. Ciò che è importante sottolineare è che il  $\beta$ -amiloide svolge questa attività solo a concentrazioni nell'ordine della micromolarità. Al contrario, ad una concentrazione di 0.1-1.0  $\mu$ M, l' A $\beta$  agisce da antiossidante con la sua capacità chelante. È, quindi, possibile distinguere una situazione fisiologica, in cui il  $\beta$ -amiloide lega metalli di transizione, rilasciati dalle "metal-binding protein" (trasferrina e ceruloplasmina). In questo modo, l'A $\beta$  agisce da antiossidante delle lipoproteine, inibendo l'ossidazione indotta da ioni metallici. In condizioni patologiche, invece, il rilascio di ioni metallici aumenta e ciò induce una maggiore produzione di radicali liberi. In risposta a questo incremento, anche la produzione di A $\beta$  aumenta in modo anomalo, portando alla formazione di aggregati, come placche senili. Tali aggregati sono a loro volta capaci di produrre radicali liberi che inducono un ulteriore stress ossidativo e perossidazione lipidica, altamente citotossici, risolvendo il tutto in un circolo dannoso (*Huang X. et al., 1999*).

### ***3. Lipoproteine ad alta densità (HDL): ruolo nelle patologie neurodegenerative***

#### ***3.1 Lipoproteine nel plasma e nel liquido cefalorachidiano (CSF)***

Le lipoproteine sono complessi macromolecolari ad elevato peso molecolare costituiti da molecole idrofobiche e anfipatiche. Il modello strutturale delle lipoproteine prevede la presenza di due microambienti: un nucleo centrale (core) e uno strato periferico di rivestimento (superficie). Il core è composto di lipidi neutri (trigliceridi e colesterolo esterificato) mentre la superficie è costituita da fosfolipidi e colesterolo non esterificato. Inoltre, sulla superficie vi sono delle proteine, denominate apoproteine, che presentano regioni anfipatiche, di cui la parte idrofobica si addentra nel core della lipoproteina, mentre quella idrofila rimane a contatto con l'ambiente acquoso esterno; queste interazioni servono a stabilizzare la struttura delle particelle lipoproteiche. Tra le principali apoproteine vi sono: l'apo E, l'apo B, che costituisce la principale componente apoproteica dei chilomicroni, delle VLDL e delle LDL, ma non è contenuta nelle HDL e l'apo A-I e l'apo A-II, presenti sulla superficie delle HDL ove contraggono rapporti sia con la componente lipidica che proteica ( *Tabella 6* ).

Le apoproteine possono servire come cofattori per reazioni enzimatiche (*Fielding et al.1972*) e ligandi per recettori cellulari di superficie (*Brown et Goldstein 1986*), oltre a svolgere altre numerose funzioni, come riportato in *Tabella 7*.

Esistono diverse classi di lipoproteine plasmatiche che differiscono per la diversa composizione lipidica, apoproteica e per le caratteristiche chimico-fisiche ( *Tabella 4 e Tabella 5* ).

Distinguiamo le seguenti classi:

- Chilomicroni



- HDL (High Density Lipoprotein o lipoproteine ad alta densità)
- IDL (intermediate density lipoprotein o lipoproteine a densità intermedia)
- LDL (low density lipoprotein o lipoproteine a bassa densità)
- VLDL (very low density lipoprotein o lipoproteine a bassissima densità)

Il ruolo principale delle lipoproteine è quello di trasportare alle cellule dell'organismo sia i lipidi, come fonte di energia e come componenti base per la sintesi di biomembrane, sia le molecole liposolubili come la vitamina E ed altri antiossidanti. (*Poirier et al.1999*).

Il ruolo delle lipoproteine nel mantenimento dell'omeostasi lipidica sistemica, oggi, è ben definito, mentre molto meno si conosce sul trasporto attivo di lipidi e sul loro metabolismo nel Sistema Nervoso Centrale ( SNC ).

Malgrado l'esistenza della barriera ematoencefalica (BBB) è stata mostrata la presenza di particelle lipoproteiche nel liquido cerebrospinale (CSF ) (*Roheim et al., 1979*), inoltre la presenza di enzimi del metabolismo lipoproteico e di recettori per le lipoproteine sulla superficie di alcuni tipi di cellule del sistema nervoso (*Albers et al., 1992*) suggerisce la presenza di un metabolismo lipoproteico autonomo nel SNC. Un interesse crescente si sta rivolgendo a questi aspetti per le implicazioni sul possibile coinvolgimento di lipoproteine e le rispettive alterazioni funzionali nell'insorgenza delle patologie neurodegenerative associate a un danno ossidativo come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson.

L'esistenza nel compartimento cerebrale di un sistema di trasporto lipidico attivo, è supportata dalla presenza nel CSF di apoproteine, di lipoproteine e di enzimi del metabolismo lipidico. Inoltre, recettori per tali macromolecole sono stati evidenziati sulla superficie di alcuni tipi di cellule del sistema nervoso, ad esempio astrociti e cellule della glia.

Tramite approcci metodologici diversi, come la cromatografia ad immunoaffinità con anticorpi specifici rivolti contro le Apo-AI e le Apo-E, l'elettroforesi bidimensionale e l'immunoblotting

(*Borghini et al., 1991*), sono state identificate lipoproteine che per taglia molecolare e proprietà chimico-fisiche sono simili alle HDL plasmatiche (HDL-like lipoprotein) (*Hochstrasser A.C. et al., 1988*). Le cellule principalmente coinvolte nella biosintesi di tali lipoproteine sono gli astrociti (*Boyles et al., 1985, La Du et al., 1998*) e la microglia (*Stone et al., 1997; Pitas et al., 1987; La Du et al., 1998*).

Recenti studi hanno evidenziato anche meccanismi di trasporto delle lipoproteine dal plasma attraverso la BBB. Le LDL attraversano la BBB mediante un processo di transitosi mediata da recettore. Tale processo differisce dalla classica endocitosi mediata da recettore in quanto, a seguito dell'internalizzazione, le LDL non subiscono degradazione.

Il trasporto transcellulare delle LDL avviene attraverso le cellule endoteliali del cervello e coinvolge strutture specializzate di membrana (caveolae).

Il processo di transitosi sembra essere strettamente regolato, infatti, da un'alta concentrazione di lipoproteine nei capillari che conduce alla diminuzione del numero di recettori per le LDL (down-regulation) mentre in alcune condizioni fisiologiche la richiesta di lipidi da parte degli astrociti determina un aumento del numero di recettori per le LDL (up-regulation). Ciò probabilmente avviene in seguito alla secrezione, da parte degli astrociti, di molecole segnale che agiscono sul lato abluminale dei capillari del cervello (*Keller J.N. et al., 1999*).

Utilizzando cellule in coltura isolate da endotelio di bovino, è stato dimostrato un trasporto attivo anche per le HDL (*De Vries et al., 1995*). Sulla base di questi dati si può ipotizzare che nel liquido cefalo-rachidiano si possano trovare sia lipoproteine di origine plasmatica (lipoproteine esogene) sia lipoproteine sintetizzate dalle cellule cerebrali (lipoproteine endogene).

Un aumento del passaggio di lipoproteine plasmatiche nel compartimento cerebrale con aumento dei loro livelli nel CSF si può realizzare a seguito di alterazioni della permeabilità della barriera ematoencefalica come quelle che si osservano in pazienti affetti da patologie neurodegenerative per esempio il morbo di Alzheimer, o nei pazienti dopo ischemia o a seguito di processi infiammatori.

Un aumento di lipoproteine può predisporre ad un aumento di prodotti di ossidazione poiché le

lipoproteine sono particolarmente sensibili all'azione ossidante esercitata dai radicali liberi.

Classe	Densità (g/mL)	Apoproteine	Origine	Principali Funzioni
Chilomicroni	< 0.95	ApoAI; ApoAIV; ApoB48; ApoB100; ApoC; ApoE	Intestino	Trasporto di Triacilgliceroli esogeni, colesterolo e vitamine liposolubili dall'intestino ai tessuti
VLDL	0.96-1.006	ApoB48; ApoC; apoE	Fegato	Trasporto di Triacilgliceroli esogeni dal fegato ai tessuti
LDL	1.019-1.063	ApoB100	Circolazione dalle VLDL	Trasporto di colesterolo esterificato ai tessuti periferici
HDL	1.063-1.210	ApoAI; ApoAII; ApoAIV; ApoC; ApoE; ApoJ; ApoD	Piccolo intestino, fegato, circolazione dalle VLDL	Trasporto inverso del colesterolo, modulazione del contenuto di colesterolo nelle membrane; ruolo antiossidante e antiinfiammatorio
HDL-Like	1.063-1.210	ApoE; ApoAI; ApoAII; ApoJ; ApoD	Astroцитi e Microglia	Trasporto e redistribuzione dei lipidi (principalmente colesterolo), vitamine liposolubili, e molecole idrofobiche bioattive (S1P e $\beta$ -Amiloide)

**Tabella 4 :** Lipoproteine e apoproteine nel plasma e nel sistema nervoso centrale (SNC).

CLASSE	Peso molecolare (Dalton)	Densità (g/ml)	Diametro (nm)	Mobilità elettroforetica
Chilomicroni	$10^9 - 10^{10}$	< 0.9	75 - 1200	origine
VLDL	$5 - 10 \times 10^6$	0.95 - 1.006	25 - 75	pre $\beta$
IDL	$3.9 - 4.8 \times 10^6$	1.006 - 1.020	22 - 24	fra $\beta$ e pre $\beta$
LDL	$2.2 - 3.9 \times 10^6$	1.020 - 1.063	20 - 22	B
HDL	$1.8 - 3.6 \times 10^5$	1.063 - 1.201	4 - 14	A

**Tabella 5** : Caratteristiche chimico-fisiche delle lipoproteine plasmatiche.

	CHILOMICRONI	VLDL	LDL	HDL
A I	33	Tracce	Tracce	65
A II	Tracce	Tracce	Tracce	10
A III (D)	?	-	-	2
A IV	14	-	-	?
B	5	25	95	3
C I	-	-	-	-
C II	32	55	2	13
C III	-	-	-	-
E	10	15	3	3

**Tabella 6** : Distribuzione % delle apoproteine nelle diverse classi di lipoproteine plasmatiche.

Nella tabella successiva ( **Tabella 7** ) sono riassunte le principali funzioni metaboliche delle apoproteine plasmatiche e il loro peso molecolare.

Apoproteina	PM	RUOLO METABOLICO
A I	28	Attiva la LCAT (sembra possedere attività proteolitica)
A II	17,5	Attiva la lipasi epatica (sembra possedere attività proteolitica)
A IV	46	(?) Attivazione enzimatica della LPL e della LCAT
B 48	210	Trasporto di lipidi dall'intestino sotto forma di chilomicroni
B 100	513	Trasporto di lipidi dal fegato sotto forma di VLDL e LDL; riconosciuta dai recettori cellulari LDL; possiede attività fosfolipasica
C I	70	Attiva la LCAT; può inibire l'interazione con i recettori epatici
C II	90	Attiva la lipoproteinlipasi (LPL)
C III	90	Può inibire l'attivazione della lipoproteinlipasi da parte dell'ApoCII
D	220	Può essere coinvolta nel trasferimento dei lipidi tra lipoproteine diverse
E	340	Riconosciuta dai recettori epatici per l'ApoE e dai recettori per le LDL: il riconoscimento facilita la captazione epatica dei chilomicroni e dei remnants delle VLDL
J (clusterina)	70	Assemblaggio e riparazione delle membrane biologiche
K(paraoxonasi)	43	Inibizione della perossidazione lipidica

## ***3.2 Struttura e funzioni delle HDL nel plasma e nel CSF***

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono la classe di lipoproteine a minori dimensioni (4-14 nm) e a maggiore densità (1,063-1,210 g/ml) (Gotto AM et al., 1986). Esse contengono un'elevata percentuale di proteine e una bassa percentuale di fosfolipidi sulla superficie rispetto alle altre classi lipoproteiche. La composizione in fosfolipidi della superficie delle HDL, è molto simile a quella delle altre classi lipoproteiche, caratterizzata da un elevato contenuto in fosfatidilcolina (PC) e sfingomieline (SM) e in misura minore in fosfatidilinositolo (PI) e fosfatidiletanolamina (PE).

Studi sulla composizione in acidi grassi delle lipoproteine (W. Sattler et al. 1991), hanno evidenziato che le HDL presentano un maggior contenuto in acidi grassi poli-insaturi (PUFAs) e in acido stearico rispetto alle VLDL e un ridotto contenuto in trigliceridi (TG) e colesterolo esterificato rispetto alle VLDL, LDL e chilomicroni.

### ***3.2.1 Composizione apoproteica***

Le apoproteine sono proteine con caratteristiche anfipatiche associate ai fosfolipidi che costituiscono le lipoproteine mediante interazioni di natura idrofobica. Esse svolgono varie funzioni, fra le quali: stabilizzazione della molecola lipoproteica, cofattore di importanti enzimi, ligando per specifici recettori cellulari delle lipoproteine, attività enzimatica.

Le apoproteine non sono ugualmente distribuite nelle diverse classi lipoproteiche; le principali classi presenti sulle HDL sono Apo AI e Apo AII. Tuttavia sulle superficie delle HDL sono presenti altre apoproteine come Apo AIV, Apo C, Apo D, Apo E e Apo J.

Apo A e l'Apo E svolgono un ruolo principalmente strutturale poiché contribuiscono a stabilizzare la loro struttura attraverso interazioni fosfolipidi-apoproteine.

Le classi Apo AI e Apo AII hanno la capacità di instaurare dei rapporti sia con la componente

lipidica, sia con le altre proteine associate alla superficie delle HDL (*Sattler W. et al., 1991*). A queste due apoproteine, oltre al ruolo strutturale, è stato riconosciuto anche il ruolo di attivazione di importanti enzimi del metabolismo lipoproteico come ad esempio la lecitina-colesterolo acetiltransferasi (LCAT). La medesima funzione è stata attribuita all'Apo CII che è in grado di attivare l'enzima lipoprotein-lipasi (LPL). Altre apoproteine come Apo E svolgono un ruolo importante nelle interazioni mediate da recettori tra lipoproteine e cellule.

Alcune proteine legate alla superficie delle HDL, svolgono attività catalitica, fungendo da enzimi. Fra queste, negli ultimi anni, maggiore attenzione è stata rivolta all'enzima paraoxonasi (PON) per il ruolo inibitore della perossidazione lipidica (*Watson A.D., et al. 1995*), di cui verranno descritte in dettaglio le caratteristiche principali nei capitoli successivi.

Inoltre alla superficie delle HDL sono associati enzimi coinvolti nel metabolismo lipoproteico come CEPT (proteina che trasferisce gli esteri del colesterolo), LCAT (lecitina colesterol transferasi) e PLTP (proteina che trasferisce i fosfolipidi).

In determinate condizioni fisiologiche, inoltre, alcune proteine plasmatiche come la transferrina, ceruloplasmina e le proteine C si associano alla superficie delle HDL e ne modificano proprietà e funzioni. Come mostrato nella *Tabella 4* le lipoproteine HDL-like presenti nel CSF hanno una composizione apoproteica simile alle HDL plasmatiche, ma con una prevalenza di ApoE rispetto all'ApoAI.



### ***3.2.2 Metabolismo e rimodellamento delle HDL nel plasma e nel CSF***

Le HDL nel plasma sono oggetto di un continuo rimodellamento e subiscono profonde modifiche, dovute soprattutto a trasferimenti di lipidi e proteine tra le diverse classi lipoproteiche.

Queste modifiche avvengono ad opera di enzimi e di proteine che mediano gli scambi di lipidi tra classi diverse di lipoproteine e tra lipoproteine e membrane cellulari. I principali fattori che partecipano al metabolismo e al rimodellamento delle HDL sono:

*Lecitin colesterol transferasi (LCAT)*: è un enzima idrofobico che catalizza il trasferimento di un gruppo acilico dalla fosfatidil-colina al colesterolo con formazione di colesterolo esterificato e lisofosfadilcolina.

