



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN
MICROBIOLOGIA MEDICA ED IMMUNOLOGIA

XXI CICLO

Possibile coinvolgimento del misfolding della componente proteica delle
LDL nell'aterogenesi

Laura Lenzi

A.A. 2008/2009

Docente Guida: Dr.ssa TIZIANA PARASASSI

Coordinatore: Prof. ENRICO GARACI

INDICE

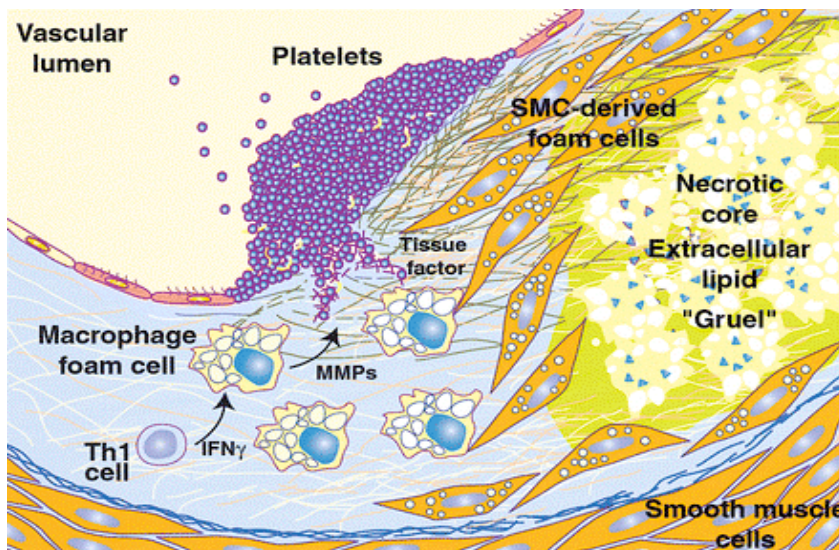
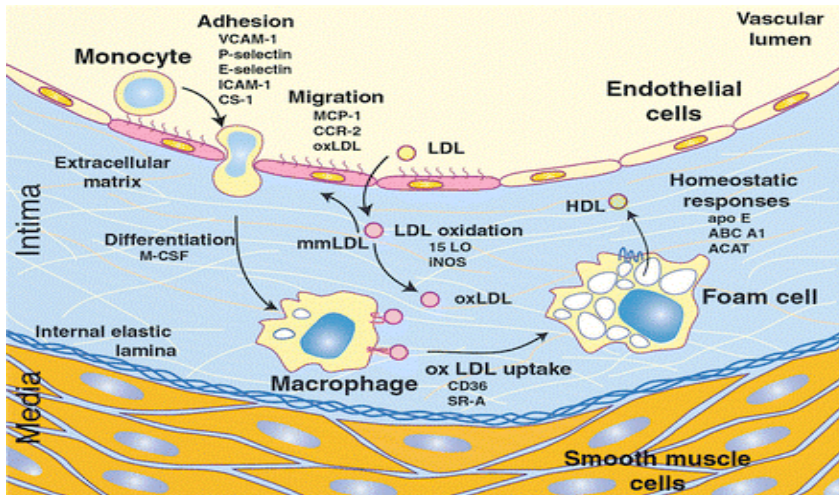
Introduzione	Pag.	1
- <i>Aterosclerosi</i>	“	1
- <i>LDL e Aterosclerosi</i>	“	7
- <i>Eterogeneità delle LDL elettronegative</i>	“	9
- <i>Attività biologica delle LDL elettronegative</i>	“	10
- <i>Misfolding delle LDL elettronegative e loro tendenza all'aggregazione</i>	“	12
Materiali e Metodi	“	13
Risultati	“	19
Discussione	“	34
Bibliografia	“	42

INTRODUZIONE

L'aterosclerosi costituisce la causa principale delle patologie cardiovascolari nel mondo occidentale ⁽¹⁻³⁾. L'aterosclerosi è ormai riconosciuta come un processo infiammatorio molto complesso in cui intervengono elementi cellulari e lipidici, che portano allo sviluppo di diverse lesioni classificate in strie lipidiche, placche fibrose e lesioni complicate. La lesione aterosclerotica primitiva è costituita dalla stria lipidica; l'evoluzione successiva passa attraverso lo stadio intermedio della placca fibrolipidica fino a giungere alla placca fibrosa matura. Quest'ultima rappresenta lo stadio più importante in quanto, essendo rilevata, è in grado di determinare una stenosi significativa limitante il flusso intravasale; inoltre può evolvere in uno stadio complicato (fissurazione, trombosi, emorragia). Gli elementi cellulari costitutivi della placca fibrosa sono cellule muscolari lisce (CML), macrofagi e linfociti T; in essa è possibile rilevare due componenti: il cappuccio fibroso, costituito da fibre collagene e CML, ed il "core" lipidico, ricco di "foam cells", macrofagi e detriti cellulari necrotici. Nello sviluppo di entrambe le componenti sembra essere coinvolto un meccanismo infiammatorio ed immunomediato che vede come principale elemento effettore il monocita macrofago ⁽⁴⁻⁶⁾.

In base alla teoria della "response to injury", l'aterogenesi rappresenta la reazione della parete arteriosa ad un danno e per tale motivo può essere considerata un processo infiammatorio. Nelle fasi precoci dell'aterogenesi, la ritenzione subendoteliale dei droplets lipidici è associata con una risposta infiammatoria all'insulto, che culmina nella formazione delle foam cells e delle placche.

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) sono i principali costituenti dei droplets subendoteliali.



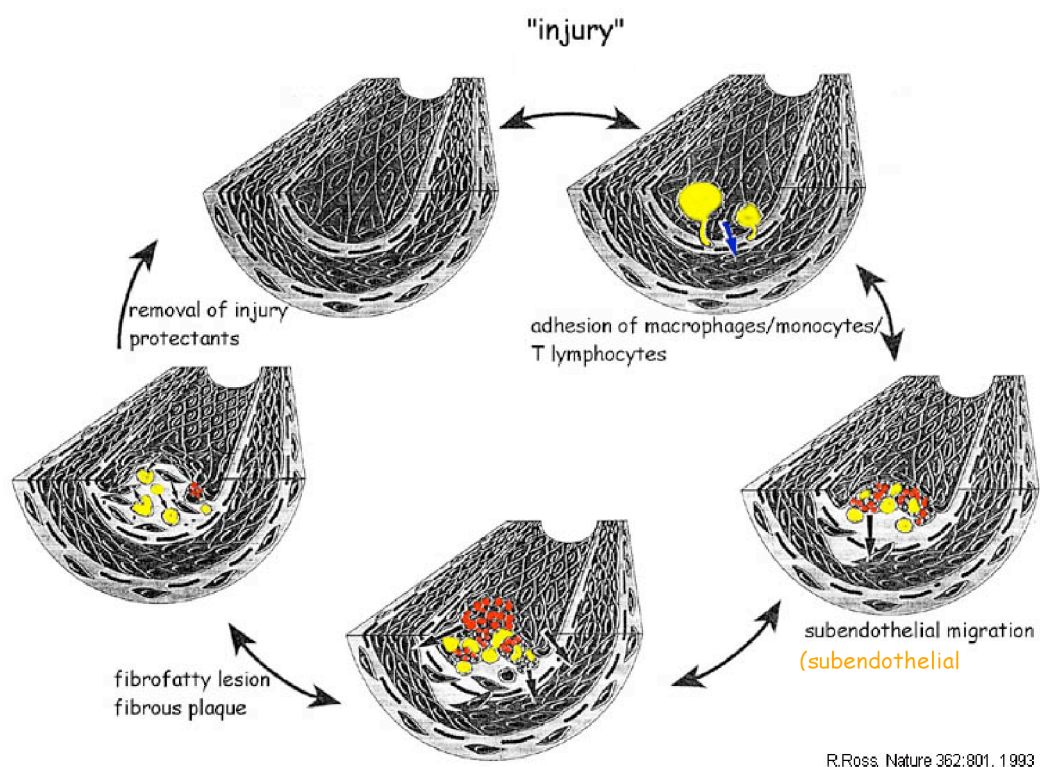


Fig. 1. Fasi iniziali dell'aterogenesi come schematizzate in un disegno tratto da R. Ross (Nature 1993, 362:801).

Il primo evento del processo aterogenetico è rappresentato dal danno endoteliale, inteso non solo come danno meccanico (denudamento dell'endotelio), ma soprattutto come "disfunzione" ed "attivazione" endoteliale (aumentata permeabilità, disregolazione dei sistemi di controllo locale con acquisizione di proprietà protrombotiche e vasocostrittrici). Gli stimoli flogogeni, in grado di innescare questa disfunzione endoteliale iniziale, possono essere numerosi: ossidativi (LDL ossidate, OxLDL, derivanti dall'ossidazione endoteliale delle LDL plasmatiche); meccanici (shear stress, ipertensione arteriosa); infettivi (virus e batteri); immunologici (autoimmunità); tossici (fumo); metabolici (iperlipidemia, diabete iperomocisteinemia). In condizioni fisiologiche

l'endotelio è dotato di proprietà antitrombotiche (eparansolfonati, ossido nitrico, prostaciclina, attivatore tissutale del plasminogeno) e vasodilatanti (ossido nitrico, prostaciclina); un endotelio disfunzionante (attivato) assume invece proprietà protrombotiche e vasocostrittrici (tissue factor, inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1, trombossano, angiotensina II, endotelina). L'endotelio attivato inoltre comincia ad esporre numerose molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), fondamentali per le numerose interazioni cellulari che daranno origine al processo aterosclerotico ⁽⁵⁻⁶⁾.

Successivamente si osserva l'espressione di molecole di adesione sulla superficie endoteliale e la successiva diapedesi trans endoteliale dei monociti.

Nell'intima i monociti vanno incontro ad attivazione trasformandosi in macrofagi. L'interazione dei macrofagi con i linfociti T e le CML ^(5,7) porta alla formazione della placca aterosclerotica. Il macrofago rappresenta l'elemento cellulare chiave nello sviluppo della placca. E' attivato da numerosi stimoli: OxLDL, IL-1 e tumor necrosis factor (TNF)- α prodotti dall'endotelio, interferone (IFN)- γ derivante dai linfociti T. Il macrofago attivato elabora tutta una serie di citochine (IL-6, IL-1, TNF- α , IL-18) in grado di amplificare e perpetuare il processo infiammatorio a livello della placca potenziando ulteriormente l'attivazione delle cellule endoteliali, dei linfociti e dei macrofagi stessi. L'IL-6 (citochina messaggera di secondo livello), agendo a livello epatico, stimola la sintesi di proteine di fase acuta, prima fra tutte la proteina C reattiva (PCR); tale proteina potrebbe quindi costituire un marker sierologico sistemico dell'attività infiammatoria locale a livello della placca aterosclerotica. Mediante l'esposizione del recettore "scavenger" alcuni macrofagi attivati incorporano le OxLDL trasformandosi in "foam cells". Infine i macrofagi sono in grado di produrre il

fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) ed il fattore di crescita per i fibroblasti (FGF), capaci di indurre la migrazione delle CML nell'intima e la loro proliferazione; inoltre rilasciano la proteina chemiotattica per i monociti di tipo 1 (MCP-1), che agisce sui monociti circolanti, incrementando in tal modo il reclutamento ⁽⁸⁻¹¹⁾.

A livello della placca aterosclerotica è rilevabile un importante infiltrato linfocitario. I linfociti raggiungono l'intima mediante interazione con le molecole di adesione esposte sulle cellule endoteliali; una volta raggiunta la placca essi svolgono un ruolo importante nel sostenere il processo infiammatorio. I linfociti riscontrati nella placca aterosclerotica si trovano in uno stato attivato. Le CML, normalmente situate nella media, migrano nell'intima sotto l'azione della proteina chemiotattica del PDGF di derivazione macrofagica (in gran parte) ed endoteliale. Questo fattore di crescita ha altri due effetti importanti: stimola le CML a proliferare e a sintetizzare le proteine della matrice extracellulare della placca aterosclerotica (collagene I e II, elastina, proteoglicani). Infatti le CML, una volta reclutate, vanno incontro ad uno "shift" da un fenotipo "contrattile" ad un fenotipo "sintetico". Pertanto le CML giocano il ruolo principale nell'aspetto fibroproliferativo del fenomeno aterosclerotico, essendo le responsabili della produzione del cappuccio fibroso. Infine le CML attivate acquisiscono anch'esse la capacità di produrre citochine (IL-1, TNF- α) contribuendo quindi al mantenimento della reazione infiammatoria all'interno della placca ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

FATTORI DI RISCHIO

L'aterosclerosi è una malattia multifattoriale ⁽¹⁵⁾ ed il vario combinarsi dei diversi fattori di rischio condiziona l'estensione e la gravità del processo arteriosclerotico, nonché le localizzazioni preferenziali.

I grandi studi epidemiologici osservazionali ⁽¹⁶⁻²⁰⁾ hanno consentito di individuare i fattori di rischio che hanno un definito ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi e che costituiscono marker prognostici di eventi clinici: sono i classici fattori di rischio come l'ipercolesterolemia, il fumo, il diabete, l'ipertensione, l'obesità. A questi fattori di rischio se ne aggiungono altri che, diversamente da essi, non sono modificabili, i più importanti dei quali sono il sesso, l'età e la familiarità per patologie cardiovascolari.

Tuttavia ed ovviamente i fattori di rischio non sono in grado da soli di spiegare la patogenesi, che rimane dunque un problema irrisolto.

Un alto contenuto di LDL nel plasma è stato ampiamente associato ad uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo della malattia cardiovascolare, e può essere ragionevolmente ritenuto responsabile dell'accumulo di lipidi nello spazio subendoteliale. Tuttavia un collegamento tra i livelli di LDL e l'aterogenesi è ancora mancante, ed è proprio questo gap che ha ispirato la ricerca di una modificazione che trasformi questo solitamente innocuo carrier del colesterolo-le LDL native-in una nuova specie in grado di innescare la risposta infiammatoria.

LDL e aterosclerosi

LDL ossidate

Allo scopo di produrre LDL tossiche per la parete arteriosa ed in grado di riprodurre gli eventi precoci della malattia cardiovascolare, *in vitro* sono state testate diverse modificazioni, la più studiata di queste è stata senza dubbio la perossidazione dei lipidi ⁽²¹⁻²²⁾. In cellule in coltura, queste drastiche modificazioni nelle LDL inducono risposte infiammatorie tossiche ed aspecifiche, e frequentemente portano anche alla formazione di aggregati che possono essere internalizzati dai macrofagi, mimando quindi la formazione iniziale delle foam cells. La maggiore limitazione alla teoria ossidativa dell'aterogenesi è rappresentata dalla difficoltà di trovare nel sangue LDL inequivocabilmente ossidate ⁽²³⁻²⁴⁾; questo ostacolo ha suggerito la ricerca di modificazioni alternative, non ossidative.

LDL elettronegative

Studi pionieristici di Avogaro e coll. ⁽²⁵⁾ hanno descritto una sottofrazione di LDL che può essere isolata mediante cromatografia a scambio anionico a causa della sua aumentata carica elettronegativa, (da cui LDL(-)). Le LDL(-) presentano un ridotto contenuto di vitamina E, un aumentato numero di sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) e dieni coniugati, aggregati apoB, e una scarsa affinità verso i recettori delle oxLDL ⁽²⁵⁻²⁷⁾. Successivamente questi autori in

collaborazione con Sevanien *et al.*, hanno dimostrato che le LDL(-) sono tossiche per le cellule endoteliali in coltura ⁽²⁸⁾, sono più dense e maggiormente suscettibili all'ossidazione rispetto alle LDL native ⁽²⁹⁾, hanno un quantitativo superiore di lipoperossidi ⁽³⁰⁾, e presentano caratteristiche comuni alle LDL desialate ⁽³¹⁾. Tuttavia questi risultati appaiono in contrasto con altri dati che smentiscono un incremento di lipidi ossidati o una riduzione di sostanze antiossidanti nelle LDL(-) ⁽³²⁻³⁴⁾.

Ad oggi queste discrepanze non sono state ancora pienamente chiarite. La lability intrinseca dei lipidi ossidati, la scarsa specificità e riproducibilità dei metodi utilizzati per misurare l'ossidazione delle LDL, e le differenze nelle metodiche per il loro isolamento, può spiegare la maggior parte di queste discrepanze. Un ulteriore motivo può essere ricercato nel contributo relativo delle oxLDL alle LDL(-) totali. Le concentrazioni di MDA-LDL o oxLDL riportate dalla maggior parte degli autori sono generalmente inferiori allo 0.1-0.5% delle LDL totali ⁽³⁵⁾; tali valori risultano considerevolmente inferiori rispetto a quelli descritti per le LDL(-) e compresi tra l'1 e il 10% in soggetti normolipidemic ^(25-34, 36-38). Quindi le oxLDL potrebbero rendere conto solo di una piccola porzione delle LDL(-) totali la cui aumentata carica negativa sarebbe da attribuire ad altre cause non ossidative. Dal momento che le MDA-LDL o le oxLDL vengono isolate utilizzando la stessa forza ionica adottata per le LDL(-) ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾, discutere se le LDL(-) contengano o meno lipidi ossidati potrebbe risultare inutile. Potrebbe semmai essere lecito chiedersi quale sia il contributo relativo dei processi ossidativi alla genesi e all'attività biologica delle LDL(-).