*Proteina che trasferisce gli esteri del colesterolo (CEPT)*: è una glicoproteina idrofobica che ridistribuisce gli esteri del colesterolo e trigliceridi tra le diverse classi e sottoclassi lipoproteiche.

*Proteina che trasferisce i fosfolipidi (PLTP)*: è una glicoproteina idrofobica che promuove il trasferimento dei fosfolipidi tra HDL e le altre classi lipoproteiche. Inoltre PLTP trasferisce il colesterolo non esterificato tra le varie classi lipoproteiche.

*Lipasi epatica (HL)*: è un enzima lipolitico che è ancorato mediante glicosaminoglicani alla superficie luminale delle cellule endoteliali che rivestono i sinusoidi epatici. La HL nei tessuti steroidogenici è coinvolta nell'uptake selettivo degli esteri del colesterolo delle HDL mediante un recettore scavenger-BI (SR-BI). Inoltre HL agisce come ligando per la rimozione dal plasma delle lipoproteine contenenti Apo B.

*Fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)*: PLA<sub>2</sub> è un enzima intracellulare che viene espressa in risposta ad una vasta gamma di mediatori infiammatori sulla superficie luminale delle cellule endoteliali ed è in grado di idrolizzare i fosfolipidi delle HDL. L'idrolisi dei fosfolipidi da parte della PLA<sub>2</sub> causa una diminuzione delle dimensioni delle HDL.

I complessi Apo AI-fosfolipidi così formati vengono designati come pre- $\beta_1$ HDL per le loro piccole dimensioni e per la loro mobilità elettroforetica. Le pre- $\beta_1$ HDL sono efficienti accettori di colesterolo da parte delle membrane cellulari (*Castro GR et al., 1988*) e accumulando colesterolo vengono convertite in particelle più grandi chiamate pre- $\beta_2$ HDL che sono eccellenti substrati per l'enzima LCAT. L'interazione della LCAT con il colesterolo non esterificato (UC) e la fosfatidilcolina (FC) delle pre- $\beta_2$ HDL genera colesterolo esterificato (EC) e lisofosfatidil-colina (Liso-PC). Il colesterolo esterificato viene sequestrato al centro della particella dove forma il core idrofobico della HDL determinandone la trasformazione da discoidale a sferica. Questo processo converte le pre- $\beta$  HDL in piccole  $\beta$ -HDL sferiche.

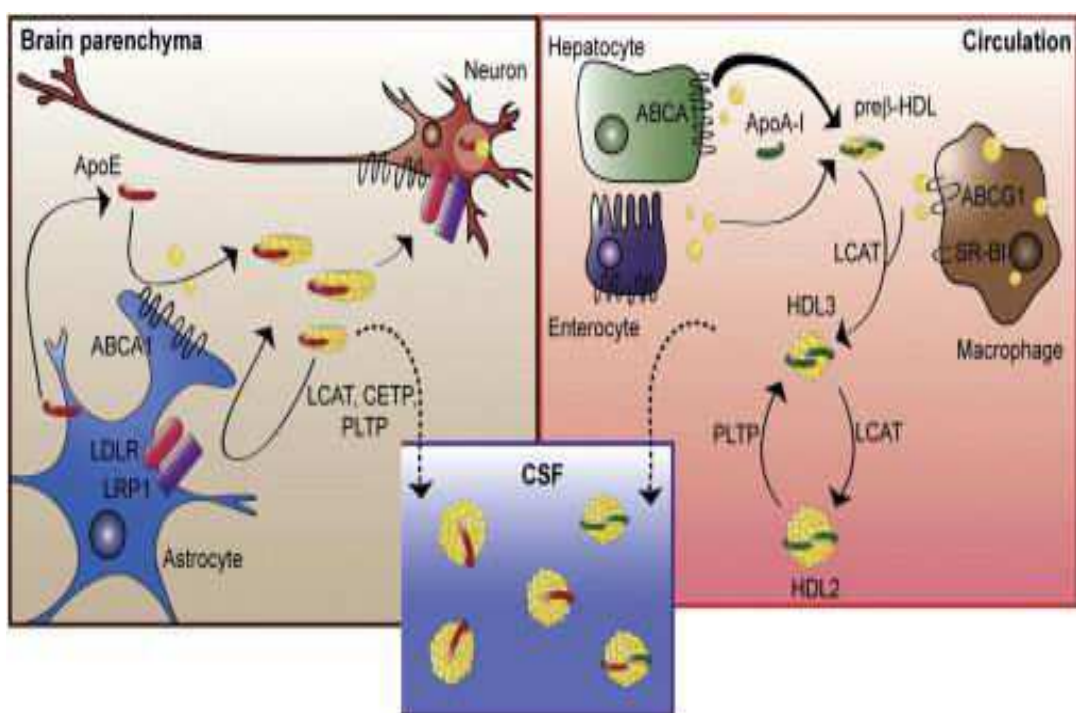
Le piccole sferiche AI-HDL vengono successivamente rimodellate nella composizione e nelle dimensioni.

Due fattori che incrementano le dimensioni delle AI-HDL sono LCAT e PLTP con formazione di grandi HDL contenenti 3 o 4 molecole di Apo AI.

La CETP promuove un trasferimento di esteri del colesterolo da Apo AI-HDL a lipoproteine ricche di trigliceridi e il trasferimento inverso dei trigliceridi, con formazione di HDL povere di colesterolo esterificato e ricche di trigliceridi (*Barter PJ et al., 1990*). L'idrolisi dei trigliceridi da parte dell'enzima HL causa una diminuzione delle dimensioni delle HDL accompagnata dalla dissociazione delle ApoAI.

Una sintesi e un metabolismo delle HDL sono stati osservati anche nel Sistema Nervoso Centrale. ApoE, principale apoproteina presente nelle lipoproteine del CSF, è sintetizzata e secreta dagli astrociti e, in misura minore, dalla microglia (*Fagan et al., 1999, Pitas et al., 1987*). Le lipoproteine contenenti ApoE accettano lipidi, mediante ABCA1, dalle cellule del SNC come neuroni e astrociti, formando particelle discoidali di 9-15 nm di diametro (*DeMattos et al., 2001, LaDu et al., 1998*) (*Figura 3.1.2, Tabella 8*). Enzimi come LCAT, CETP e PLTP sono stati osservati anche nel SNC. In maniera analoga alle lipoproteine plasmatiche, dal loro rimodellamento ad opera di questi enzimi si

formano particelle sferiche da 11 a 20 nm con una densità simile alle piccole e dense particelle HDL3 presenti nel plasma (Demeester et al., 2000, Koch et al., 2001, LaDu et al., 1998, Pitas et al. Al., 1987) (Figura 6, Tabella 1).



**Figura 6 :** Sintesi e metabolismo delle HDL nel SNC e nel plasma.

### ***3.2.3 Funzioni delle HDL nel plasma e nel CSF***

L'interesse scientifico nei confronti di questa classe lipoproteica è legato al fatto che rappresentano un fattore protettivo contro lo sviluppo dell'aterosclerosi e numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato che i livelli di HDL sono inversamente correlati con l'insorgere dell'aterosclerosi e altre patologie cardiovascolari (*Tall AR et al., 1990*).

- **TRASPORTO INVERSO DEL COLESTEROLO**

La funzione principale delle HDL è il trasporto del colesterolo in direzione opposta a quello delle LDL da cui la denominazione "trasporto inverso del colesterolo". Le HDL rimuovono il colesterolo dalle membrane cellulari dei tessuti periferici e veicolano verso il fegato dove può essere utilizzato per la sintesi della bile. In questo modo le HDL partecipano alla regolazione della composizione lipidica delle membrane cellulari.

I meccanismi molecolari coinvolti nell'efflusso del colesterolo dalle membrane cellulari alle HDL e nella regolazione della composizione lipidica di membrana non sono stati ancora del tutto chiariti (*Fielding JC 1995*).

Fino ad oggi sono stati proposti tre modelli: efflusso e traslocazione del colesterolo mediata da recettori, retroendocitosi e diffusione passiva di colesterolo attraverso una fase acquosa tra la membrana plasmatica e le particelle accettrici (*Fielding JC, 1995*).

Il primo, ipotizza un legame ad alta affinità tra HDL e proteine specifiche per Apo AI, Apo AII e Apo AIV (HDL binding protein). Queste proteine sono localizzate sulla membrana di alcune cellule come fibroblasti, epatociti, adipociti e macrofagi. Negli epatociti, sembra più probabile il meccanismo di retroendocitosi, poiché presentano sulla membrana plasmatica proteine ad alto peso molecolare (180 KDa) che funzionerebbero da internalizzatori di HDL. Il terzo modello prevede la presenza di accettori che promuovono la diffusione passiva di molecole di colesterolo. I dati disponibili suggeriscono, comunque, che l'efflusso di colesterolo può avvenire con meccanismi

diversi a seconda del tipo di cellula e delle sue condizioni metaboliche e che sono coinvolti diversi fattori sia compositivi che strutturali.

Anche la presenza sulla membrana plasmatica di microdomini di colesterolo differenti per concentrazione, sembra rivestire un ruolo importante (*Schroeder F. et al., 1991*). È stato dimostrato che, l'Apo AI presente nella sottoclasse delle pre-βHDL, possiede una conformazione tale da interagire con i microdomini stimolando la rimozione del colesterolo dalla membrana cellulare.

- **TRASPORTO DEI LIPIDI VERSO LE CELLULE**

Durante alcune fasi del loro metabolismo, le HDL operano un trasporto di colesterolo e altri lipidi verso il fegato e tessuti steroidogenici. Sulla superficie di queste cellule, infatti, sono stati evidenziati siti specifici ad alta affinità per le HDL. In particolare nei linfociti umani circolanti, l'interazione sembra avvenire tra un recettore proteico di membrana (P.M. 110 KDa) e la superficie delle HDL ed è stato ipotizzato che sia coinvolta l'Apo A-I.

È stato inoltre dimostrato che mentre le LDL trasportano esclusivamente colesterolo ai linfociti, le HDL sono invece capaci di fornire anche fosfolipidi e acidi grassi, essenziali per la sintesi delle membrane intracellulari. L'incorporazione degli acidi grassi avviene anche nelle cellule in fase di quiescenza ed è stato pertanto ipotizzato che queste lipoproteine svolgano un ruolo nel regolare la crescita e la moltiplicazione di alcuni tipi cellulari implicati nella risposta immunitaria dell'organismo (*Jurgens G. et al., 1989*).

- **PROTEZIONE CON LA DISFUNZIONE ENDOTELIALE**

Numerosi studi hanno dimostrato che le HDL svolgono un'azione antiapoptotica e proteggono le cellule endoteliali da tossicità indotta da vari stimoli infiammatori come le citochine e

interleukina-1, TNF (tumor necrosis factors) e LDL native ed ossidate. Un importante evento alla base dell'insorgenza dell'aterosclerosi è l'adesione di monociti su cellule endoteliali e la loro conseguente migrazione nella zona sub-endoteliale. Questo processo è mediato da molecole che inducono l'adesione come VCAM-1 (vascular cell adhesion molecole-1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecole-1) e selectina-E (*Vadas MA et al., 1996*). E' stato dimostrato che le HDL inibiscono l'espressione di molecole che promuovono l'adesione indotta da citochine e di inibire l'espressione di VCAM-1, ICAM-1 e selectina-E in cellule endoteliali. Le HDL sono in grado di inibire anche l'espressione di proteine di adesione indotta da TNF interrompendo il pathway della sfingosina chinasi (*Xia et al. 1999*).

Inoltre le HDL inibiscono l'attivazione dell'endotelio agendo negativamente sulla secrezione endoteliale di TNF-alfa (*Baker P.W. et al., 2000*) e altre citochine proinfiammatorie. Le HDL promuovono la vasodilatazione attivando la sintesi di ossido nitrico. Questa a sua volta, induce la sintesi di una prostaciclina (PG-I2) che ha azione vasodilatatrice ed inibisce le piastrine e i leucociti (*Yuhanna I.S. et al., 2001*).

- **INIBIZIONE DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA**

Numerosi studi hanno suggerito che la perossidazione lipidica a carico delle LDL sia coinvolta nell'insorgenza dell'aterosclerosi (*Witztum J.L. et al., 1991*). Il danno ossidativo delle LDL, infatti, causa alterazioni della loro composizione lipidica e apoproteica, che si riflettono in interazioni modificate tra LDL ossidate (LDL-OX) e recettori cellulari.

E' stato ampiamente dimostrato che le HDL esercitano un ruolo protettivo contro la perossidazione lipidica delle LDL indotta da metalli o cellule in coltura (*Parthasarathy S. et al., 1990*). Infatti, le LDL incubate con agenti ossidanti, in presenza di HDL, mostrano un minore incremento di prodotti di perossidazione lipidica (sostanze reattive all'acido tiobarbiturico TBARS e perossidi lipidici) (*Mackness M.I. et al., 1995*) rispetto alle LDL incubate da sole.

Lo studio del meccanismo molecolare con cui le HDL svolgono il loro ruolo protettivo ha evidenziato che alcune proteine associate ad esse, tra queste, la celuroplasmina e la transferrina sono in grado di legare metalli come rame e ferro e pertanto inibire una tappa della perossidazione lipidica (*Kunitake S.T. et al., 1992*).

Altri studi hanno dimostrato che il ruolo protettivo contro la perossidazione lipidica delle LDL coinvolge un meccanismo enzimatico. La maggior parte dell'attenzione sugli enzimi associati alle HDL e che svolgono un ruolo protettivo contro la perossidazione lipidica, è stata rivolta all'enzima paraoxonasi (PON) (*Mackness M.I. et al., 1995*). *Mackness et al.* hanno dimostrato per primi che la paraoxonasi associata alle HDL, di cui si parlerà in maniera più approfondita, esercita un ruolo importante contro il danno ossidativo, ed è il diretto indicatore della qualità delle HDL stesse. Altri autori hanno ipotizzato che altri enzimi associati alle HDL come la PAF-AH, la LCAT, la Fosfolipasi-D e la Proteasi, svolgano anch'essi un ruolo protettivo contro la perossidazione lipidica, tuttavia tali funzioni protettive non sono state confermate in studi successivi.

*Bowry et al.* (1992) inoltre, hanno dimostrato che le HDL plasmatiche hanno una maggiore predisposizione ad accumulare idroperossidi lipidici rispetto alle altre classi lipoproteiche, ed è stato ipotizzato, che le HDL possano fungere da trasportatori di idroperossidi dalle cellule che hanno subito l'insulto ossidativo verso il fegato, a livello del quale avviene una successiva detossificazione dei prodotti di perossidazione lipidica.

Particelle simili alle HDL per composizione e struttura sono state isolate nel liquido interstiziale e nel CSF (*Kock S et al. 2001*) (*Borghini I et al. 1995*), suggerendo che esse possano svolgere un ruolo protettivo contro la perossidazione lipidica non solo delle lipoproteine ma anche delle membrane cellulari e del cervello (*Mulder M 1998*).

## TRASPORTO E CLEARENCE DEL BETA AMILOIDE (A $\beta$ )

Il peptide A $\beta$  è sintetizzato costitutivamente e secreto da una varietà di altri tipi di cellule (*Haas C et al, 1992*). Nel cervello, le cellule neuronali, in particolare i neuroni, ma anche gli astrociti e le cellule gliali (*Leblanc AC et al, 1996*), sono la principale fonte di A $\beta$  (*Figura 7*). In condizioni fisiologiche A $\beta$  non è mai presente in forma libera ma è sempre associato alle lipoproteine. Le proprietà idrofobiche di A $\beta$  costituiscono la base per la sua associazione con le lipoproteine.

Le HDL rappresentano uno dei principali trasportatori di A $\beta$  sia in circolo (*Koudinov AR, 1997*) sia nel CSF (*Biere A.L. et al., 1996*) (*Koudinov AR 1996*).