Eterogeneità delle LDL elettronegative

Molti studi *in vitro* hanno rivelato che l'ossidazione, l'acetilazione e la glicosilazione non enzimatica delle LDL ne incrementa la carica negativa; lo stesso avviene dopo arricchimento con acidi grassi non esterificati (NEFAs) ⁽⁴¹⁾, o modificazione enzimatica da fosfolipasi A₂ (PLA₂) ⁽⁴²⁾ o colesteril esterasi/tripsina ⁽⁴³⁾. Alcune di queste modificazioni sembrano verificarsi nel plasma durante il circolo ematico; questi eventi ed altri non ancora individuati possono contribuire a modificare le caratteristiche chimiche e biologiche delle LDL in differenti preparazioni. Un altro motivo di variabilità è la presenza di proteine associate alle LDL(-) diverse dall'apoB. E' stata descritta l'associazione delle LDL(-) con l'apoE, apoCIII ^(33,34,38), emoglobina e platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) ⁽⁴⁴⁾. La presenza di queste proteine potrebbe determinare un aumento della densità delle LDL(-), come è stato osservato in diversi gruppi di individui normolipidemic ^(29,32). In contrasto, le LDL(-) in pazienti dislipidemic rientrano in massima parte nelle sottofrazioni di LDL più superficiali (e quindi meno dense). Tuttavia sia le sottofrazioni di LDL a maggiore densità, sia quelle superficiali presentano una maggiore elettronegatività rispetto alle LDL a densità intermedia ⁽⁴⁵⁾. Queste osservazioni supportano l'ipotesi secondo cui le LDL(-) costituiscono un gruppo eterogeneo di particelle che, pur potendo avere un'origine differente, risultano accomunate da un'autentica carica negativa.

Attività biologica delle LDL elettonegative

A dispetto delle differenze nelle caratteristiche fisico-chimiche e nell'origine, le LDL(-) svolgono una varietà di effetti biologici, tra cui attività citotossica e reclutamento leucocitario, che possono svolgere un ruolo fondamentale nel processo di aterogenesi.

Citotossicità delle LDL elettronegative

Per molti anni l'unica attività biologica riconosciuta alle LDL è stata l'effetto citotossico su cellule endoteliali in coltura ^(28,32-35). Tale effetto era largamente atteso in alcuni lavori ^(28,30,46,47), riportando questi un elevato contenuto di colesterolo ossidato nelle LDL(-), che risulta altamente citotossico. Oltre alla mancanza di un accordo tra gruppi di ricerca sulla presenza di colesterolo ossidato nelle LDL(-), Demuth *et al.* ⁽³⁴⁾ hanno descritto un'attività citotossica delle LDL(-) in assenza di modificazioni ossidative; tale citotossicità viene attribuita a due meccanismi diversi: una legato all'ossidazione delle LDL(-) durante l'incubazione con le cellule endoteliali, e l'altro indipendente da processi di perossidazione.

Reclutamento leucocitario

In una serie di esperimenti condotti da Sanchez-Quesada *et al.*, LDL(-) isolate da pazienti normolipidemici ^(37,38), ipercolesterolemici e diabetici ⁽³⁸⁾, hanno dimostrato di poter indurre rilascio di interleuchina 8 (IL-8) e MCP-1 da cellule endoteliali di vena ombelicale umana in coltura. L'IL-8 e l'MCP-1 sono

chemochine coinvolte nel reclutamento, rispettivamente, di linfociti e monociti durante le fasi iniziali dell'aterosclerosi, e l'effetto sul loro rilascio di LDL(-) suggerisce fortemente un coinvolgimento di queste ultime nel processo di aterogenesi.

Ulteriori evidenze circa il ruolo delle LDL(-) nel reclutamento leucocitario sono state fornite da Yang *et al.* ⁽⁴⁸⁾. Essi hanno scoperto che la frazione di LDL maggiormente elettronegativa proveniente da pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare, ma non quella proveniente da pazienti normolipidemici, è in grado di stimolare l'adesione di cellule mononucleate a cellule endoteliali in coltura. Tale effetto può dipendere dal rilascio LDL(-) mediato da IL-8 e MCP-1 da parte delle cellule in coltura; tuttavia si può ipotizzare anche un coinvolgimento della molecola di adesione delle cellule vascolari di tipo 1. Ziouzenkova *et al.* ⁽⁴⁹⁾ hanno recentemente dimostrato che le LDL(-) incrementano l'espressione di molecole di adesione delle cellule vascolari, mediata da TNF α , attraverso l'attivazione del fattore nucleare kB (NF-kB) e della proteina di attivazione 1.

Meccanismi non ossidativi dell'infiammazione mediata da LDL elettronegative

Sebbene un singolo meccanismo dell'infiammazione mediata da LDL(-) non sia stato al momento ancora perfettamente definito, riguardando piuttosto un mosaico di eventi proinfiammatori, al contrario gli effetti in soggetti normolipidemici, diabetici o affetti da ipercolesterolemia familiare, suggeriscono un meccanismo analogo ^(37,38). Numerose evidenze indicano che lipidi polari non ossidati, come gli acidi grassi non esterificati (NEFAs) e la lisofosfatidilcolina, svolgono un ruolo nel rilascio di citochine indotto da LDL(-). Entrambi questi lipidi polari risultano

essere in numero due o tre volte maggiore nelle LDL(-) rispetto alle LDL native o totali ^(30,37-38). Sanchez-Quesada, Benitez *et al.* hanno osservato che l'arricchimento in vitro delle LDL native con NEFAs e lisofosfatidilcolina fino al raggiungimento di livelli simili a quelli delle LDL(-) è in grado di riprodurre le caratteristiche infiammatorie delle LDL(-) stesse ⁽⁵⁰⁾. Il contenuto delle LDL(-) in NEFAs e lisofosfatidilcolina è stato incrementato mediante incubazione con NEFAs o PLA₂ secretoria; entrambi i meccanismi possono sembrare determinanti in situazioni in cui si verifichi un aumento della concentrazione plasmatici di NEFAs e PLA₂ secretoria, come in caso di resistenza insulinica o negli stati infiammatori cronici ^(51,52). Studi recenti supportano questi risultati. Suriyaphol *et al.* ⁽⁵³⁾ hanno osservato che le LDL modificate enzimaticamente con colesterolo esterasi e tripsina aumentano il proprio contenuto di NEFAs ed inducono la produzione di IL-8 da parte delle cellule endoteliali. In contrasto Sonoki *et al.* ⁽⁵⁴⁾ hanno osservato che le LDL PLA₂-modificate inducono l'espressione di MCP-1 con un meccanismo dipendente dalla lisofosfatidilcolina. Quindi, l'aumento dei lipidi non ossidati nelle LDL sembra realmente indurre una risposta infiammatoria a livello endoteliale, che risulterebbe indipendente (probabilmente non del tutto) dalla lipoperossidazione.

Misfolding delle LDL elettronegative e loro tendenza all'aggregazione

La differenza maggiore tra le LDL native e le LDL(-) risulta essere il misfolding dell'apolipoproteina B-100 (apoB-100) nelle LDL(-): si osserva un notevole aumento nella struttura a beta foglietto e, conseguentemente, un significativo cambiamento nella struttura delle lipoproteine ⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾.

MATERIALI E METODI

Prelievi. Il prelievo di sangue è stato eseguito al mattino, dopo un periodo di digiuno di 8-10 ore. Previa puntura diretta di una vena antecubitale del braccio, eseguita con minima stasi, sono stati raccolti 6 cc di sangue intero e conservati a temperatura ambiente per un periodo di 60 minuti all'interno di provette contenenti come anticoagulante EDTA ad una concentrazione finale di 1mg/ml.

Isolamento delle LDL. Il plasma, isolato centrifugando a 2500 rpm per un intervallo di tempo di 10 minuti, è stato aggiustato ad una densità di 1.24 gr/ml aggiungendo 381.6 mg di KBr per ml di plasma. Le LDL sono state separate mediante centrifugazione a 100.000 rpm ad una temperatura di 15°C per un intervallo di 4 ore e 15 minuti, utilizzando un'ultracentrifuga Beckman di tipo Optima™ TLX Preparative Ultracentrifuge, equipaggiata con un rotore TLA-100.3 Fixed-Angle Rotor in titanio (gravità risultante: 540.000 x g), contenente 6 tubi da 3.5 ml (13x51 mm) per una capacità complessiva di 21 ml di plasma.

Le LDL preparate seguendo tale procedura sono state successivamente dializzate overnight contro un buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.2 EDTA 10nM a 4°C.

Le LDL sono state isolate sia da plasma fresco (LDLF), sia da plasma precedentemente incubato a 37°C (LDLI) per diversi tempi. In alcuni esperimenti le LDL sono state isolate dal siero.

Incubazione delle LDL con inibitori degli enzimi della famiglia PLA-2. Prima dell'incubazione a 37°C, al plasma o al siero sono stati aggiunti 0.1 mM del 4-

bromo fenacil bromuro ⁽⁵⁷⁻⁵⁸⁾ (Sigma-Aldrich), un inibitore della famiglia delle PLA2 secrete, o 0.1 mM di pefabloc ⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾ (Sigma-Aldrich), un inibitore della famiglia delle PLA2 calcio-dipendenti. L'uso di siero al posto del plasma è stato testato per verificare l'efficienza dell'attività chelante dell'EDTA presente nelle provette Vacutainer. Dai nostri risultati, la percentuale di EDTA presente non esercita alcun ruolo sull'attività della PLA2.

Analisi dei lipidi. I lipidi sono stati estratti dalle LDL aggiungendo 3 ml di CHCl₃:MeOH=1:2 a 0.8 ml di LDL. Dopo aver vortexato, sono stati aggiunti 0.8 ml di una soluzione 0.88% di KCl più 3 ml di CHCl₃. Successivamente i campioni sono stati nuovamente vortexati, centrifugati e il sovrantante rimosso. La fase organica è stata poi risospesa in 0.5 ml di CHCl₃:MeOH=1:1. L'analisi TLC è stata condotta su lastre TLC di gel di silice (Merck Kieselgel 60). Le classi lipidiche sono state separate in cloroformio: metanolo 30% ammonio (65:25:5 v/v). Dopo l'eluizione, i lipidi sono stati esaminati ed identificati utilizzando gli standard. Gli spot sono stati raccolti e metilati in 2 ml di cloruro di acetile al 5% (in MeOH) a 80°C per 2 ore in presenza dell'acido grasso 15:0 come standard interno. I risultanti esteri metilici di acidi grassi sono stati inseriti in un sistema GC-MS (GC-2010, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) collegato ad una colonna capillare BPX70 (MS Wil GmbH, Wil, Switzerland).

Analisi delle LDL elettronegative. La separazione delle LDL elettronegative dalle LDL totali è stata ottenuta mediante cromatografia a scambio anionico.

La cromatografia a scambio anionico permette di separare le varie molecole in base alle differenze tra le loro cariche anioniche. Gruppi carichi positivamente

legati ad una matrice di ammonio quaternario (Q) legano reversibilmente molecole di LDL di carica opposta. L'interazione è un equilibrio dinamico influenzato dalla concentrazione di sale. Il distacco del campione dalla matrice avviene per aumento della concentrazione di sale nell'eluente.

Per le corse cromatografiche ci si è avvalsi di un AKTA FPLC System (GE, Healthcare, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), equipaggiato con una colonna di tipo MonoQ 5/50 GL. Si è fatto uso di un gradiente multistep da 0 a 0.3 M di NaCl. Per il controllo delle due pompe dell'FPLC è stato impiegato il programma UNICORN.

Sono stati utilizzati due buffer: buffer A, Tris-HCl 5mM pH 7.2 e buffer B, Tris-HCl 5mM pH 7.2 NaCl 0.3M e il campione è stato introdotto attraverso un loop di 100µl ed eluito ad 1ml/min. L'eluato è stato monitorato a 280 nm e raccolto in frazioni di 1 ml. Le miscele contenenti diverse concentrazioni di nLDL e LDL(-) sono state preparate attraverso la determinazione delle proteine utilizzando il reagente di Bradford.

I processi di aggregazione e fibrillazione sono stati ottenuti semplicemente mantenendo i campioni di LDL a 37°C.

Misure di fluorescenza. I campioni di LDL (50 µg di proteina/ml) sono stati equilibrati a 37°C nella cella del fluorimetro, mentre sono stati acquisiti spettri dei campioni non marcati (bianco) da sottrarre in seguito. Le LDL sono state marcate con il Laurdan (Laurdan, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) aggiungendo 0.3 µl di una soluzione 1.3 mM del probe in DMSO, ed incubate per 15 minuti.

Gli spettri di emissione sono stati acquisiti da 430 nm a 500 nm, usando un'eccitazione di 360 nm e una larghezza di banda di 8 nm. E' stato usato un

fluorimetro GREG 200 (ISS Inc., Champaign, IL) dotato di una lampada a xenon e di elettronica di photon-counting (PX01, ISS Inc.) Dopo aver sottratto il bianco, la polarizzazione generalizzata (GP) del Laurdan è stata calcolata dagli spettri di emissione secondo l'equazione:

$$GP=(I_{440}-I_{490})/(I_{440}+I_{490}) \quad (1)$$

dove I_{440} e I_{490} sono le intensità di emissione rispettivamente a 440 nm e 490 nm ⁽⁶¹⁾. Gli spettri di emissione di fluorescenza dei residui del triptofano nell'apoproteina delle LDL sono stati acquisiti usando una concentrazione dell'apoproteina pari a 0.1 μ M.

Gli spettri di eccitazione della Tioflavina T (ThT, concentrazione finale: 1 μ M per 0.1 μ M di apoproteina LDL). Gli spettri di eccitazione sono stati acquisiti tra 300 e 450 nm, usando un'emissione a 480 ± 8 nm. Il compartimento per le cuvette è stato mantenuto alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Microscopia a forza atomica. Aliquote di campione raccolte durante l'aggregazione sono state utilizzate per acquisire immagini di microscopia a forza atomica, utilizzando un microscopio SP Magic SX (Elbitech, Marciana, Livorno, Italy). L'analisi delle immagini è stata effettuata mediante il software WSxM (Nanotec Electronica, Madrid, Spain).

Light scattering. Lo scattering della luce proveniente da campioni di LDL contenenti 1 mg/ml di proteina (corrispondente a 155mg/dl di colesterolo) è stato raccolto utilizzando uno spettrometro ALV (ALV, Langen, Germany), con un goniometro a braccio rotante CGS-5000, un tubo fotomoltiplicatore (EMI, Ruislip, UK), un correlatore multitaù ALV 5000 che lavora a un tempo di campionamento

di 200 ns, e un laser a ioni argon Innova 70 (Coherent, Santa Clara, CA, USA) che opera a 488 nm e 100 mW. Le cuvette per lo scattering erano immerse in toluene e mantenute a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. I dati sono stati raccolti simultaneamente da un volume di scattering di $\sim 100 \mu\text{m}^3$ e analizzati con un software *ad hoc*. Le acquisizioni sono state scalate logaritmicamente per angoli θ , dove θ è compreso tra 30 e 150° .

L'analisi dei dati di light scattering permette di individuare la forma principale di aggregazione delle particelle e la natura frattale della struttura interna, essendo questa determinata da misure della dimensione frattale (d_f)⁽⁶²⁾. Se gli aggregati sono più grandi della lunghezza d'onda (λ) incidente, l'intensità di scattering è correlata alla d_f attraverso:

$$I(q) \sim q^{-d_f} \quad (2)$$

Dove q è il vettore d'onda di scattering [$q = (4 \pi n / \lambda) \sin(\theta/2)$] e n è l'indice di rifrazione.

La dimensione frattale può anche essere ottenuta analizzando immagini di AFM secondo un il rapporto perimetro-area:

$$P = kA^{(d_f-1)/2} \quad (3)$$

dove A è il numero di pixels che compongono un dato aggregato, il perimetro P è il conto dei pixel al margine e k è una costante di scala.

Dicroismo circolare. Gli spettri di dicroismo circolare dei differenti campioni di LDL (concentrazione dell'apoproteina: $0.1 \mu\text{M}$) sono stati ottenuti utilizzando uno spettropolarimetro (Jasco, Tokyo, Japan) e cuvette di quarzo da 0.1 cm . La temperatura delle cuvette è stata mantenuta a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Sono stati acquisiti sei spettri per ogni misurazione e il bianco è stato sottratto.