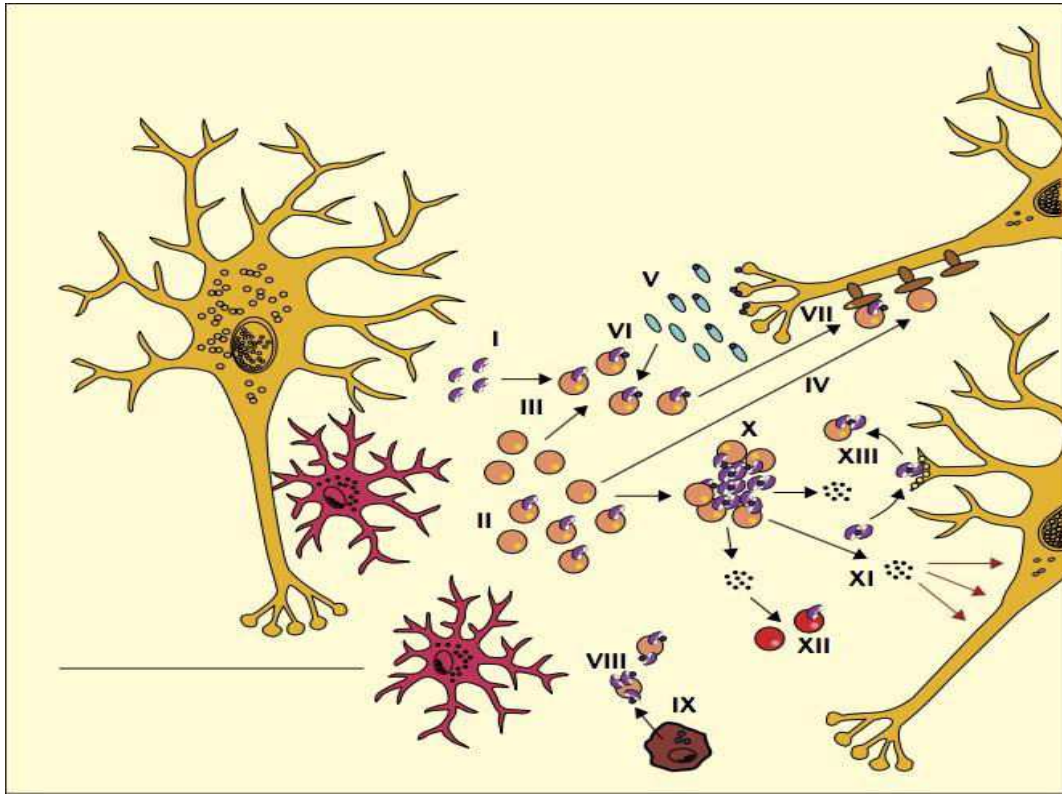
Pertanto è stato ipotizzato che le HDL abbiano un ruolo fondamentale nel metabolismo A $\beta$ , compreso il trasporto di A $\beta$  attraverso la BBB, nel mantenimento dell'integrità di BBB (*Zlokovic, 2013*). Studi di *Farhangrazi Z.S. et al. (1987)* su colture di cellule corticali hanno dimostrato che l'interazione tra A $\beta$  e HDL può prevenire il diretto effetto tossico dell'A $\beta$  sui neuroni.

E' stato ipotizzato che il  $\beta$  amiloide associato alle lipoproteine in condizioni fisiologiche possa fungere da chelante di metalli di transizione e svolgere un ruolo protettivo e antiossidante (*Figura 7*). Come schematizzato in *Figura 7* in condizioni di stress, le cellule neuronali aumentano la secrezione di A $\beta$ , elevandone i livelli nelle lipoproteine. I livelli elevati di A $\beta$  nel fluido extracellulare possono provocare la dissociazione del peptide dalle lipoproteine e provocare la formazione di aggregati amiloidei (fibrille, placche). Alcuni aggregati di A $\beta$  sono in grado di generare specie reattive dell'ossigeno che possono ossidare le lipoproteine e indurre danni alle cellule neuronali. L'ApoE associata alle HDL ha un ruolo determinante nel trasporto e nel metabolismo del peptide. L'isoforma ApoE4 della proteina è considerata un marker di rischio per lo sviluppo della demenza e dell'Alzheimer (*Montine T.J. et al., 1997*). Infatti l'isoforma E4 dell'Apo E interagisce con l'A $\beta$  formando un complesso stabile, in questo modo impedisce la degradazione del peptide (*Castellano et al., 2011, Deane et al., 2008, Hawkes et al., 2012, Verghese et al., 2013*) e favorisce la sua polimerizzazione in filamenti neurotossici, alla base delle lesioni neurodegenerative caratteristiche della malattia di Alzheimer (*Farhagrazi Z.S. et al., 1987, Hafezi-*



*Moghadam et al., 2007, Methia et al., 2001, Nishitsuji et al., 2011).*

La presenza di ApoE4 porta quindi ad una deposizione più precoce e in modo più esteso dell'A $\beta$  che è stata rilevata in soggetti affetti da AD ( *Drzezga et al., 2009, Fleisher et al., 2013, Jagust et al. , 2010, Morris et al., 2010, Rowe et al., 2010* ).



**Figura 7 :** *Aβ fisiologico e disfunzionale nel cervello.*

Aβ (mostrato in violetto) è secreto nel fluido extracellulare o in forma priva di lipoproteine dai neuroni (I) o in associazione con le lipoproteine (arancio) dagli astrociti (II); La lipoproteina-libera Ab e si lega poi alle lipoproteine (III). Le lipoproteine servono a fornire lipidi ai neuroni tramite recettori apoE (marrone) (IV). Le sinapsi rilasciano nello spazio sinaptico gli ioni metallici di transizione (rame, zinco; azzurro) legati a chaperoni di metallo (blu) (V); Le lipoproteine associate all'Aβ e con i metalli di transizione che le chelano e le proteggono dall'ossidazione (VI); i metalli vengono poi riciclati (VII). In condizioni di stress, le cellule neuronali aumentano la secrezione di Aβ, elevandone i livelli nelle lipoproteine (VIII). L'Aβ secreto potrebbe funzionare come chelante per i metalli liberati dalle cellule morte (IX). I livelli elevati di Ab nel fluido extracellulare possono provocare la dissociazione del peptide dalle lipoproteine e la sua eccessiva aggregazione a metalli di transizione, provoca la formazione di aggregati amiloidei (fibrille, placche) (X). Alcuni aggregati di Aβ sono in grado di generare specie reattive dell'ossigeno (nero), che sono tossiche per i neuroni (XI) e possono ossidare le biomolecole, incluse le lipoproteine (XII), che diventano disfunzionali (rosse). Gli oligomeri di Aβ possono indurre ugualmente la rimozione del colesterolo (giallo) dai neuroni e sono tossici, causando la degenerazione (XIII) (*Lipid peroxidation and Alzheimer's disease: Key role of Amyloid-β* Anatol kontush inserm Unité 551).

## **4. *Paraoxonasi: enzima-chiave per la funzionalità delle HDL***

La Paraoxonasi (PON) è una glicoproteina (peso molecolare di 43KDa), sintetizzata a livello epatico e distribuita in vari tessuti come il fegato, il rene, l'intestino e nel siero (*LaDu BN et al. 1993, Mackness MI et al. 1996*). Nel siero, la PON è strettamente associata alle lipoproteine ad alta densità (HDL), particolarmente alla sottoclasse che contiene Apo A-I e Apo J (clusterine) (*Blatter MC et al. 1993*). La paraoxonasi-1 (PON-1) è uno dei tre membri della famiglia di enzimi PON (PON-1, PON-2, PON-3) (*Paragh G. et al., 2002*). PON-3 e PON-1 sono espressi e sintetizzati esclusivamente nel fegato, mentre PON-2 è espresso in vari tessuti (cervello, fegato, rene, e testicoli). PON-1 e PON-3 sono secreti dalle cellule epatiche e si trovano in circolo associate alle lipoproteine ad alta densità (HDL), ma nel siero umano PON-1 mostra un'attività predominante rispetto a PON-3. Questi enzimi sono ancorati alle HDL tramite una sequenza leader idrofobica N-terminale. PON-2 è, invece, presente in molti tessuti ma non è rilasciata dalle cellule (*Deakin S. et al., 2002*).

### **4.1 *Sequenza aa e struttura***

I tre geni della paraoxonasi sono mappati a livello del braccio lungo del cromosoma 7 (7q21-7q22) in stretta associazione con il gene interessato nella fibrosi cistica. I geni PON1 e PON2 umani contengono nove esoni ciascuno, che codificano il trascritto primario per la porzione strutturale della proteina. Le giunzioni tra esoni ed introni nei due geni sono localizzate in posizioni equivalenti (*Primo-Parmo SL et al. 1996*). PON1 è stata la prima proteina ad essere identificata ed è

pertanto la forma maggiormente studiata, ha un peso molecolare pari a 43KDa.

Studi effettuati sull'enzima purificato e cristallizzato hanno evidenziato che la struttura terziaria della paraoxonasi è costituita da sei gruppi di quattro foglietti  $\beta$  e tre  $\alpha$ -eliche e formano un anello che racchiude due atomi di calcio.

I residui idrofobici si trovano prevalentemente a livello delle  $\alpha$ -eliche, coinvolte nell'ancoraggio della PON1 alla superficie delle HDL.

La PON1 presenta una sequenza leader amino-terminale tipica delle proteine secrete. La caratterizzazione dei cloni cDNA della PON1 umana ha confermato che la sequenza segnale non è processata (eccetto il residuo di metionina N-terminale) e che ciascun clone umano è poliadenilato in siti differenti. Il cDNA codifica una proteina di 355 AA. Inoltre, esiste una sorprendente similarità nucleotidica e aminoacidica ( $> 85\%$ ) tra la PON1 umana e quella di diverse specie animali, suggerendo una forte conservazione durante l'evoluzione di questa proteina, probabilmente collegata all'importante ruolo metabolico che essa svolge (*Primo-Parmo SL et al. 1996*).

L'enzima PON1 è una glicoproteina e presenta 4 siti di glicosilazione e i carboidrati rappresentano all'incirca il 15,8% del peso totale. Attraverso due approcci complementari, si è cercato di identificare alcuni residui aminoacidici essenziali per lo svolgimento della attività catalitica. Studi effettuati mediante la marcatura di gruppi specifici dell'enzima nativo purificato, hanno indicato che uno o più residui di triptofano, istidina, acido aspartico e glutammico potrebbero essere importanti per l'attività catalitica della PON1. I residui aminoacidici essenziali identificati potrebbero far parte dei siti attivi dell'enzima, sia come ligandi dello ione calcio, sia come siti che interagiscono con il substrato (*Josse D et al. 1999*).

Nella sequenza aminoacidica della paraoxonasi sono presenti due siti di legame per il calcio, un sito ad alta affinità ( $K_d=3,6 \pm 0,9 \times 10^{-7}$  M) che è necessario per mantenere sia l'attività idrolitica sia la stabilità strutturale e un sito a bassa affinità ( $K_d=6,6 \pm 1,2 \times 10^{-6}$  M) che è richiesto per l'attività

catalitica (*Kuo CL et al. 1998*).

Nella PON1 umana purificata sono presenti soltanto tre residui di cisteina e la loro posizione all'interno delle varie specie di organismi è molto ben conservata (Cys-41, Cys-283, Cys-352). I residui in posizione 41 e 352, situati nell'estremità amino-terminale e carbossi-terminale della proteina, formano un legame disolfuro intramolecolare. L'unica cisteina libera, quella in posizione 283, è localizzata in prossimità del centro attivo dell'enzima. Tuttavia, esperimenti effettuati sostituendo la Cys-283 con la serina o con l'alanina e quindi producendo enzimi mutanti, hanno dimostrato che il gruppo sulfidrilico libero non è richiesto per l'attività enzimatica (*Sorenson RC et al. 1995*).

Un'altra caratteristica della sequenza aminoacidica della PON1, è l'elevata concentrazione di residui aminoacidici idrofobici. Questa caratteristica è da mettere in relazione con le interazioni tra PON1 e altri componenti della superficie delle HDL. Infatti è stato evidenziato che la PON1 interagisce con l'Apo AI e i fosfolipidi delle HDL. Modifiche della struttura primaria dell'ApoAI infatti si riflettono in alterazioni dell'attività della PON1 (*Oda MN et al. 2001*). L'affinità tra l'enzima e i fosfolipidi della superficie delle HDL, è confermata dall'estrema difficoltà che si incontra nella purificazione dell'enzima. Inoltre, la PON1 purificata dal plasma umano presenta una bassa attività catalitica, che aumenta in seguito ad incubazione con fosfolipidi, in particolare con la fosfatidilcolina (PC). Questi dati suggeriscono che l'attività della paraoxonasi, è modulata dai lipidi presenti nel microambiente che circonda la proteina (*La Du BN et al. 1999*).

## ***4.2 Attività della paraoxonasi e funzionalità delle***

### ***HDL***

La denominazione PON-1, il primo enzima della famiglia ad essere identificato nel 1946, deriva dall'abilità della molecola di idrolizzare il paraoxone, un organofosfato. Gli organofosfati, come il paraoxone o il diazoxone, sono composti presenti nei pesticidi, e l'attività idrolasica della PON-1 nei loro confronti conferisce a questo enzima proprietà detossificanti (*Chemnitz J.M. et al., 1983*). Questa azione la rende importante per la protezione del sistema nervoso dall'attività tossica di tali molecole. Diversi studi hanno dimostrato che PON-1 è in grado di idrolizzare numerosi altri substrati. Recentemente è stata scoperta anche la sua attività idrolasica nei confronti dell'omocisteina tiolattone, metabolita tossico dell'omocisteina capace di danneggiare le proteine attraverso l'omocisteinilazione dei loro residui di cisteina (*Jakubowski H. et al., 2000*). Tuttavia, l'interesse nei confronti di questo enzima è supportato da numerosi studi che hanno dimostrato che PON-1 è in grado di modulare le capacità antiossidanti e antiinfiammatorie proprie delle lipoproteine ad alta densità (HDL) (*Wehr A. et al., 2009*). Una diminuzione dell'attività di PON-1, a causa di fattori genetici e/o ambientali, si riflette in alterazioni delle funzioni protettive esercitate dalle HDL (*Leviev S.D. et al., 2002; Costa et al., 2005*). È fondamentale sottolineare che un fattore fondamentale per determinare la qualità delle HDL è proprio la quantità di paraoxonasi presente. La PON-1, dopo essere stata sintetizzata dal fegato e, una volta associata alle HDL, svolge numerose azioni protettive.

All'inizio degli anni '90, *Mackness et al.* ipotizzarono che l'enzima fosse in grado di prevenire o limitare l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità. PON-1 inizia ad essere considerato anche per la sua attività antiossidante e questo è stato un punto di svolta considerando la relazione tra stress ossidativo, ossidazione delle LDL, e aterosclerosi (*Mackness M.I et al., 1991; Watson A.D. et al., 1995*).

Un legame specifico tra PON-1 e la membrana plasmatica dei macrofagi è stato dimostrato *da Efrat et al. nel 2008 (da Efrat et al. nel 2008)*. Pertanto il ruolo antiossidante delle HDL potrebbe essere legato alla loro capacità di accettare i fosfolipidi ossidati da membrane biologiche.

Come riassunto nella *Figura 10* le HDL potrebbero accettare fosfolipidi ossidati da lipoproteine o membrane cellulari ossidate e promuovere il loro trasporto al fegato e la loro successiva eliminazione. PON-1 potrebbe essere coinvolto nell'efflusso di fosfolipidi ossidati dalle cellule alle HDL e nella loro idrolisi.

Sebbene il substrato fisiologico e il meccanismo molecolare alla base dell'azione protettiva di PON-1 contro la perossidazione lipidica non siano completamente chiari, è stato suggerito che la PON-1 sia in grado di idrolizzare gli acidi grassi (arachidonico e linoleico) ossidati presenti nei fosfolipidi in posizione Sn2 e negli esteri del colesterolo (*Mackness M.I et al., 1991; Watson A.D. et al., 1995; Aviram M. et al., 1998; Kuremoto K. et al., 2003*).