Analisi della sequenza primaria dell'apoproteina. La propensione all'aggregazione dei singoli aminoacidi presenti nella sequenza primaria dell'apo-B100 è stata predetta basandosi sulle preferenze di accoppiamento locale utilizzando il software Pasta ⁽⁶³⁻⁶⁴⁾.

RISULTATI

Le LDL(-) come naturale “trigger” di aggregazione nelle LDL

Le LDL(-), isolate da plasma di pazienti sani, aggiunte a LDL native, non modificate (nLDL), sono in grado di avviare il processo di aggregazione in modo concentrazione-dipendente.

Al di sotto del 5% mol di LDL(-) non si registra alcuna aggregazione. Nella **Fig. 2**, riportiamo l'intensità di light scattering di campioni composti da diverse miscele di nLDL e LDL(-) in funzione del tempo a 37°C. A supporto di un fenomeno di nucleazione, la fase di latenza dell'aggregazione è dipendente dalla concentrazione di LDL(-). Dopo l'iniziale fase di latenza, l'aggregazione aumenta esponenzialmente fino a raggiungere un plateau. A questo stadio, in un campione composto dal 20% mol LDL(-) in nLDL, le immagini di AFM rivelano la presenza di “cluster” globulari (**Fig. 3A, D**). Questi intermedi globulari mostrano una distribuzione relativamente omogenea con un diametro medio di 360 ± 50 nm.

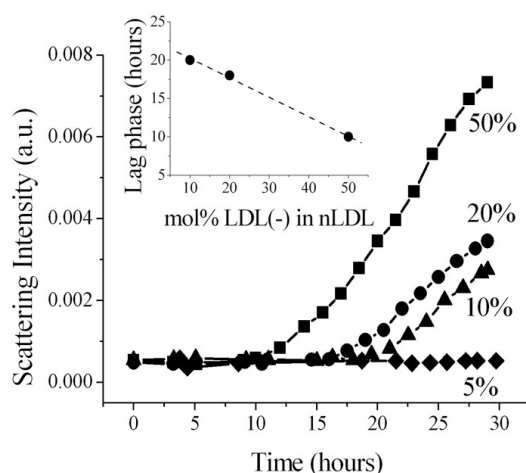


Fig. 2 Le LDL(-) inducono l'aggregazione delle LDL. Intensità di light scattering, ottenuta a $\theta = 90^\circ$, in funzione del tempo di incubazione a 37°C, in campioni composti da differenti concentrazioni di LDL(-) in nLDL (mol% di apoproteina).

La concentrazione finale di proteina LDL totale è di 1mg/ml, corrispondente a 155mg/dl di colesterolo. Insetto: lunghezza della fase di latenza vs mol% di LDL(-) nelle nLDL; la linea tratteggiata rappresenta una regressione lineare.

Aggregazione multistep delle LDL: dai globuli alle fibrille

Gli aggregati globulari evolvono con il tempo. Dopo 3 giorni i cluster globulari evolvono in strutture simili a felci che progressivamente si ispessiscono (**Fig. 3B, C, E, F**). Le immagini di AFM mostrano fibrille composte da globuli allineati linearmente mentre le fibre ispessite suggeriscono un allineamento parallelo dei filamenti (**Fig. 3F**). Gli aggregati globulari che si formano inizialmente costituiscono tutti gli stadi successivi della fibrillazione e sono ancora chiaramente identificabili nella fibra finale ispessita.

A supporto di queste modificazioni morfologiche, l'intensità di light scattering aumenta durante tutto il processo di aggregazione (**Fig. 3G**). La dinamica di aggregazione delle LDL comportano un'iniziale fase di latenza che porta al raggiungimento della soglia di nucleazione; una crescita esponenziale degli intermedi globulari; una seconda fase di latenza, necessaria all'eventuale nucleazione delle fibre; infine una fase di rapida crescita fibrillare (**Fig. 3G**).

Attraverso l'uso della ThT, considerata un probe fluorescente selettivo per le strutture amiloidi ⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾, è stata testata la natura amiloide degli aggregati finali. Durante l'aggregazione di miscele di nLDL e LDL(-) il segnale di fluorescenza della ThT aumenta, soprattutto nelle fibrille mature (**Fig. 3H**), mentre nessun aumento è registrato in assenza di LDL(-).

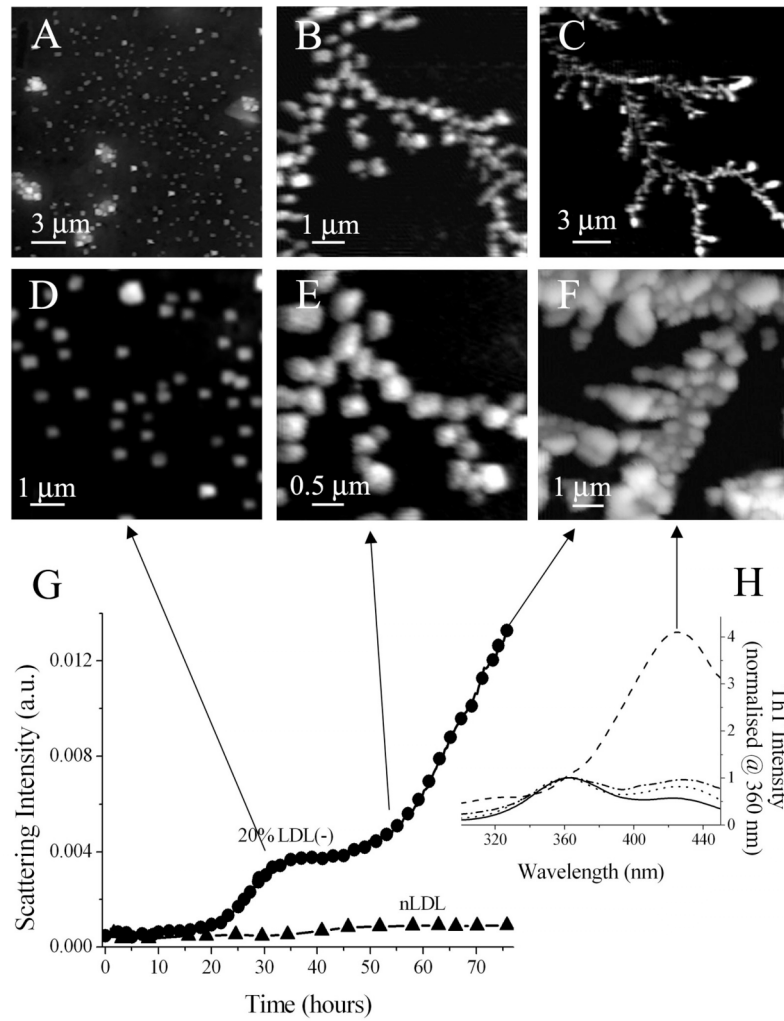


Fig. 3 Fibrillogenesi delle LDL. A-F) Immagini di AFM di un campione composto dal 20% di LDL(-) in nLDL (%mol di apoproteina) preso a diversi tempi durante l'aggregazione. Aggregati protofibrillari (A, D), fibrille (B, C, E) e fibrille ispessite (F). Le immagini D ed E sono rispettivamente dettagli ingranditi dalle immagini A e B. G) Intensità di light scattering, $\theta = 90^\circ$, come funzione del tempo di incubazione a 37°C del 20% di LDL(-) nel campione di nLDL (cerchi) e nelle nLDL isolate (triangoli). H) Spettri di eccitazione di fluorescenza della ThT (probe di fluorescente amiloide-selettivo) nelle nLDL (linea continua) e nella miscela del 20% di LDL(-) in nLDL a tempo 0 (punteggiato) a 30 ore (punteggiato-tratteggiato) e a 72 ore (tratteggiato).

Le unità iniziali di LDL mantengono la loro individualità durante l'aggregazione

Insieme alla distribuzione omogenea sopra riportata, l'analisi dei dati di light scattering rivela che gli intermedi globulari mostrano una dimensione frattale, $d_f = 2.2 \pm 0.1$ (**Fig. 4A**). La struttura frattale dei cluster globulari e la loro cinetica di aggregazione supportano l'assenza di fusione durante l'aggregazione, indicando quindi che le unità iniziali, con un diametro di 22.6 ± 0.4 nm, mantengono la loro individualità nel cluster globulare ⁽⁶²⁾.