*Rosenblat M. et al. (2006)* hanno proposto un meccanismo basato sulla iniziale formazione di un lattone e la sua successiva idrolisi, mentre altri autori hanno invece dimostrato altre attività della PON-1, come quella di idrolizzare i fosfolipidi ossidati in posizione Sn2 con conseguente formazione di liso-fosfatidilcolina e altri prodotti inattivi.

Il ruolo protettivo svolto dalla paraoxonasi nei confronti dello sviluppo dell'aterosclerosi e nella protezione dell'ossidazione delle lipoproteine plasmatiche è stato confermato anche da studi condotti su modelli animali. HDL isolate da topi transgenici PON-1 "knockout" non sono in grado di inibire la perossidazione lipidica delle LDL; inoltre i macrofagi isolati da tali topi transgenici contengono una maggiore quantità di prodotti di perossidazione lipidica e hanno una maggiore capacità di ossidare le LDL (*Shih D.M. et al., 1998*). I topi Apo E knockout (Apo E *-/-*) sono un modello molto utilizzato per lo studio dello sviluppo di lesioni aterosclerotiche. I topi ApoE e PON-1 knockout (Apo E *-/-*/PON1 *-/-*) erano più suscettibili allo sviluppo di aterosclerosi rispetto a topi Apo E *-/-* , confermando il ruolo di PON-1 nella prevenzione della patologia (*Shih DM et al., 2000*). Viceversa i topi nei quali viene indotta una sovra-espressione di PON-1 sono maggiormente protetti

nei confronti dello sviluppo dell'aterosclerosi rispetto a topi wild-type e Apo E-/- (*Tward A. et al., 2002*).

Studi condotti sull'uomo hanno confermato la relazione tra PON-1 e perossidazione lipidica. Una diminuzione dell'attività di PON-1 è associata ad un aumento significativo dei marcatori biochimici di perossidazione lipidica (idroperossidi lipidici e TBARS) nel plasma di soggetti sia in condizioni normali sia patologiche (*Ferretti G. et al., 2004;2005;2008*). La relazione negativa stabilita tra l'attività di PON-1 e i livelli di markers di perossidazione lipidica, idroperossidi lipidici (*Ferretti G. et al., 2004*) e esteri del colesterolo (*Ferretti G. et al 2004*) nel plasma di soggetti normali, conferma che soggetti con attività di PON-1 più bassa sono più esposti alla perossidazione lipidica.

Studi condotti su soggetti normolipidemici, hanno evidenziato che l'attività della PON-1, valutata sia nel plasma sia nelle HDL isolate, mostra una grande variabilità all'interno della popolazione, con soggetti a bassa e alta attività (*Blatter Garin M.C. et al., 2003; Ferretti G. et al., 2004, 2005*).

Una significativa diminuzione dell'attività di PON-1 è stata osservata in pazienti affetti da varie patologie associate a stress ossidativo e sviluppo di aterosclerosi (*Quijada Z. et al., 2008; Genest J. et al., 1991*), nel diabete di tipo 1 e obesità (*Ferretti G. et al., 2004, 2005*), ipercolesterolemia (*Mackness M.I., et al., 1991*), insufficienza renale (*Ferretti G. et al., 2008*) e in soggetti dopo un infarto del miocardio (*Ayub A. et al., 1999*). Recenti studi hanno inoltre dimostrato che alterazioni dell'attività della PON1 anche in patologie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer e sclerosi multipla (*Paragh G. et al., 2002; Dantoine T.F. et al., 2002; Ferretti G. et al., 2005*).

E' importante sottolineare che nella maggior parte dei casi le alterazioni nei livelli e nell'attività di PON1 si verificano in assenza di modifiche nei livelli di HDL circolanti.

Numerosi studi hanno dimostrato che le HDL ossidate e con una ridotta attività di PON1 perdono le loro proprietà antiaterogeniche, convertendosi in "HDL disfunzionali" (*Van Lenten et al.,1995*). (*Mendez AJ, 1997; Navab et al., 2009*). Le HDL disfunzionali perdono le loro normali attività biologiche, come la capacità di mediare il trasporto inverso del colesterolo e le loro proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. Le HDL "disfunzionali" non solo non svolgono efficacemente le



loro azioni protettive, ma possono manifestare ruoli-pro-infiammatori e pro-aterogenici.

Quindi la valutazione dei livelli e dell'attività della paraoxonasi rappresenta un parametro importante per definire la funzionalità delle HDL.

### ***4.3 Fattori che modulano l'attività di PON-1***

La concentrazione e l'attività della paraoxonasi nella popolazione presenta una grande variabilità (Ferretti G. et al., 2001;2004;2005). Le variazioni dell'attività della PON-1 possono essere dovute sia a fattori congeniti legati prevalentemente al polimorfismo della PON-1 sia a fattori acquisiti.

La paraoxonasi presenta numerosi siti polimorfici, sia nella regione del promotore sia in quella codificante. Sebbene numerosi studi siano stati effettuati per evidenziare un legame tra i polimorfismi di PON-1 e l'insorgenza di patologie legate allo stress ossidativo, soprattutto aterosclerosi, i risultati sono spesso contrastanti (Mackness M. et al., 2004). Recenti studi hanno dimostrato che l'attività e la concentrazione di PON-1 nel plasma è maggiormente legata al rischio di patologie cardiovascolari rispetto al polimorfismo e rappresenta pertanto un fattore di rischio indipendente (Mackness M. et al., 2004; Mackness B. et al., 2001).

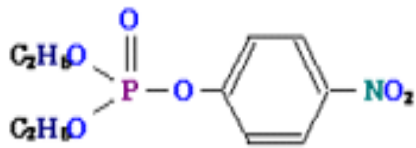
L'attività dell'enzima paraoxonasi-1 è strettamente modulata dalle caratteristiche composizionali e strutturali delle HDL. Infatti PON-1 sintetizzata principalmente a livello epatico (ma anche nel rene e nell'intestino) viene secreta nel sangue dopo la rimozione del residuo di metionina dell'N-terminale e circola associata esclusivamente alle HDL. Tre  $\alpha$ -eliche sono collocate all'estremità in alto della struttura della PON-1 e servono per ancorare l'enzima alle HDL. Tale interazione è mediata dai fosfolipidi superficiali e dalle apoproteine delle HDL. In particolare l'apoA-I è importante sia per l'attivazione che per la stabilizzazione dell'enzima (Harel et al., 2004).

Aviram M. et al., (1999) hanno dimostrato che la paraoxonasi è un enzima lipide-dipendente e che la composizione del micro-ambiente idrofobico delle HDL è un fattore cruciale per l'attività della

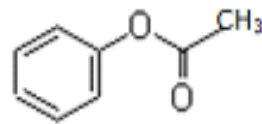
PON-1: fosfolipidi, specialmente con acidi grassi a lunga catena, sono necessari per l'interazione tra HDL e PON-1 e per la stabilità dell'enzima. Pertanto alterazioni della composizione lipidica e apoproteica o modificazioni delle proprietà fisico-chimiche delle HDL si riflettono in modificazioni dell'attività dell'enzima (*Calabresi L. et al., 2004*). Recenti studi hanno dimostrato alterazioni composizionali delle HDL in condizioni patologiche (*Ferretti G. et al., 2004;2005*). Inoltre, PON-1 è molto sensibile all'inattivazione da parte di prodotti di perossidazioni lipidica (*Aviram M. et al., 1999;2000a*). Studi condotti *in vitro*, hanno dimostrato che l'attività di PON-1 è protetta dall'azione di molecole antiossidanti come polifenoli (quercetina e glabrina) e vitamine antiossidanti (*Aviram M. et al., 2000 b*).

Studi su cellule di epatoma umano mostrano che citochine pro-infiammatorie (interleuchina 1 $\beta$  e fattore di necrosi tumorale) modulano negativamente l'attività di PON-1 (*Kumon Y. et al., 2003; Cheng C.C. et al., 2013*). Il ruolo modulatore dell'infiammazione sull'espressione di PON1 è confermata da studi su modelli animali hanno dimostrato una riduzione della sintesi epatica di PON-1 in seguito all'induzione dell'infiammazione mediante somministrazione di lipopolisaccaride (LPS) (*Ali A. et al., 2003*).

1. Organofosfato (paraoxone), agenti nervini (sarina, samanina),  
esteri organici (fenilacetato)
2. Lattoni e tiolattoni (omocisteina-tiolattone)
3. Fosfolipidi contenenti acidi grassi perossidati e prodotti di  
perossidazione degli esteri del colesterolo



Paraoxone



Fenilacetato

*Figura 8 : Principali substrati utilizzati dalla PON1.*

# **MATERIALI E METODI**

## *Casistica*

Nello studio sono stati reclutati 76 pazienti affetti dal morbo di Alzheimer afferenti all'Ospedale Torrette di Ancona, reparto Neurologia, e 49 controlli selezionati affinché presentassero le stesse caratteristiche anagrafiche (sesso, età) dei pazienti.

Per stimare la gravità del danno neurologico dei pazienti inclusi nello studio è stata utilizzata la scala di valutazione “Mini Mental State Examination”, MMSE (*Folstein et al., 1975*). Il valore di MMSE osservato nei pazienti è 21,26 che corrisponde ad una forma di Alzheimer lieve.

La *Tabella 8* riassume i dati clinici dei soggetti coinvolti in questo studio. Non sono state osservate differenze significative dei livelli di colesterolo totale, colesterolo HDL, rapporto colesterolo totale e colesterolo HDL, e colesterolo LDL tra i controlli e i soggetti affetti dal morbo di Alzheimer.

	CONTROLLI (n=49)	PAZIENTI (n=76)
Sesso (MF)	29/20	40/36
Età ( anni )	72±10	76±6
Indice MMSE	n.d.	21,2±5,4
Colesterolo Totale, mmol/L	190,9 ±29,1	195,4±40,2
Colesterolo HDL, mmol/L	58,5±12,4	58,1±15,5
Colesterolo/Colesterolo HDL	3,27± 2,23	3,4±0,7
Colesterolo LDL, mmol/L	117,2± 25,2	115,5±28,8

**Tabella 8 :** *Dati clinici dei soggetti coinvolti nello studio.*

### ***Separazione del plasma***

I campioni di sangue sono stati ottenuti in tutti i soggetti mediante prelievo venoso periferico. Un volume di sangue è stato prelevato come anticoagulante al fine di ottenere il siero. Come anticoagulante è stata utilizzata l'eparina.

Il plasma è stato poi immediatamente separato dalla parte corpuscolata, contenente globuli rossi, mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il plasma e i campioni di siero sono stati conservati a -80°C e successivamente utilizzati per le analisi dei parametri biochimici.

## ***Valutazione dell'attività e dei livelli di PON1 nel plasma.***

### ***Western Blot per PON1 e APOA1 associati alle HDL***

Per il rilevamento dei livelli di PON1 e ApoA1 è stato effettuato il western blot dei campioni di plasma dei controlli e dei pazienti AD. L'analisi è stata condotta su 27 pazienti e 15 controlli. Un quantitativo di siero di ciascun soggetto (100 µg proteine), è stato quindi sottoposto ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), impiegando un running gel ad una concentrazione di poliacrilamide pari al 10%.

Terminata la corsa elettroforetica è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana di Polivinilidene Difluoride (PVDF). Il gel è stato immerso nel tampone di trasferimento (CAPS 10 mM, metanolo al 10%, pH 11) per 10'. La membrana di PVDF, essendo altamente idrofobica, è stata dapprima immersa in metanolo al 100% per alcuni secondi, quindi in acqua per 2-3 minuti ed infine nel tampone di trasferimento per 30'. Si è quindi proceduto all'assemblaggio del sistema di trasferimento: su un supporto formato da due lastre di plastica si depongono uno sull'altro in successione una spugnetta e due pezzi di carta da filtro, imbevuti di tampone di trasferimento. Di seguito si aggiungono il gel, la membrana di PVDF (delle stesse dimensioni del gel), altri due pezzi di carta da filtro e un'altra spugnetta (sempre precedentemente imbevuti di tampone di trasferimento). Il dispositivo viene posto tra due elettrodi paralleli all'interno di una vaschetta per elettroforesi contenente il tampone di trasferimento, rivolgendo il lato relativo alla membrana di PVDF verso l'anodo. Le proteine, cariche negativamente, migrano verso il polo positivo passando dal gel alla membrana. Il trasferimento viene protratto per 40' a 250 mA, a 4°C. Le membrane su cui sono state trasferite le proteine relative agli estratti proteici sono state dapprima sottoposte a procedura di bloccaggio, mediante incubazione per 2 ore a temperatura ambiente con Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 140 mM, Tween-20 allo 0,1% e BSA al 2% (soluzione A). Successivamente, sono stati effettuati 3 lavaggi da 5' ciascuno in soluzione A, completamente deprivata della BSA (soluzione B), a cui è seguita un'incubazione (overnight a +4°C) con anticorpi

policlonali di coniglio anti-PON1 (Sigma) (1:1000) e anti ApoAI(Sigma) (1:1000) in soluzione A, contenente BSA all'1% (soluzione C). Sono stati quindi eseguiti 5 lavaggi da 5' ciascuno con la soluzione B ed è stata effettuata un'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari anti-coniglio coniugati con la perossidasi (Sigma), diluiti 1:150000 in soluzione C. Sono stati eseguiti altri 5 lavaggi da 5' ciascuno in soluzione B e si è quindi proceduto alla rilevazione del segnale chemiluminescente relativo alla PON1 e ApoAI mediante l'impiego del *Clarity western ECL*. L'acquisizione delle immagini relative ai filtri ha previsto l'impiego del Gel/Chemidoc (Biorad), strumento in grado di acquisire il segnale chemiluminescente delle bande relative alla PON1 e del software ImageLab per la gestione delle immagini digitali (*Image - J software*).

### ***Attività paraoxonastica di PON1***

L'attività della Paraoxonasi (PON1) è valutata nel plasma isolato da soggetti sani e pazienti Alzheimer utilizzando Paraoxone come substrato. Il saggio è stato condotto su micropiastre a 96 pozzetti, con volume finale di 200  $\mu$ l. L'analisi dell'attività paraoxonastica della PON1 è stata valutata aggiungendo in ciascun pozzetto 10  $\mu$ l di plasma e 200  $\mu$ l di una soluzione costituita da Tampone Tris-HCl 5mM pH 7.4 (Tris 1M, MgCl<sub>2</sub> 1M e NaCl 1M), CaCl<sub>2</sub> 1mM e un'aliquota di Paraoxone alla concentrazione finale di 1mM (Dietil-p-nitrofenolo fosfato). La cinetica della reazione catalizzata dalla PON1 è stata monitorata per 15 minuti a 37°C e l'incremento di assorbanza è stato misurato a 405 nm. L'attività di PON1 è stata calcolata come velocità di formazione di p-nitrofenolo ( $\epsilon= 18,050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ed espressa come U/ml del siero. Un'unità (U) di attività di PON1 è definita come 1 nmol di p-nitrofenolo formato al minuto in presenza delle condizioni di saggio.



## ***Separazione delle lipoproteine ad alta densità plasmatiche***

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono state isolate da plasma ottenuto da soggetti sani e pazienti affetti da Alzheimer. La separazione delle HDL ( $\rho=1,063-1,210$  g/ml) è stata eseguita mediante ultracentrifugazione su gradiente di densità di bromuro di potassio con rotore verticale alla velocità di 65.000 rpm per 1 ora e 30 minuti, adattando la metodica di *Chung B.H. et al. (1986)*. Questa procedura per l'isolamento e l'analisi delle classi lipoproteiche del plasma oltre che un'ottima risoluzione, presenta numerosi vantaggi rispetto ai metodi di separazione convenzionali. Tra questi, il maggiore vantaggio è il minor tempo di centrifugazione che comporta un minor rischio di danneggiare le lipoproteine contro gli insulti perossidativi.

Le HDL ottenute sono state sottoposte a dialisi per 24 h a 4°C per rimuovere l'eccesso di sale, utilizzando tampone fosfato (PBS) 5mM pH 7,4. Le lipoproteine separate sono state utilizzate entro 24h dall'isolamento.

## ***Determinazione della concentrazione proteica delle HDL***

La valutazione della concentrazione proteica delle HDL è stata effettuata mediante il saggio di Bradford, utilizzando il reattivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), costituito da una soluzione acquosa di Blu Brillante di Comassie (BBC) G-250, metanolo e acido fosforico. La formazione del legame tra il colorante (BBC) presente nel reattivo di Bradford e le proteine del campione da saggiare determina uno spostamento del massimo dell'assorbimento della soluzione da 465 a 595 nm, lunghezza d'onda alla quale viene effettuata la lettura dei campioni. Allestendo una curva di taratura utilizzando una proteina standard (BSA) a concentrazione nota, è possibile ricavare per interpolazione il titolo proteico relativo ai campioni d'interesse.

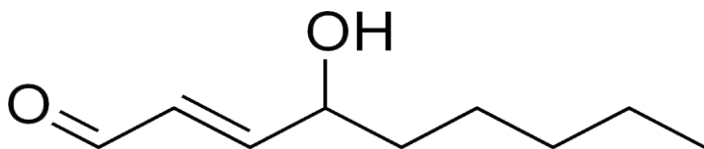
## ***Valutazione dei livelli di 4-idrossinonenale (4-HNE) associati alle HDL***

La molecola del 4-idrossinonenale (4-HNE) è uno dei prodotti finali della perossidazione lipidica altamente reattivo e tossico (*Figura 9*). I livelli di 4-HNE sono stati utilizzati come marker della perossidazione lipidica delle HDL.

Livelli di 4-HNE sono stati valutati mediante mediante Western Dot-Blot.

Le HDL isolate da controlli e pazienti sono state diluite in modo da ottenere una concentrazione pari a 1 mg proteine/mL. Un piccolo volume (1µl) è stato posizionato su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata saturata con BSA 3% per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente incubata overnight con anticorpi anti 4-HNE (Calbiochem) (1:5000) o con anticorpi anti-albumina (Sigma 1:10000). Dopo i lavaggi, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con la perossidasi (Sigma), per un'ora. Sono stati eseguiti altri lavaggi e si è quindi proceduto alla rivelazione del segnale chemiluminescente relativo al 4-HNE mediante l'impiego del Clarity western ECL.

L'acquisizione delle immagini relative ai filtri ha previsto l'impiego del Gel/Chemidoc (Biorad), strumento in grado di acquisire il segnale chemiluminescente delle bande e del software ImageLab per la gestione delle immagini digitali (Image-J software).



***Figura 9:*** *Struttura della molecola 4-HNE.*

## ***Studio del ruolo protettivo delle HDL contro il danno indotto dal $\beta$ -amiloide in cellule endoteliali***

***Colture cellulari*** Per studiare gli effetti citoprotettivi delle HDL abbiamo impiegato cellule endoteliali microvascolari umane (HMEC-1), ampiamente utilizzate per gli studi in vitro per più aspetti biologici dell'aterosclerosi, compresa l'infiammazione e l'apoptosi (*Muñoz-Vega MI, 2017*). Le cellule endoteliali microvascolari umane (HMEC-1) sono state coltivate in MCDB-131 contenente 10% di siero fetale bovino (FBS), 40  $\mu\text{mol/l}$  glutammina e antibiotici (100 U/ml penicillina, 100 mg/ml streptomina). Prima degli esperimenti, le HMEC-1 sono state incubate con terreno privo di siero per 24 ore.

### ***Trattamento con $\beta$ -amiloide in presenza e in assenza di HDL***

Il trattamento delle cellule HMEC-1 è stato effettuato utilizzando  $\beta$ -amiloide peptide (1-40), infatti studi precedenti hanno dimostrato che questo peptide è in grado di indurre tossicità in diversi modelli cellulari (*Harris ME et al., 1995 ; Fonseca AC et al., 2013* ).

Il peptide  $A\beta$  (1-40) è stato disciolto in acqua ( 1mM) e quindi diluito in PBS e incubato a 37°C per 3-5 giorni prima dell'uso.

In una fase preliminare dello studio le cellule sono state trattate con crescenti concentrazioni di beta amiloide (peptide 1-40) (rispettivamente 0-20  $\mu\text{M}$ ) e in tempi diversi (0-5 giorni) per individuare le condizioni ottimali. I successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando la concentrazione di beta-amiloide risultata tossica (20 $\mu\text{M}$ ) per 5 giorni.

Al fine di studiare l'effetto protettivo delle HDL le cellule sono state incubate con HDL (100 $\mu\text{g}$  di ApoAI) per tutta la notte. In particolare le HDL sono state diluite in PBS e sterilizzate mediante filtrazione (filtro PES 22 $\mu\text{m}$ ). Le HDL diluite sono state aggiunte alle cellule in modo da

raggiungere la concentrazione pari a 100µg proteine/mL di terreno. Al termine dell'incubazione le HDL sono state rimosse e alle cellule è stato aggiunto il peptide (20µM).

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando HDL isolate da soggetti sani o HDL isolate da soggetti affetti da Alzheimer. Per investigare il coinvolgimento dell'enzima paraoxonasi alcuni esperimenti sono stati effettuati utilizzando HDL trattate con EDTA , un chelante del calcio necessario per l'attività dell'enzima perché la PON-1 è un enzima calcio-dipendente.

### ***Studio della citotossicità***

Per valutare l'effetto citotossico del beta amiloide nelle cellule incubate in assenza e in presenza delle HDL è stato eseguito il test dell'MTT. Tale saggio valuta l'attività catalitica della deidrogenasi mitocondriale che è in grado di scindere l'anello tetrazolico del composto MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], aggiunto al terreno di coltura, convertendolo in un sale di formazano dal colore blu scuro-violetto che si accumula all'interno della cellula vitale. Trattando le cellule con un opportuno reagente, si ottengono dei lisati aventi una colorazione la cui intensità è proporzionale alla quantità di formazano prodotta e di conseguenza al numero delle cellule vitali. L'MTT test permette quindi di evidenziare l'azione citotossica di una sostanza che si definisce tale quando si osserva una diminuzione della vitalità cellulare pari almeno al 30%, rispetto al controllo, a cui si attribuisce il 100% di vitalità .

In sintesi, al termine del trattamento, il terreno delle cellule incubate in diverse condizioni sperimentali, è stato aspirato, i pozzetti sono stati lavati con PBS (tampone fosfato salino), e una volta tolto sono stati aggiunti 500 µL di soluzione di MTT (5mg/ml in PBS) diluiti in terreno completo 1:10.

Dopo un'incubazione di 1 ora a 37°C, il terreno è stato rimosso, sono stati aggiunti 300 µl di DMSO in modo da lisare la parete cellulare e favorire la liberazione dei Sali di formazano prodotti.

Le piastre vengono fatte agitare per 5 minuti a temperatura ambiente e poi sottoposte alla lettura allo spettrofotometro ed è stata eseguita la lettura dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 540 nm, utilizzando un lettore automatico per piastre.

### ***Statistica***

Le analisi condotte sui campioni di plasma dei pazienti Alzheimer e dei controlli per tutte le misurazioni sono state eseguite in doppio.

I risultati delle analisi relative ai parametri biochimici e clinici sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (D.S.). Lo Student's T test è stato utilizzato per valutare la significatività delle differenze. Le differenze sono state considerate significative per  $p < 0,05$  (Microcal Origin 5.0 OriginLab, Northampton MA).

## **LISTA DEI REAGENTI UTILIZZATI**

Eparina (anticoagulante )

PVDF : Membrana di Polivinilidene difluoride ( per Western Blot )

CAPS : acido 3-[cicloesilamino]-1-propansulfonico

Tris-HCl : tampone ( tris(idrossimetil)amminometano cloridrato )

Tween -20 : Polisorbato 20

BSA ( Bovine Serum Albumin ): Albumina di siero bovino

Clarity Western ECL : Substrato Chemiluminescente per Western Blot

# RISULTATI

## ***Attività e livelli di PON1 associati alle HDL: confronto tra controlli e pazienti affetti da Alzheimer***

L'attività dell'enzima PON1 è stata valutata nel plasma di 15 soggetti sani e 27 pazienti affetti dal Alzheimer utilizzando il paraoxone come substrato.

I risultati dimostrano che il valore medio dell'attività paraoxonasi di PON1, riscontrata nel plasma dei soggetti affetti dal morbo di Alzheimer, è circa un terzo di quella di osservata nei controlli ( $293,6 \pm 49,8$  U/mL vs  $100,3 \pm 30,9$  U/mL,  $p < 0,001$  *Figura 10*). È interessante sottolineare che la ridotta attività di PON1 nei soggetti affetti da AD si osserva in assenza di alterazioni dei livelli plasmatici di HDL rispetto ai controlli (*Tabella 5*).

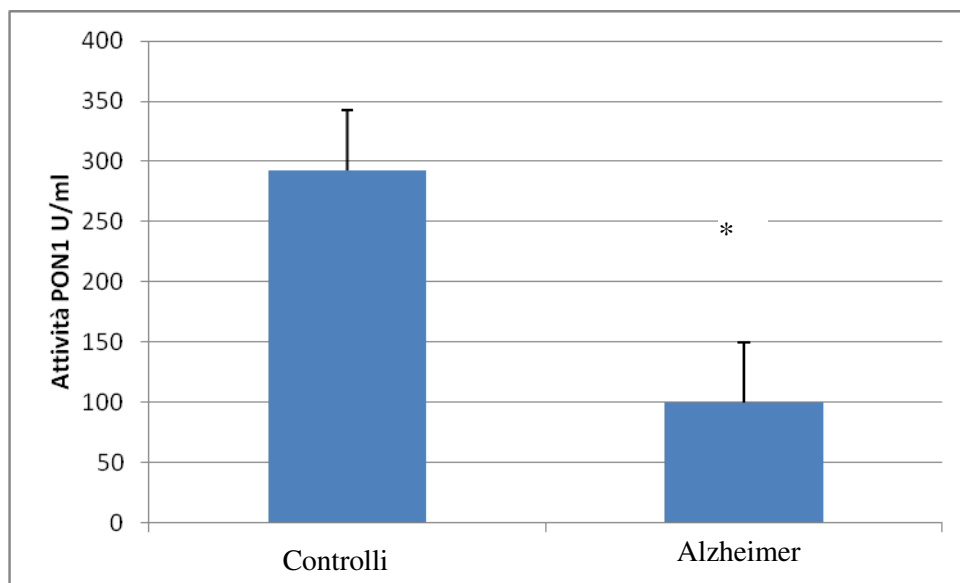
Al fine di confermare le modifiche dell'enzima paraoxonasi-1 nei pazienti, sono stati valutati i livelli di PON1 plasma dei pazienti e nei controlli. I livelli di PON1 e di ApoA1 nel plasma di pazienti AD e dei controlli sono stati valutati tramite il metodo del Western blot. Le figure 7A e 7B mostrano rispettivamente le bande relative alla ApoA1 e PON1 in un gruppo rappresentativo di controlli e pazienti.

L'analisi densitometrica delle bande non ha rilevato modifiche nei livelli di ApoA1 nel plasma dei pazienti e nei controlli (*Figura 11 C*). Al contrario i livelli di PON1 nel plasma dei soggetti affetti da AD risultano significativamente inferiori rispetto a quello osservato nei controlli (*Figura 11 C*), le differenze rimangono significative anche dopo aver normalizzato i livelli di PON1 con i livelli di Apo AI , la principale apoproteina delle HDL. Infatti, come riportato nella figura 7D il valore medio del rapporto PON1/ApoA1 nei pazienti AD è statisticamente inferiore rispetto a quello dei controlli (74% nei pazienti rispetto ai controlli considerati 100%,  $p < 0,05$ ). È stata riscontrata una correlazione positiva tra l'attività e i livelli di PON1 ( $r=0,46$ ;  $< 0,05$ ) nel plasma dei pazienti e dei controlli. Questi dati dimostrano che le HDL dei soggetti affetti da AD presentano minori livelli di

PON1.

**Figura 10 : Attività paraoxonasica nel siero dei controlli e dei pazienti affetti da Alzheimer (AD)**

**\* $p < 0,05$  vs controlli ( CNT )**

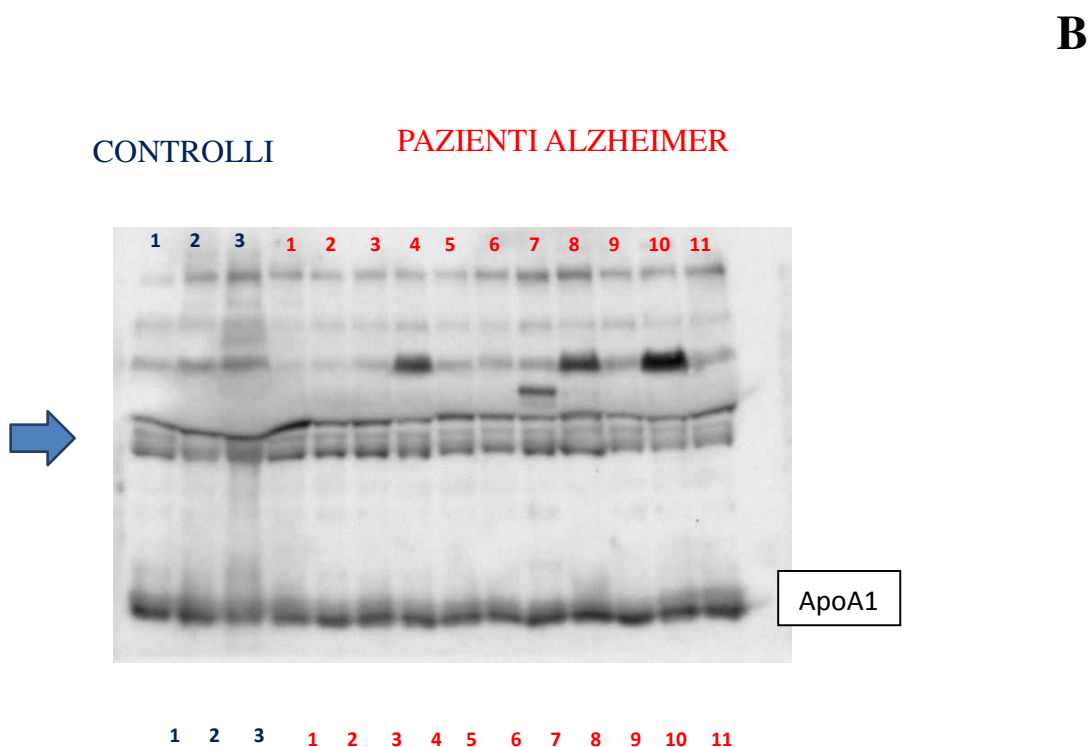
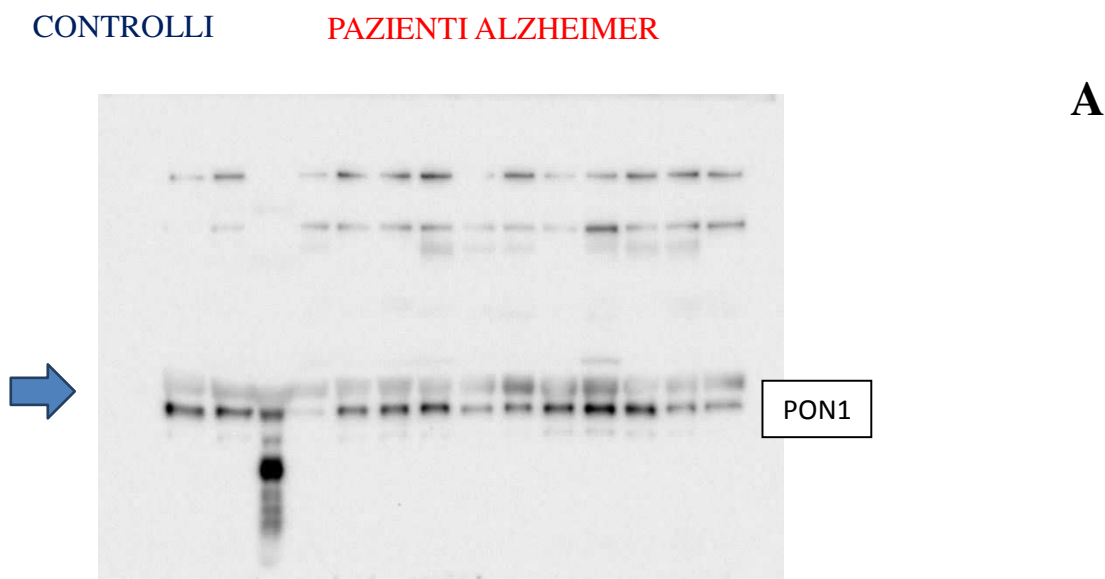