Successivamente, l'allineamento di queste strutture globulari dà origine a fibrille, come si vede chiaramente dalle immagini di AFM. In più, la d_f delle fibrille, ottenuta usando l'Eq. 3, raggiunge i valori che si approssimano alla linearità, in particolare con il valore di $d_f = 1.2$ nelle fibrille precoci (**Fig. 4B**) e di 1.5 nelle successive fibre ispessite (**Fig 4C**).

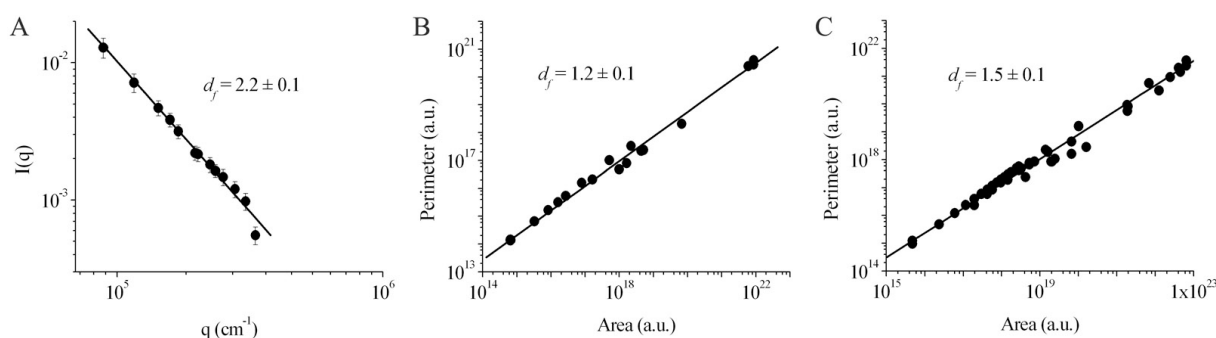


Fig. 4 Evoluzione strutturale degli aggregati. Il comportamento lineare di un diagramma log-log di $I(q)$ vs q , o di P vs A , definisce una struttura frattale. Dalla pendenza della curva, d_f può essere calcolato usando l'equazione 2 o l'equazione 3. I dati di scattering degli intermedi globulari (A) raggiungono $d_f = 2.2 \pm 0.1$, tipica di strutture in crescita secondo un'aggregazione "reaction-limited". Le immagini di AFM delle fibrille precoci (B) e tardive (C) raggiungono una $d_f = 1.2 \pm 0.1$ e $d_f = 1.5 \pm 0.1$ rispettivamente, caratteristiche di strutture simili a felci, che si ispessiscono con il tempo.

Effetto domino del misfolding delle LDL(-)

Una particolare proprietà dell'amiloidogenesi è la diffusione del misfolding dalla proteina iniziatrice a tutte le altre proteine in aggregazione ⁽⁶⁷⁾. Questa caratteristica è stata osservata anche nelle LDL. In confronto alle nLDL, le LDL(-) hanno mostrato una diminuita ellitticità dell'apoB-100, correlata al passaggio da α -elica a struttura, e una diminuzione dell'emissione di fluorescenza dei residui di triptofano, che suggerisce una esposizione all'ambiente acquoso di quei residui che altrimenti risiedono all'interno del core proteico ⁽⁵⁶⁾. Inoltre, l'apoB-100, in una miscela 1:1 di nLDL e LDL(-), mostra un'ellitticità e una fluorescenza del triptofano intermedie (**Fig. 5**). A sostegno di un effetto domino, al procedere dell'aggregazione, il misfolding iniziale si diffonde a tutte le particelle con una progressiva perdita di ellitticità e di fluorescenza del triptofano (**Fig. 5A, B**).

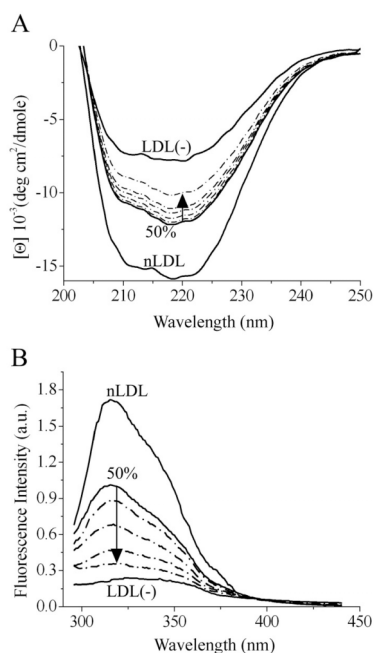


Fig. 5 Propagazione a domino durante l'aggregazione della struttura misfolded e della conformazione dell'apoproteina nelle LDL(-). A) Spettri di dicroismo circolare di nLDL, LDL(-) e di una miscela al 50%, al tempo 0 (linea continua), e durante l'aggregazione ad intervalli di 12, 28, 34, 44 e 60 ore

(punteggiato-tratteggiato). B) Spettri di emissione del triptofano (eccitazione a 295 ± 8 nm) di nLDL, LDL(-) e di una miscela al 50%, al tempo 0 (linea continua), e durante l'aggregazione ad intervalli di 12, 30, 54 e 90 ore (punteggiato-tratteggiato).

L'analisi computazionale predice l'esistenza di una regione incline all'aggregazione nell'apoB-100

In collaborazione con ricercatori dell'Università di Padova, la tendenza a cambiamenti strutturali nell'apoB-100 è stata studiata per ogni aminoacido lungo la sequenza primaria, analizzando la propensione a cambiamenti conformazionali da aggregati fibrillari ad α -elica verso aggregati a struttura β ⁽⁶³⁻⁶⁴⁾. Il profilo di aggregazione individua 3 regioni, con la centrale (residui 2191-2326) che mostra la più alta propensione (0.0110 vs. 0.0027 e 0.0015 delle altre 2 regioni ai lati; **Fig. 6**). Al contrario, la preferenza per una conformazione ad α -elica nello stato nativo è stata confermata dalla predizione della struttura secondaria ⁽⁶⁸⁾. Questa regione cade nel cluster anfipatico ad α -elica nel dominio $\alpha 2$ della apoB-100, nel range tra i residui 2075-2575 ⁽⁶⁹⁾; questa regione è stata individuata ⁽⁷⁰⁾ anche come la più capace di adattamenti a seconda di modificazioni dell'ambiente circostante).

Tutto questo suggerisce una porzione di struttura altamente incline a cambiamenti conformazionali da un arrangiamento nativo ad α -elica, attraverso un'aggregazione parallela a cross- β con altre molecole proteiche, tramite la porzione centrale del cluster anfipatico ad α -elica nel dominio $\alpha 2$.

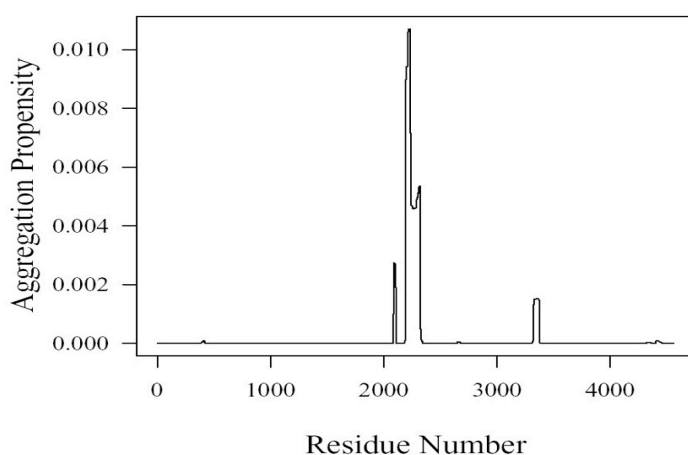


Fig. 6 Propensione all'aggregazione della sequenza primaria dell'apoB-100. La propensione di aggregazione relativa è mostrata come funzione del numero di residui.

L'aggregazione delle LDL è accelerata dall'amiloide β ed inibita da uno chaperon

Lo specifico ruolo del misfolding proteico nelle LDL(-) nel promuovere e propagare l'aggregazione, è stato ulteriormente confermato dall'osservazione che diverse proteine ricche in β -foglietti possono sostituire le LDL(-). Un'aliquota di una soluzione 6mM di amiloide β -42 è stata aggiunta a nLDL, fino a raggiungere una concentrazione finale di 5 mol % in rapporto all'apoproteina di nLDL. Questa piccola percentuale di amiloide β -42 è stata sufficiente per innescare una massiva aggregazione, con una fase di latenza ancora più corta di quella osservata nel campione composto dal 50% di nLDL e LDL(-) (**Fig. 7**). D'altra parte una proteina chaperon dovrebbe prevenire l'aggregazione. Ciò è stato dimostrato usando l' α -cristallina, una proteina appartenente alla famiglia delle "small heat shock proteins", note per un'azione di prevenzione dell'aggregazione indotta da vari stress, e che agiscono sia assistendo il "refolding", sia impedendo l'interazione tra proteine modificate⁽⁷¹⁾. Nella miscela al 50% tra nLDL e LDL(-), l' α -cristallina si è dimostrata in grado di inibire completamente l'aggregazione (**Fig. 7**).