**Figura 11 : Quantificazione mediante WB dei livelli di PON1 e Apo AI nel plasma dei controlli e dei pazienti affetti da Alzheimer (AD).**

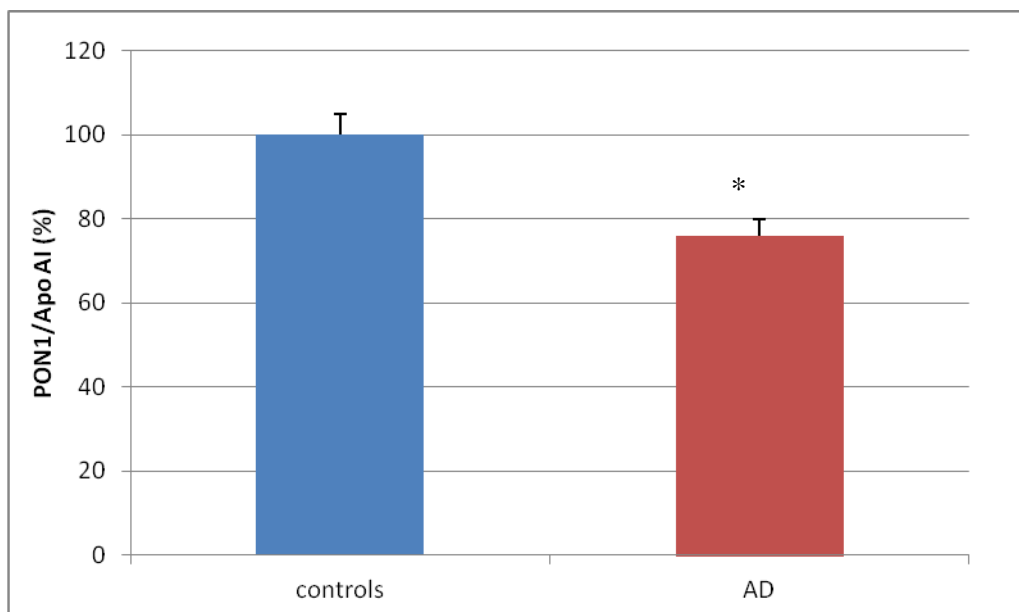
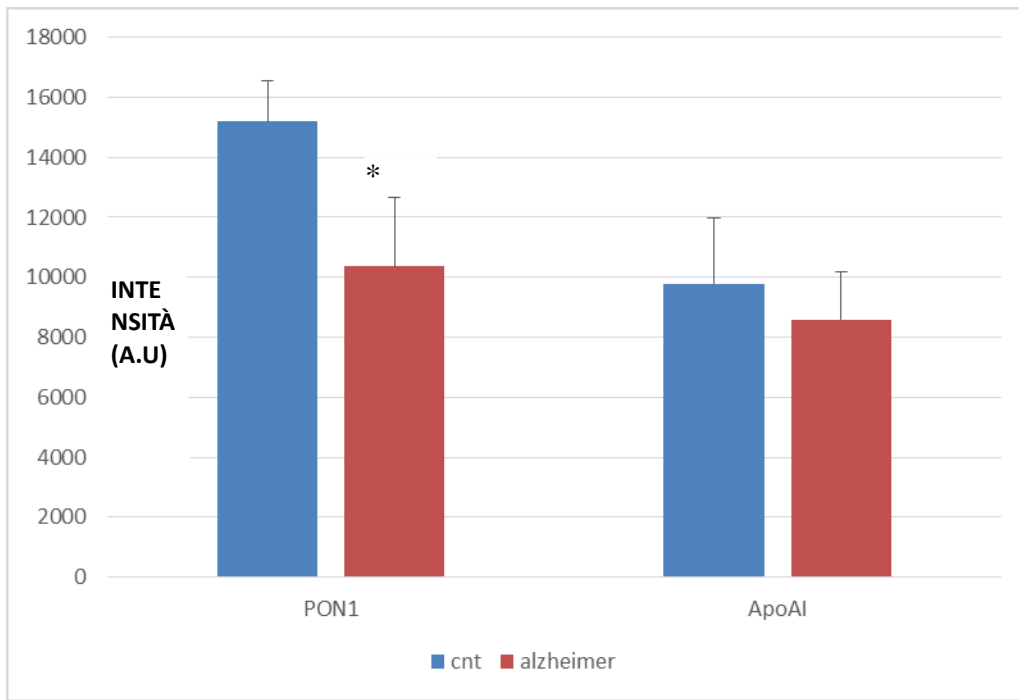
Livelli di Apo AI (A) e PON1 (B) in un gruppo rappresentativo di controlli e pazienti .

(C) Livelli di PON1 e Apo AI nel plasma di pazienti AD e controlli

(D) Modifiche percentuali dei livelli del rapporto PON1/ApoAI nei soggetti affetti da Alzheimer rispetto ai controlli. \*  $p < 0,05$  vs controlli







# ***PEROSSIDAZIONE LIPIDICA DELLE HDL:***

## **confronto tra controlli e pazienti affetti da Alzheimer**

I livelli di 4-HNE sono stati valutati nelle HDL isolate da plasma dei controlli e da plasma dei pazienti AD come markers di perossidazione lipidica delle lipoproteine.

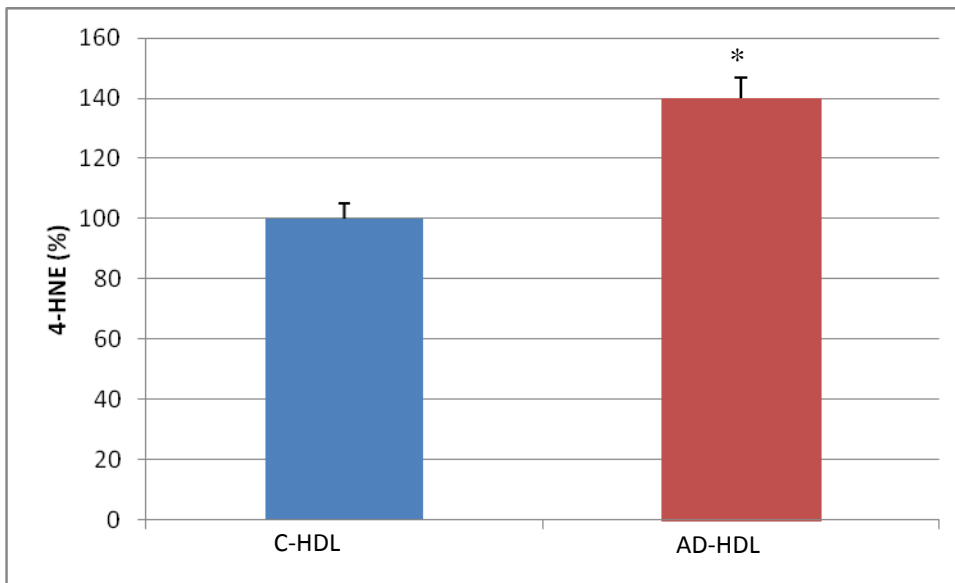
Nella *Figura 12* sono mostrati i valori medi di livelli di 4-HNE valutati tramite DOT-BLOT nelle HDL dei controlli e dei pazienti. I valori medi osservati nelle HDL dei pazienti sono risultati più elevati rispetto a quelli nelle HDL dei controlli ( $p < 0,05$ ) (*Figura 12 A*). I livelli risultano significativamente più alti anche dopo la normalizzazione con i livelli di APO AI (*Figura 12 B*).

Non sono state osservate correlazioni nei livelli di PON1 e 4-NHE osservati nei controlli e nei pazienti AD.

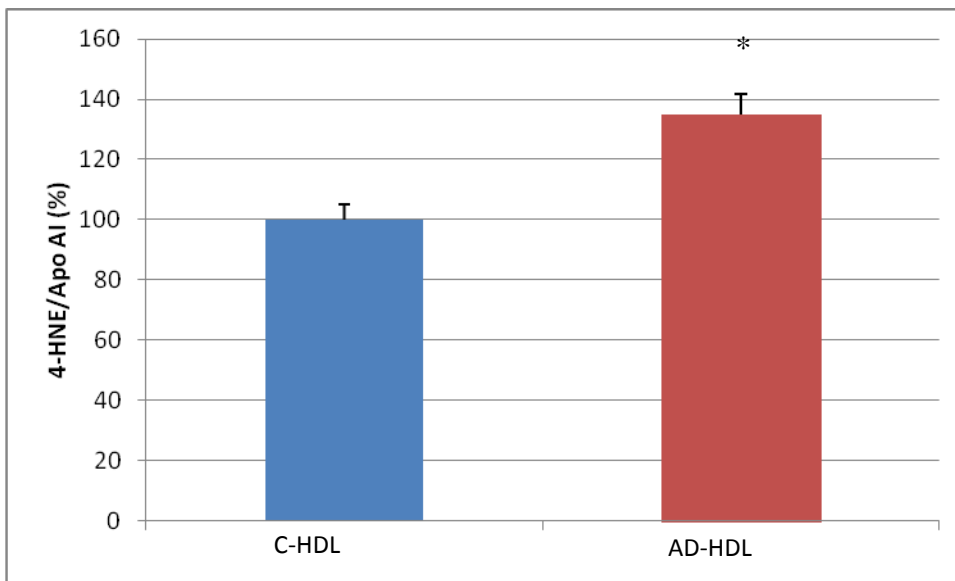
**Figura 12 : Quantificazione Dot-Blot di 4-NHE in pazienti AD.**

Livelli di 4-HNE (A) e Livelli di 4-HNE/ApoA1 (B) nelle HDL isolate da plasma di pazienti AD rispetto ai livelli osservati nelle HDL isolate plasma dei controlli.

\*  $p < 0,05$  vs controlli



**B**



## ***Ruolo delle HDL contro la tossicità del peptide A $\beta$ nelle cellule endoteliali microvascolari: confronto tra controlli e pazienti affetti da Alzheimer***

La tossicità del peptide A $\beta$  (1-40) nelle cellule endoteliali microvascolari (HMEC) è stata studiata tramite il saggio MTT. In una fase preliminare le cellule sono state incubate in diverse condizioni sperimentali (concentrazione di  $\beta$ -amiloide e tempi di incubazione) al fine di individuare le condizioni ottimali. La *Figura 13* mostra la tossicità di crescenti concentrazioni di  $\beta$ -amiloide (5  $\mu$ M A $\beta$ , 10  $\mu$ M A $\beta$  e 20  $\mu$ M A $\beta$ ) incubate con le HMEC per 5 giorni. **Le cellule incubate con 20  $\mu$ M di A $\beta$  hanno mostrato una minore vitalità rispetto alle cellule incubate in assenza di A $\beta$  (*Figura 13 A*), non è stata riscontrata alcuna tossicità nelle cellule incubate con minori concentrazioni di A $\beta$  (5  $\mu$ M A $\beta$  o 10  $\mu$ M A $\beta$ ), pertanto gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando questa concentrazione di peptide.**

Per studiare se le HDL erano in grado di proteggere le cellule dalla tossicità  $\beta$ -amiloide, le HMEC sono state incubate con 20  $\mu$ M di peptide  $\beta$ -amiloide in assenza e presenza di HDL (100ug ApoA1/ml) isolate da controlli o da pazienti affetti da Alzheimer.

A tale scopo sono stati utilizzati un pool di HDL dei pazienti (A-HDL) e un pool di HDL dei controlli (C-HDL).

**Come mostrato in *Figura 13 B*, nelle cellule trattate con A $\beta$  in presenza di C-HDL è stata osservata una maggiore vitalità ( $p < 0,05$ ) rispetto alle cellule trattate in assenza di lipoproteine.**

Questi dati dimostrano che le HDL sono in grado di proteggere del cellule dalla tossicità del  $\beta$ -amiloide.

Per studiare il possibile coinvolgimento dell'enzima PON1 nell'azione protettiva delle HDL contro la tossicità del  $\beta$ -amiloide, le HDL sono state trattate con EDTA. È noto che PON1 è un enzima Ca-dipendente e pertanto l'EDTA è un inibitore dell'attività dell'enzima. **Come mostrato nella**

**Figura 13 B : le HDL trattate con EDTA perdono la capacità di proteggere le cellule contro la tossicità dell'A $\beta$  .**

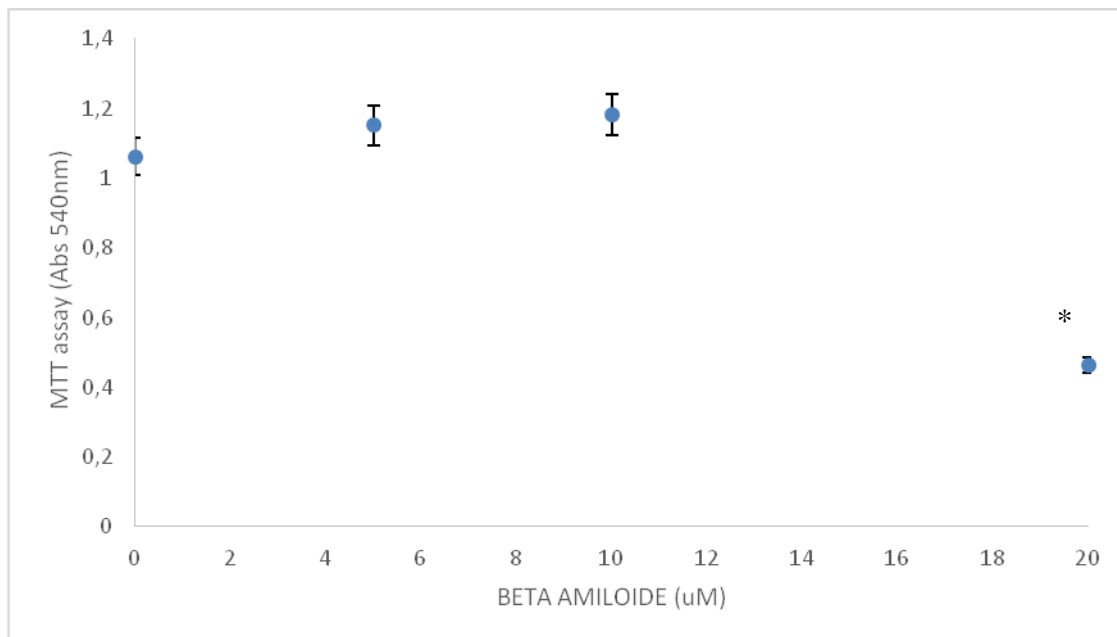
Per valutare se la diminuzione della PON1 e i maggiori livelli di perossidazione osservati nelle HDL dei soggetti affetti da Alzheimer, si riflettevano in alterata capacità protettiva, le cellule HMEC sono state trattate con  $\beta$ -amiloide in presenza di A-HDL (100ug ApoA1/ml). Come mostrato nella **Figura 14**, le A-HDL mostravano minore capacità di proteggere le cellule dalla tossicità dell'amiloide, rispetto alle HDL isolate dai controlli ( $p < 0,05$ ).

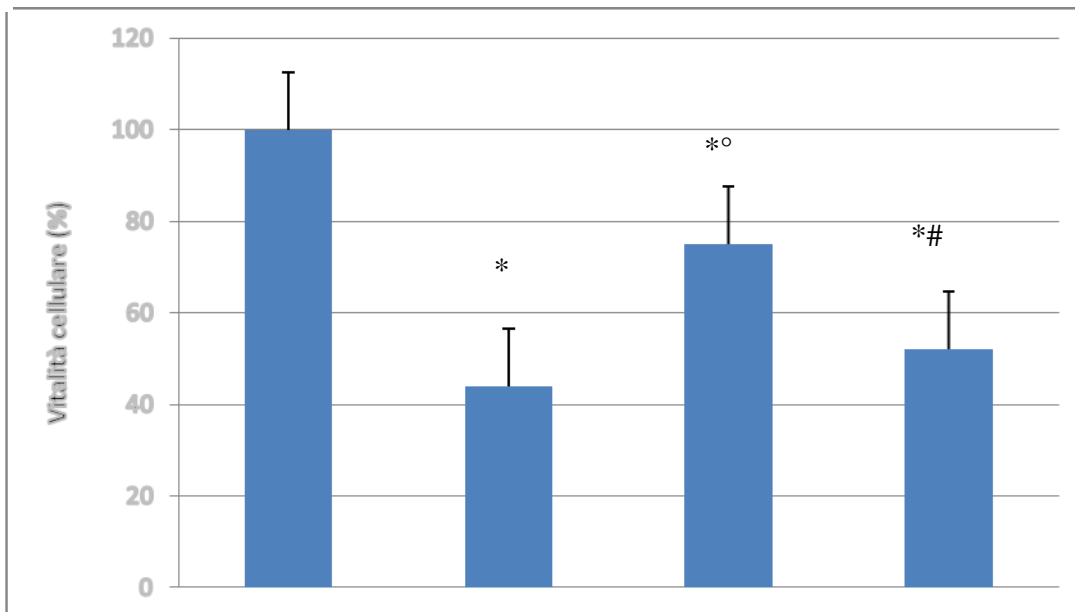
**Figura 13: Tossicità del  $\beta$ -amiloide su cellule HMEC e effetto protettivo delle HDL isolate da controlli.**

(A) Tossicità di crescenti concentrazioni di  $\beta$ -amiloide incubate per 3 giorni

(B) Tossicità del peptide A $\beta$  (20 $\mu$ M) nelle HMEC incubate in assenza o in presenza di HDL (100 $\mu$ g/mL) o HDL+EDTA .

**A**



**B**

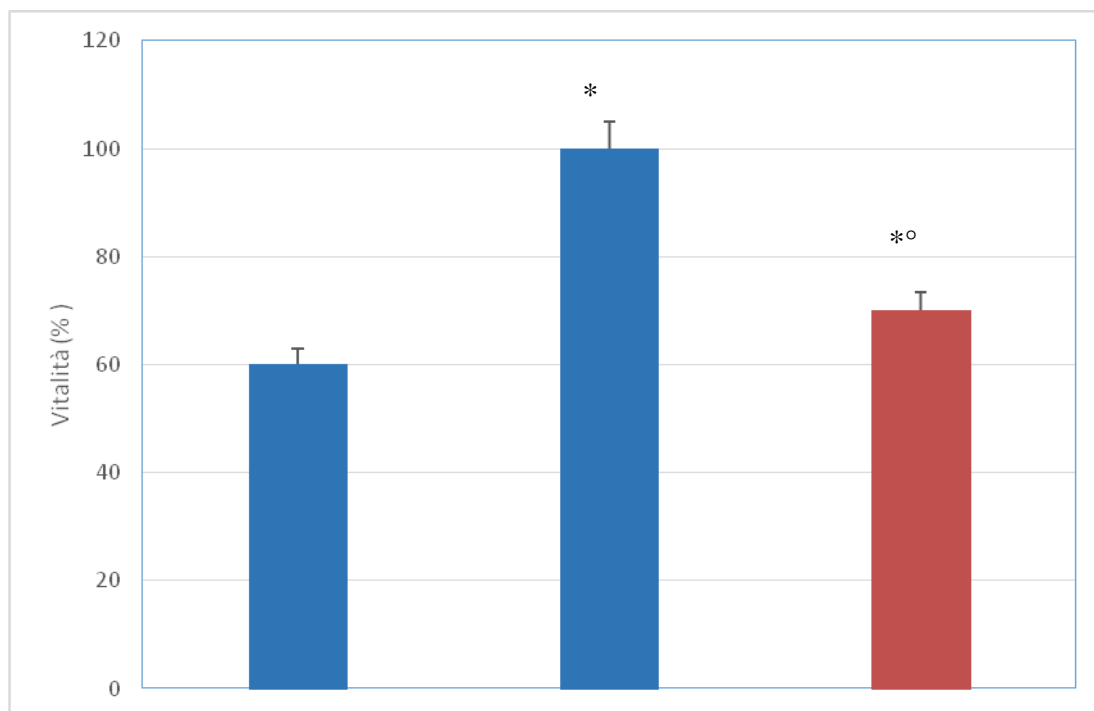
Peptide Aβ (20μM)	-	+	+	+
HDL (100μg/mL)	-	-	+	+
EDTA	-	-	-	+

\*p<0,001 vs cellule incubate da sole

° p<0,001 vs cellule incubate con amiloide

# p<0,001 vs cellule incubate con HDL

**Figura 14 : Effetti protettivi delle HDL isolate da pazienti AD. Tossicità del peptide A $\beta$  (20 $\mu$ M) nelle HMEC incubate in assenza o in presenza delle HDL isolate dai controlli e da pazienti AD.**



$\beta$ -Amiloide (20 $\mu$ M)	+	+	+
C-HDL (100 $\mu$ g/mL)	-	+	-
AD-HDL (100 $\mu$ g/mL)	-	-	+

\*p<0,001 vs cellule incubate con amiloide

° p<0,001 vs cellule incubate con C-HDL

# DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ben nota è la relazione inversa tra livelli circolanti delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e il rischio di aterosclerosi ( *Samouilidou E. et al., 2018* ). Infatti, come descritto nella parte introduttiva della tesi, le HDL sono coinvolte nel trasporto inverso del colesterolo e svolgono numerosi effetti pleiotropici come prevenzione della perossidazione lipidica delle lipoproteine e delle membrane cellulari, ruolo antinfiammatorio, e regolazione della funzione vascolare endoteliale ( *Cap 3.2.3* ). Numerosi studi hanno dimostrato che l'enzima paraoxonasi-1 (PON1) associato alla superficie delle HDL svolge un ruolo determinante nelle funzioni ateroprotettive esercitate dalle *lipoproteine* ( *Cap. 4* ). Una diminuzione dell'attività di PON1 è associata ad alterazioni delle funzioni antiossidanti e infiammatorie delle HDL ( *Bacchetti T. et al., 2015; Eren E. et al., 2012; Ferretti G. et al., 2004;2005;2008* ).

Nel liquido cerebro-spinale umano sono presenti particelle lipoproteiche che presentano caratteristiche composizionali simili alle HDL del plasma. Molti aspetti del metabolismo lipoproteico del sistema nervoso centrale non sono stati ancora chiariti. Tuttavia è stato ipotizzato che le HDL potrebbero partecipare all'omeostasi del colesterolo ed essere fondamentali nel controllo del danno ossidativo nel sistema nervoso centrale ( *Ladu et al. 1998 ; De Vries et al. 1995; Dehouck et al. 1997* ). Pertanto è stato ipotizzato che le HDL svolgano un ruolo importante contro l'insorgenza delle patologie neurodegenerative associate al danno ossidativo.

Scopo della presente tesi è stato approfondire il ruolo delle HDL e della paraoxonasi nel morbo di Alzheimer.

I dati ottenuti hanno evidenziato **una minore attività di PON1 nel plasma dei soggetti affetti dal morbo di Alzheimer** in accordo con studi precedenti ( *Paragh et al., 2002; Dantoine et al., 1998; Erlich et al., 2012; Bacchetti 2015* ). Lo studio ha dimostrato che **la ridotta attività è associata a minori livelli di PON1 nel plasma dei pazienti**, suggerendo una ridotta sintesi epatica dell'enzima. Le modifiche rimangono significative anche dopo la normalizzazione con i livelli



plasmatici di ApoAI, dimostrando che le HDL dei soggetti affetti da Alzheimer presentano minori livelli di PON1 rispetto ai controlli. E' interessante sottolineare che la ridotta attività di PON1 nei soggetti affetti da AD si osserva in assenza di alterazioni dei livelli plasmatici di HDL rispetto ai controlli.

**Le alterazioni della PON1 osservate nei pazienti sono associate ad un significativo aumento della perossidazione lipidica delle HDL** come dimostrato dai livelli maggiori di 4-HNE osservati nelle HDL dei pazienti rispetto ai controlli. Questi risultati sono in accordo con studi che hanno dimostrato che l'Alzheimer è associato al danno ossidativo e alla perossidazione lipidica. Infatti studi precedenti hanno riportato un significativo incremento dei markers della perossidazione lipidica, proteica e degli acidi nucleici nel plasma e nel fluido cerebrospinale dei pazienti (Markesbery WR et al., 1999 ).

Come marker di perossidazione sono stati valutati i livelli di 4-HNE un prodotto finale della cascata perossidativa. Numerosi studi hanno dimostrato che il 4-HNE è una molecola altamente dannosa per le cellule del sistema nervoso centrale come oligodendrociti e cellule endoteliali cerebrali (McCracken E. et al., 2000). Inoltre è stato dimostrato un ruolo del 4-HNE nell'indurre alterazioni della permeabilità della barriera ematoencefalica, nel promuovere l'aggregazione del beta-amiloide e nella formazione delle placche associate allo sviluppo dell'AD.

L'aumento della perossidazione lipidica e una riduzione dei livelli e dell'attività dell'enzima paraoxonasi suggeriscono alterazioni delle funzioni protettive esercitate dalle HDL dei soggetti AD. Al fine di investigare ulteriormente le alterazioni funzionali delle HDL dei pazienti AD, abbiamo valutato la capacità delle HDL di proteggere le cellule dalla tossicità indotta dal beta amiloide in cellule in coltura utilizzando cellule endoteliali microvascolari come modello sperimentale. L'endotelio costituisce una barriera anatomica tra il sangue e l'intima dei vasi e rappresenta l'interfaccia biologica capace di rispondere ai segnali chimici e meccanici generati dai due compartimenti tra i quali l'endotelio è interposto. Le funzioni del normale endotelio includono il controllo della trombosi e della trombolisi, la produzione di molecole di adesione, la regolazione

della risposta infiammatoria, la proliferazione cellulare e la regolazione del tono endoteliale (Robert J et al., 2017). Numerosi studi hanno dimostrato come alterazioni della funzionalità endoteliale sia un fattore importante nella patogenesi dell'Alzheimer (Rory J Kelleher et al., 2013)

Uno dei fattori coinvolti nel danno endoteliale nell'Alzheimer è il  $\beta$  amiloide. Come descritto nella parte introduttiva della tesi l'accumulo del peptide  $A\beta$  nel cervello è l'evento centrale della patogenesi dell'Alzheimer. Un'anomala deposizione del peptide nel cervello causa placche e formazione dei grovigli, danno vascolare e neuronale, perdita cellulare tali da condurre in primo luogo alla demenza.

Nella parte sperimentale si è scelto di trattare le cellule endoteliali con  $\beta$  amiloide (peptide 1-40) in assenza o in presenza di HDL isolate dal plasma di soggetti di controllo e da pazienti affetti da Alzheimer.

**I risultati hanno dimostrato che l' $A\beta$  (peptide 1-40) ad una concentrazione pari a 20  $\mu$ M induce un effetto tossico riducendo la vitalità cellulare.** Questi risultati sono in accordo con studi precedenti in cui si è dimostrata la tossicità dell' $A\beta$  che causa apoptosi cellulare nel cavallo (Fontana A, 1985; Folkman , 1993).

**L'incubazione in presenza di HDL isolate da soggetti sani era in grado di proteggere le cellule dalla tossicità del beta amiloide.** L'EDTA, un inibitore della paraoxonasi in quanto chela gli ioni calcio (indispensabili per l'enzima), **causa una significativa riduzione delle capacità protettive delle HDL sull'azione tossica indotta dal  $A\beta$ .** Questi dati dimostrano il ruolo centrale dell'enzima PON1 nell'azione protettiva esercitata dalle HDL contro la tossicità dell' $A\beta$ .

Tra i meccanismi alla base del ruolo citotossico e pro-apoptotico dell' $A\beta$  vi è un aumento dello stress ossidativo (Cap 2). Pertanto è possibile ipotizzare che le HDL grazie all'azione dell'enzima PON1 siano in grado di proteggere le cellule dal danno ossidativo indotto dall' $A\beta$  e/o interferire con modificazioni del metabolismo cellulare e dei segnali di alcuni mediatori intracellulari indotti dal peptide stesso. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per approfondire i meccanismi alla base del ruolo protettivo esercitato dalle HDL e della paraoxonasi contro la tossicità dell' $A\beta$ .

I risultati ottenuti nella presente tesi hanno dimostrato che le **HDL isolate dal plasma di soggetti affetti da Alzheimer risultano significativamente meno efficienti nel proteggere le cellule dal danno indotto dall'A $\beta$** . Questi risultati suggeriscono che l'aumento dei prodotti di perossidazione e la riduzione dell'attività dell'enzima PON1 osservato nei soggetti affetti da AD rendano le HDL disfunzionali.

Per quanto riguarda la rilevanza fisiologica dei risultati ottenuti, è importante sottolineare che, nelle nostre condizioni sperimentali, l'effetto protettivo esercitato dalle HDL sulla perossidazione lipidica è stato osservato a concentrazioni di HDL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) simili a quelle riscontrate nel liquor cefalorachidiano.

In conclusione, lo studio ha evidenziato che le HDL isolate da plasma umano esercitano un ruolo protettivo contro la citotossicità indotta dall'A $\beta$  in cellule in coltura. Sebbene diversi meccanismi molecolari potrebbero essere coinvolti, un ruolo chiave è svolto dall'enzima paraoxonasi-1.

Le HDL dei soggetti affetti da AD mostrano elevati livelli di prodotti di perossidazione lipidica e presentano una ridotta attività dell'enzima paraoxonasi. Tali modifiche si riflettono in alterazioni delle loro proprietà protettive e risultano meno efficienti nel proteggere le cellule dal danno indotto dall'A $\beta$ .