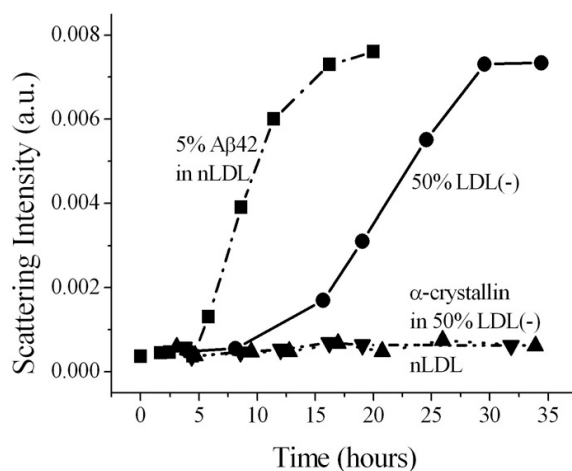


Fig. 7 L'amiloidogenesi delle LDL è innescata dall'amiloide β -42 ed inibita da uno chaperon. Intensità di light scattering ($\theta = 90^\circ$) in funzione del tempo di incubazione a 37°C di nLDL contenenti 5mol %

di amiloide β -42 ricca in strutture β (quadrati); una miscela al 50% di LDL(-) in nLDL (cerchi) contenente 0.3 mg/ml dello chaperon α -cristallina (triangoli); solo nLDL (triangoli invertiti).

Le LDL(-) sono prodotte nel plasma

Come noto, le LDL isolate da plasma fresco (LDLF) sono composte da una frazione principale, le LDL native (nLDL), e da una frazione minore, più elettronegativa, conosciuta come LDL(-), che rappresenta meno del 10% delle LDL totali (**Fig. 8A, linea continua**)⁽²⁵⁾. In una media effettuata su 30 individui sani utilizzati in questo studio, i livelli di LDL(-) sono risultati di $8.2 \pm 0.5\%$. Questa frazione aumenta drasticamente quando le LDL vengono isolate da plasma che è stato precedentemente incubato a 37°C per circa 20 ore, con una conseguente diminuzione delle nLDL (**Fig. 8B, linea tratteggiata**). Precisamente, il contenuto di nLDL diminuisce a $42.1 \pm 2.5\%$, con un corrispondente aumento delle LDL(-) a $57.9 \pm 1.6\%$. L'aumento delle LDL(-) non è influenzato dall'aggiunta di antiossidanti nel plasma, come il Trolox 0.1 mM o la vitamina C a concentrazioni comprese tra 0.1 e 0.3 mM (dati non mostrati), escludendo quindi qualsiasi coinvolgimento di un meccanismo ossidativo nella conversione di nLDL in LDL(-). Invece non si osserva formazione di LDL(-) quando il plasma viene incubato a 4°C o, come precedentemente riportato⁽⁵⁶⁾, quando le LDL purificate da plasma fresco vengono successivamente incubate a 37°C , indicando che il fenomeno di produzione di LDL(-) richiede un'attività catalitica.

L'andamento del processo (**Fig. 8B**) suggerisce una conversione diretta e quantitativa delle nLDL in LDL(-), confermata dal plot lineare della percentuale delle nLDL vs LDL(-) (**Fig. 8C**).

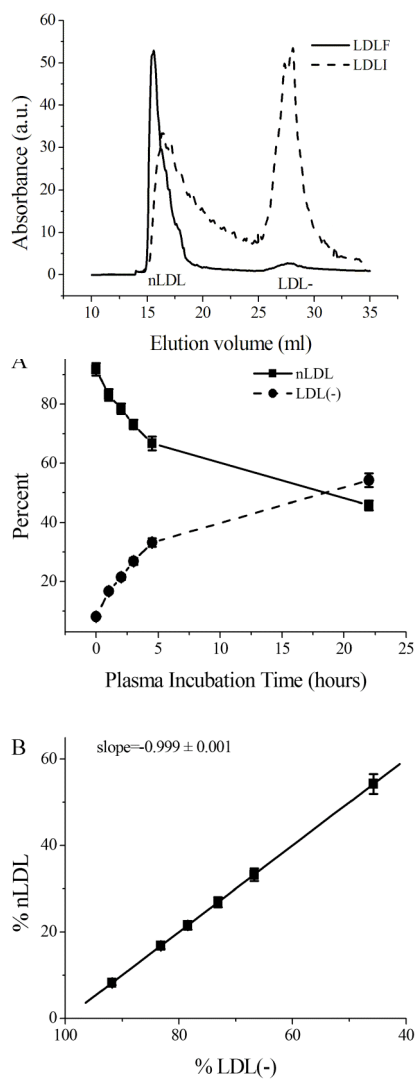


Fig. 8 Conversione delle nLDL in LDL(-) durante l'incubazione del plasma. A) Cromatogrammi esemplificativi di LDLF (linea continua) e LDLI dopo un'incubazione di 20 ore (linea tratteggiata). B) Quantità percentuale di nLDL (■, linea continua) e di LDL(-) (●, linea tratteggiata) in funzione del tempo di incubazione del plasma. Valori medi di tre letture indipendenti, con l'errore standard. C) Quantità percentuale di nLDL vs LDL(-). La linea continua rappresenta un fit lineare con pendenza = 1.

Identificazione di un'attività enzimatica che promuove la formazione di LDL(-)

Da precedenti evidenze *in vitro* ⁽⁷²⁾, l'enzima principalmente candidato come responsabile della formazione di LDL(-) sembra essere una fosfolipasi A2 presente nel plasma. Infatti le evidenze da noi ottenute mostrano che rispetto alle LDLF, il contenuto di lisofosfatidilcolina (LPC) e acidi grassi liberi (FFA), aumenta nelle LDLI (**Fig. 9A**), consistentemente con il rapporto LPC/FFA (**Fig. 9B**) calcolato attraverso l'analisi GC-MS. Nessun cambiamento di rilievo è stato osservato nella sfingomieline, negli esteri del colesterolo o nei trigliceridi (dati non mostrati).

Nel plasma sono presenti diverse PLA2: la famiglia delle PLA2 secretorie, calcio-dipendenti (sPLA2s), e le calcio-indipendenti, anche conosciute come PLA2 associate alle lipoproteine (Lp-PLA2) o platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). L'effetto che questi enzimi esercitano nella formazione delle LDL(-) nel plasma o nel siero, come riportato nella sezione dei materiali e metodi, è stato studiato utilizzando inibitori specifici. I risultati riportati in Fig. 9C, mostrano inequivocabilmente che solo l'inibitore della sPLA2s impedisce la formazione delle LDL(-) e previene la produzione di LPC e FFA (**Fig. 9A, B**). D'altra parte, il coinvolgimento della Lp-PLA2 nel processo di conversione nLDL vs LDL(-), può essere escluso data la mancanza di effetti in presenza del suo inibitore specifico.