Le HDL, grazie all'azione antiossidante e antinfiammatoria, svolgono un importante ruolo protettivo contro il danno endoteliale indotto dall'A $\beta$  e da altri stimoli (citochine proinfiammatorie, ROS...) e sono in grado di modulare le funzioni cellulari regolate dallo stato ossidativo intracellulare. Studi recenti hanno dimostrato un ruolo delle HDL nella promozione dell'integrità della BBB e nella clearance dell'A $\beta$  (Stukas S. *et al.*, 2014). È possibile ipotizzare che, in condizioni patologiche come nell'Alzheimer, le HDL subiscano alterazioni composizionali, con un aumento dei livelli dei prodotti di perossidazione e una diminuzione dei livelli di PON, che alterano le loro funzioni convertendosi in "HDL disfunzionali". Le HDL disfunzionali perdono le loro capacità di mediare il trasporto dei lipidi, le loro proprietà citoprotettive e antiossidanti e acquisiscono proprietà pro-infiammatorie, pro-ossidanti e pro-apoptiche. Queste alterazioni

potrebbero favorire i meccanismi molecolari alla base della patogenesi della malattia di Alzheimer.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arnold CS, 1996. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.*; 271(46):28741-4.
2. Attems J et al. 2011. Reduced secretagogin expression in the hippocampus of P301L tau transgenic mice. *J Neural Transm*;118(5):737- 45.
3. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN, 1999. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;19(2):330-5.
4. Aviram M. 1999. Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. *Antioxidant Redox Signal.* Winter;1(4):585-94.
5. Aviram M. 2000. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res.*; 33 Suppl:S85-97.
6. Atwood CS, Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Met Ions Biol Syst.* 1999;36:309-64.
7. Augarten A , Shmilovich H, Doolman R, Aviram M, Akons H, Ben Tur L, Blau H, Kerem E, Rivlin J, Sela BA, Szeinberg A, Yahav Y. 2000 Serum lipase levels as a diagnostic marker in cystic fibrosis patients with normal or borderline sweat tests. *Pediatr Pulmonol.*;30(4):320-3.
8. Bacchetti T, et al. 2015. Higher Levels of Oxidized Low Density Lipoproteins in Alzheimer's Disease Patients: Roles for Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase and Paraoxonase-1. *J Alzheimers Dis.*;47(1):271.
9. Barter PJ, Chang LB, Rajaram OV. 1990. Sodium oleate dissociates the heteroexchange of cholesteryl esters and triacylglycerol between HDL and triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.*;1047(3):294-7.
10. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. 2000. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res.* ; 41(8):1261-7.
11. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. 1994 Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell.*;77(6):817-27.
12. Bertam L. et al., 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.*; 39(1):17-23.
13. Biere A.L., Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ. 1996 Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem* 271(51):32916-22.

14. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem.* 1993 Feb 1;211(3):871-9.
15. Borghini I, Barja F, Pometta D, James RW. 1995. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.*;1255(2):192-200.
16. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. 1992 High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89(21):10316-20.
17. Braak H. et al., 1991. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.*; 1(3):213-6.
18. Castro GR, Fielding CJ. 1988 Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry.* ; 27(1):25-9.
19. Chemnitz JM, Losch H, Losch K, Zech R. 1983. Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate species. *Comp Biochem Physiol C.*;76(1):85-93.
20. Citron M. et al., 1995. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* ; 14(3):661-70.
21. Cole S.L et al., 2007. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener.* ; 2:22.
22. Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM et al., 1986. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.*;128:181-209.
23. Chuang J.Y et al., 2012. Interactions between amyloid- $\beta$  and hemoglobin: implications for amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. *PLoS One* ;7(3):e33120.
24. Costa LG, Cole TB, Furlong CE. 2005. Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine. 1991. *Atherosclerosis.*;86(2-3):193-9.
25. Dantoine TF, Debord J, Merle L, Lacroix-Ramiandrisoa H, Bourzeix L, Charmes JP. 2002 Paraoxonase 1 activity: a new vascular marker of dementia? *Ann N Y Acad Sci.* ; 977:96-101.
26. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB et al., 2008. ApoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.*;118(12):4002-13.
27. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. 2002. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem.*;277(6):4301-8.
28. De Mattos AA, Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhães R, Marroni CA, Zettler CG et al., 2001. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation. *Arq Gastroenterol.* 2001; 38(1):40-7.

29. Demeester N, Baier G, Enzinger C, Goethals M, Vandekerckhove J, Rosseneu M et al., 2000. Apoptosis induced in neuronal cells by C-terminal amyloid beta-fragments is correlated with their aggregation properties in phospholipid membranes. *Mol Membr Biol.*; 17(4):219-28.
30. De Vries HE, Eppens EF, Prins M, Kuiper J, van Berkel TJ, de Boer AG et al., 1995. Transport of a hydrophilic compound into the cerebrospinal fluid during experimental allergic encephalomyelitis and after lipopolysaccharide administration. *Pharm Res.*;12(12):1932-6.
31. Efrat M, Aviram M. 2008. Macrophage paraoxonase 1 (PON1) binding sites. *Biochem Biophys Res Commun.*; 376(1):105-10.
32. Eren E. et al., 2012. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open Biochem J.*;6:78-93.
33. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR.,1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.*; 12(3):189-98.
34. Fonseca AC, Ferreira E, Oliveira CR, Cardoso SM, 2013. Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.*; 1832(12):2191-203.
35. Genest JJ Jr, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Wilson PF, Schaefer EJ. 1991. Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis.* Oct;90(2-3):149-57.
36. Gotto AM Jr, Yang CY, Gu ZW, Weng SA, Kim TW, Chen SH et al. 1989. Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins. *Arteriosclerosis.* 1989 Jan-Feb; 9(1):96-108.
37. Grimmer T, Riemenschneider M, Förstl H, Henriksen G, Klunk WE, Mathis CA et al. 2009. Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biol Psychiatry.*;65(11):927-34.
38. Haas CR, Dietrich K, Hoffmann DH, Boggasch E, Jacoby J, Wahl H. et al.,1992. Charge state of fast heavy ions in a hydrogen plasma. *Phys Rev Lett.*; 69(25):3623-3626.
39. Hawkes CA, Sullivan PM, Hands S, Weller RO, Nicoll JA, Carare RO, 2012. Disruption of arterial perivascular drainage of amyloid- $\beta$  from the brains of mice expressing the human APOE  $\epsilon$ 4 allele. *LoS One.*;7(7):e41636.
40. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Wagner DD, 2007. ApoE deficiency leads to a progressive age-dependent blood-brain barrier leakage. *Am J Physiol Cell Physiol.* ;292(4):C1256-62.
41. Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA, Carney JM. 1995. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol.*; 131(2):193-202.
42. Hillebrands JL, Raué HP, Klatter FA, Hylkema MN, Platteel I, Hardonk-Wubbena A et al.,2001. Intrathymic immune modulation prevents acute rejection but not the development of graft arteriosclerosis (chronic rejection). *Transplantation* 71(7):914-24.

43. Hotzman D.M et al., 2001. Role of apoe/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *J Mol Neurosci.*; 17(2):147-55.
44. Huang X, Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD et al., 2004. Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry.*;43(2):560-8.
45. Huxley RR, Misialek JR, Agarwal SK, Loehr LR , Soliman EZ, Chen LY et al., 2014. Physical activity, obesity, weight change, and risk of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circ Arrhythm Electrophysiol.*;7(4):620-5.
46. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K et al.,1990. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.*; 323(18):1234-8.
47. Işgör MM, Beydemir S. 2010. Some cardiovascular therapeutics inhibit paraoxonase 1 (PON1) from human serum. *Eur J Pharmacol.*; 645(1-3):135-42.
48. Jansen WJ, Ossenkoppele R, Tijms BM, Fagan AM, Hansson O, Klunk WE et al.2018. Association of Cerebral Amyloid- $\beta$  Aggregation With Cognitive Functioning in Persons Without Dementia. *JAMA Psychiatry.*;75(1):84-95.
49. Jakubowski H. 2000. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *Nutr.*;130(2S Suppl):377S-381S.
50. Josse D, Xie W, Renault F, Rochu D, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. 1999. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry.*; 38(9):2816-25.
51. Jürgens G, Xu QB, Huber LA, Böck G, Howanietz H, Wick G et al., 1989. Promotion of lymphocyte growth by high density lipoproteins (HDL). Physiological significance of the HDL binding site. *Biol Chem.*; 264(15):8549-56.
52. Keller JN, Hanni KB, Gabbita SP, Friebe V, Mattson MP, Kindy MS.1999 Oxidized lipoproteins increase reactive oxygen species formation in microglia and astrocyte cell lines. *Brain Res* ; 830(1):10-5.
53. Koch M, Hering S, Barth C, Ehren M, Enderle MD, Pfohl M. 2001. Paraoxonase 1 192 Gln/Arg gene polymorphism and cerebrovascular disease: interaction with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*; 109(3):141-5.
54. Koudinov AR, Koudinova NV. 1997. Alzheimer's soluble amyloid beta protein is secreted by HepG2 cells as an apolipoprotein. *Cell Biol Int.*;21(5):265-71.
55. Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP.1992. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89(15):6993-7.



56. Kaplan M, Aviram M. 1999. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum Paraoxonase. *Clin Chem Lab Med.* 37(8):777-87.
57. Koudinov AR, Koudinova NV, Kumar A, Beavis RC, Ghiso J. 1996. Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.*; 223(3):592-7.
58. Koudinov AR 1997. Koudinov AR1, Koudinova NV. 1997. Alzheimer's soluble amyloid beta protein is secreted by HepG2 cells as an apolipoprotein. *Cell Biol Int.*; 21(5):265-71.
59. Kuo CL, La Du BN. 1998. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos.* Jul;26(7):653-60.
60. Kuremot K, Watanabe Y, Ohmura H, Shimada K, Mokuno H, Daida H. 2003. N/R genotype of human paraoxonase (PON1) is more protective against lipoprotein oxidation and coronary artery disease in Japanese subjects.;10(2):85-92.
61. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. 1999 On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.*;119-120:379-88.
62. LaDu MJ, et al., 1998. Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *J Neurochem.*; 70(5):2070-81.
63. La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. 1993. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Curr Opin Lipidol.* 1996 r;7(2):69-76. *Chem Biol Interact* ; 87(1-3):25-34.
64. LaDu MJ, Hu J, Van Eldik LJ. 1998. Apolipoprotein E attenuates beta-amyloid-induced astrocyte activation. *J Neurochem.*;71(4):1626-34.
65. LeBlanc AC, Xue R, Gambetti P. 1996. Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J Neurochem* ; 66(6):2300-10.
66. Lui JK, Laws SM, Li QX , Villemagne VL , Ames D, Brown B, Bush AI et al., 2010. Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis.* ; 20(4):1233-42.
67. Mackness MI, Durrington PN. 1995. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.*; 115(2):243-53.
68. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. 1993. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Eur J Biochem.*;211(3):871-9.
69. McCracken E, Valeriani V, Simpson C, Jover T, McCulloch J, Dewar D. 2000. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20(11):1529-36.

70. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286(1-2):152-4.
71. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic Intervention. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004; 4(4):211-7.
72. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. 1991 Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.*;86(2-3):193-9.
73. Mendez AJ, Oram JF. 1997. Limited proteolysis of high density lipoprotein abolishes its interaction with cell-surface binding sites that promote cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta.*1346(3):285-99.
74. Methia N, André P, Hafezi-Moghadam A, Economopoulos M, Thomas KL, Wagner DD. 2001. ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. *Mol Med.*;7(12):810-5.
75. Montine TJ, Montine KS, Swift LL. 1997. Central nervous system lipoproteins in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*;151(6):1571-5.
76. Mulder M, Terwel D. 1998. Possible link between lipid metabolism and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: A role for high-density lipoproteins ? *Haemostasis.*; 28(3-4):174-94.
77. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. 2009. HDL as a biomarker, potential therapeutic target, and therapy. *Diabetes.*2009 Dec;58(12):2711-7.
78. Nemezc G, Schroeder F. 1991 Selective binding of cholesterol by recombinant fatty acid binding proteins. *J Biol Chem.* ; 266(26):17180-6.
79. Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, Michikawa M. 2011. Lipoprotein lipase is a novel amyloid beta (A $\beta$ )-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A $\beta$  in astrocytes.;286(8):6393-401.
80. Obici L, Palladini G, Giorgetti S, Bellotti V, Gregorini G, Arbustini E et al., 2004. Liver biopsy discloses a new apolipoprotein A-I hereditary amyloidosis in several unrelated Italian families. *Gastroenterology.*126(5):1416-22.
81. Oda MN. 2017. Lipid-free apoA-I structure - Origins of model diversity. *Biochim Biophys Acta.*;1862(2):221-233.
82. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerházi A, Degrell I. 2002. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*; 252(2):63-7.
83. Parthasarathy S, Fong LG, Quinn MT, Steinberg D. 1990. Oxidative modification of LDL: comparison between cell-mediated and copper-mediated modification. *Eur Heart J.* ; 11 Suppl E:83-7.

84. Parvathy S. et al., 1999. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* ; 38(30):9728-34.
85. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. 1987. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem.*;262(29):14352-60.
86. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. 1987. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.*;917(1):148-61.
87. Poirer G, Zhang Y, Huang Y, Rishi AK, Sheikh MS, Shroot B et al., 1999 Activation of the p38 and JNK/SAPK mitogen-activated protein kinase pathways during apoptosis is mediated by a novel retinoid. *Exp Cell Res.*;247(1):233-40.
88. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene Family. *Genomics.*1;33(3):498-507.
89. Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, Camacho N, Cichetti R, Villarroel V, Arata-Bellabarba G, Lanes R. 2008. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatr Diabetes.*;9(5):464-71.
90. Robert J, Button EB, Stukas S, Boyce GK, Gibbs E, Cowan CM et al., 2017. High-density lipoproteins suppress A $\beta$ -induced PBMC adhesion to human endothelial cells in bioengineered vessels and in monoculture. *Mol Neurodegener.* ;12(1):60.
91. Robert J, Button EB, Stukas S, Boyce GK, Gibbs E, Cowan CM et al., 2017. High-density lipoproteins suppress A $\beta$ -induced PBMC adhesion to human endothelial cells in bioengineered vessels and in monoculture. *Mol Neurodegener.* ;12(1):60.
92. Rottkamp CA, Raina AK, Zhu X, Gaier E, Bush AI, Atwood CS et al., 2001. Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity. *Free Radic Biol Med.*; 30(4):447-50.
93. Sattler W, Puhl H, Hayn M, Kostner GM, Esterbauer H. 1991. Determination of fatty acids in the main lipoprotein classes by capillary gas chromatography: BF<sub>3</sub>/methanol transesterification of lyophilized samples instead of Folch extraction gives higher yields. *Anal Biochem.*; 198(1):184-90.
94. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM 2011. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol.*; 94(3):296-306.v
95. Sheline YI, Morris JC, Snyder AZ, Price JL, Yan Z, D'Angelo G et al., 2010. APOE4 allele disrupts resting state fMRI connectivity in the absence of amyloid plaques or decreased CSF A $\beta$ 42. *J Neurosci.*; 30(50):17035-40.
96. Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL. 1994 Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 91(4):1470-4.
97. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S. 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.*; 394(6690):284-7.

98. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, 2000. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17527-35.
99. Simmer K. 2001. Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. *Cochrane Database Syst Rev.*; (4):CD000376.
100. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. 1996. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol.*; 157(1):360-8.
101. Squitti R, Barbati G, Rossi L, Ventriglia M, Dal Forno G, Cesaretti S et al., 2006. Excess of nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau. *Neurology.* ;67(1):76-82.
102. Stukas S, Robert J, Wellington CL. 2014. High-density lipoproteins and cerebrovascular integrity in Alzheimer's disease. *Cell Metab.*;19(4):574-91.
103. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Camper SA, La Du BN. 1995. The genetic mapping and gene structure of mouse paraoxonase/arylesterase. *Genomics.* 10;30(3):431-8.
104. Saido T, Leissring MA, 2012. Proteolytic degradation of amyloid  $\beta$ -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.*; 2(6):a006379.
105. Stukas S. et al. 2014. High-density lipoproteins and cerebrovascular integrity in Alzheimer's disease. *Cell Metab.* 2014 Apr 1;19(4):574-91.
106. Tall AR. 1990. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *Clin Invest.*; 86(2):379-84.
- Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. 2002. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.*;106(4):484-90.
107. Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. 1999. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem.*; 274(48):34499-505.
108. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P et al., 2001. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 7(7):853-7.
109. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.*;96(6):2882-91.

110. Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC et al., 2013. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement.*; 9(5):e111-94.
111. Witztum JL, Steinberg D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.*; 88(6):1785-92.
112. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. 1995. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 96(6):2758-67.
113. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. 2011. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.*;10(3):241-52.
114. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A et al. 2013. ApoE influences amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) clearance despite minimal apoE/ $A\beta$  association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;110(19):E1807-16.
115. Zlokovic BV, Sagare AP, Bell RD, 2013. Neurovascular defects and faulty amyloid- $\beta$  vascular clearance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*; 33 Suppl 1:S87-100.