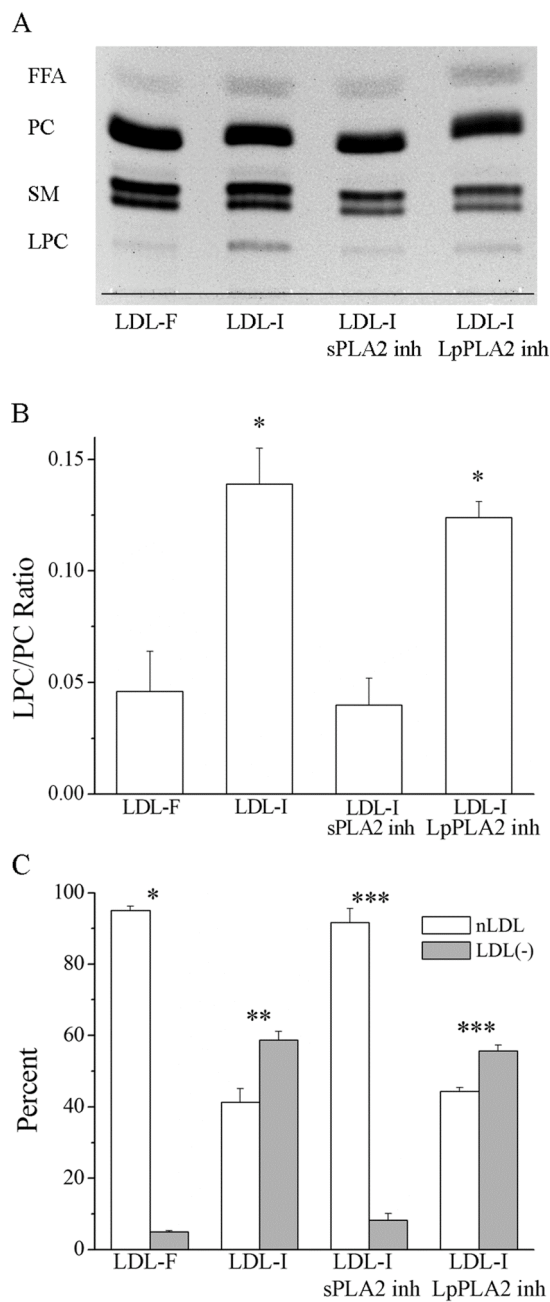


Fig. 9 Lisofosfolipidi nelle LDL e ruolo delle fosfolipasi. A) Cromatogramma di lipidi estratti da LDLF e da LDLI purificate dopo 20 ore di incubazione del plasma, anche in presenza di inibitori delle sPLA2 o Lp-PLA2. LPC: lisofosfatidilcolina; SM: sfingomielina; PC: fosfatidilcolina; FFA: acidi grassi liberi. B) Rapporto LPC/PC calcolato negli stessi campioni di A), determinato da GC-MS. La media con errore standard è stata calcolata da tre esperimenti indipendenti; * $p \leq 0.05$. C) Percentuale delle frazioni di LDL (bianco) e LDL(-) (grigio) nelle LDL totali determinate nei campioni sopra citati. Le medie di * 23; ** 31; ***: 3 esperimenti indipendenti, con errore standard.

Effetto dell'idrolisi dei fosfolipidi sulla struttura lipidica delle LDL

E' lecito attendersi che l'aumento osservato in LPC e FFA modifichi l'impacchettamento della superficie lipidica delle LDL. Per verificare e caratterizzare questa attesa modificazione abbiamo utilizzato il probe lipofilico fluorescente Laurdan, ampiamente usato come indicatore sensibile di cambiamenti nelle dinamiche lipidiche ^(61, 73). Abbiamo acquisito spettri di emissione di fluorescenza del Laurdan e calcolato il valore della Polarizzazione Generalizzata (GP) (Eq. 1) nelle LDL purificate seguendo differenti tempi di incubazione del plasma. All'aumentare dei tempi di incubazione si osserva uno spostamento dello spettro verso lunghezze d'onda maggiori (**Fig. 10A**) che risulta in una progressiva diminuzione dei valori della GP (**Fig. 10B**). Come precedentemente riportato ⁽⁶¹⁾, questa diminuzione è correlata ad un'aumentata penetrazione di acqua nella fase lipidica, favorita da un diminuito impacchettamento degli stessi lipidi – dovuto, come noto, ad un aumento della concentrazione sia di liso fosfolipidi che di acidi grassi liberi. La cinetica dell'abbassamento dei valori di GP è consistente con l'aumentato contenuto di LDL(-) (**Fig. 10B**). In accordo con la variazione nella produzione di LPC (**Fig. 9**), in presenza dell'inibitore delle sPLA2s non si osservano modificazioni significative della GP, mentre questa diminuisce ancora quando si usa l'inibitore della Lp-PLA2 (**Fig. 9C**).

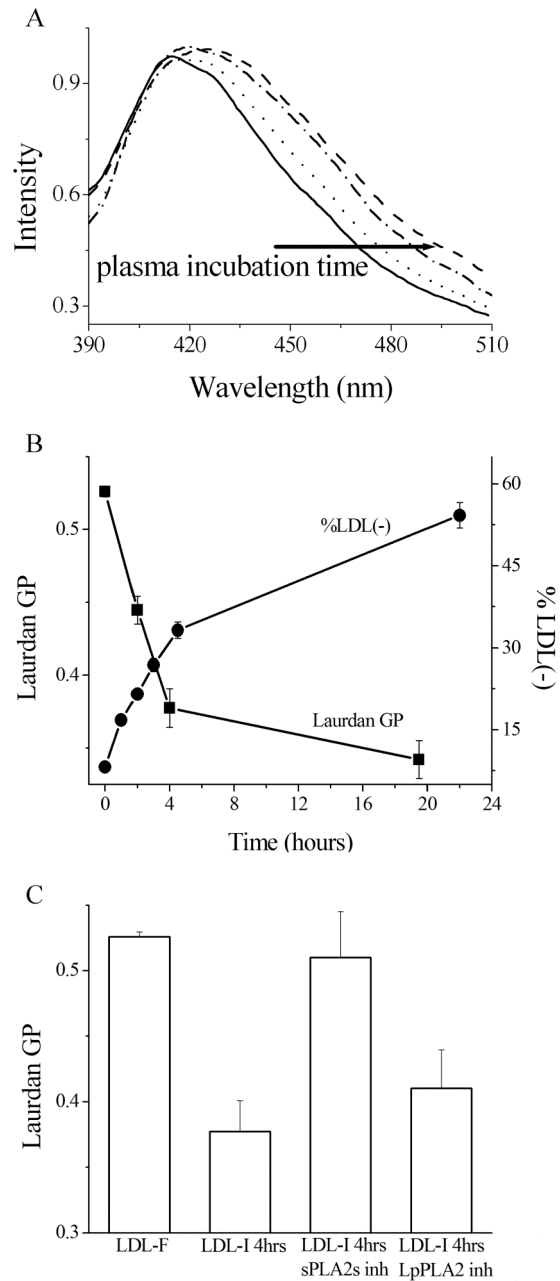


Fig. 10 Diminuzione dell'impacchettamento dei lipidi delle LDL dopo idrolisi dei fosfolipidi. A) Spettri normalizzati di emissione del Laurdan in LDL purificate da plasma a diversi tempi di incubazione: 0, 2, 4 e 20 ore. B) Media dei valori di GP dei campioni, in funzione dei tempi di incubazione, da tre esperimenti indipendenti, con errore standard (■). Per una comparazione, sono stati riportati i dati di FPLC sulla quantità percentuale di LDL(-) (●). C) Valori di GP misurati in LDLF, LDLI isolate dopo 4 ore di incubazione del plasma, e dopo un'analogica incubazione in presenza degli inibitori di sPLA2s o di Lp-PLA2. La media è calcolata su tre esperimenti indipendenti, con errore standard.

Effetto dell'incubazione del plasma nel misfolding dell'apoB-100 e nell'aggregazione

In accordo con il loro più alto contenuto in LDL(-), è stata osservata una diminuita ellitticità nelle LDLI, isolate dopo un'incubazione del plasma di circa 20 ore, rispetto all'ellitticità osservata nelle LDLF (**Fig. 11A**) ⁽⁵⁶⁾. La conseguenza della presenza di inibitori della PLA2 durante l'incubazione può essere ulteriormente verificata attraverso gli spettri di CD. L'inibizione delle sPLA2s previene la perdita di ellitticità, come risulta dalla sovrapposizione degli spettri di CD con quelli ottenuti con le LDLF. L'inibizione delle Lp-PLA2, invece, non ha effetti (**Fig. 11A**).

Come visto sopra, i risultati delle misure di light scattering mostrano che le LDLI formano aggregati, mentre ciò non avviene con le LDLF (**Fig. 11B**) ⁽⁵⁶⁾. Come abbiamo dimostrato, il trigger dell'aggregazione risiede nel misfolding dell'apoB-100 presente nelle LDL(-) ⁽⁷⁴⁾. Abbiamo quindi voluto verificare il ruolo delle sPLA2s nell'aggregazione. In accordo con la mancanza di aumento delle LDL(-) e di una modificazione strutturale nell'apoproteina, le LDLI isolate da plasma nel quale era presente l'inibitore delle sPLA2s non mostrano alcuna aggregazione. Al contrario, l'inibizione delle Lp-PLA2 non ha effetti e le LDLI aggregano in un modo simile a quello osservato in campioni nei quali non è stato aggiunto alcun inibitore (**Fig. 11B**). Questi risultati confermano inoltre che le LDL(-) prodotte dall'attività delle sPLA2s nel plasma sono a tutti gli effetti identiche alle LDL(-) isolate in piccole percentuali da plasma fresco.

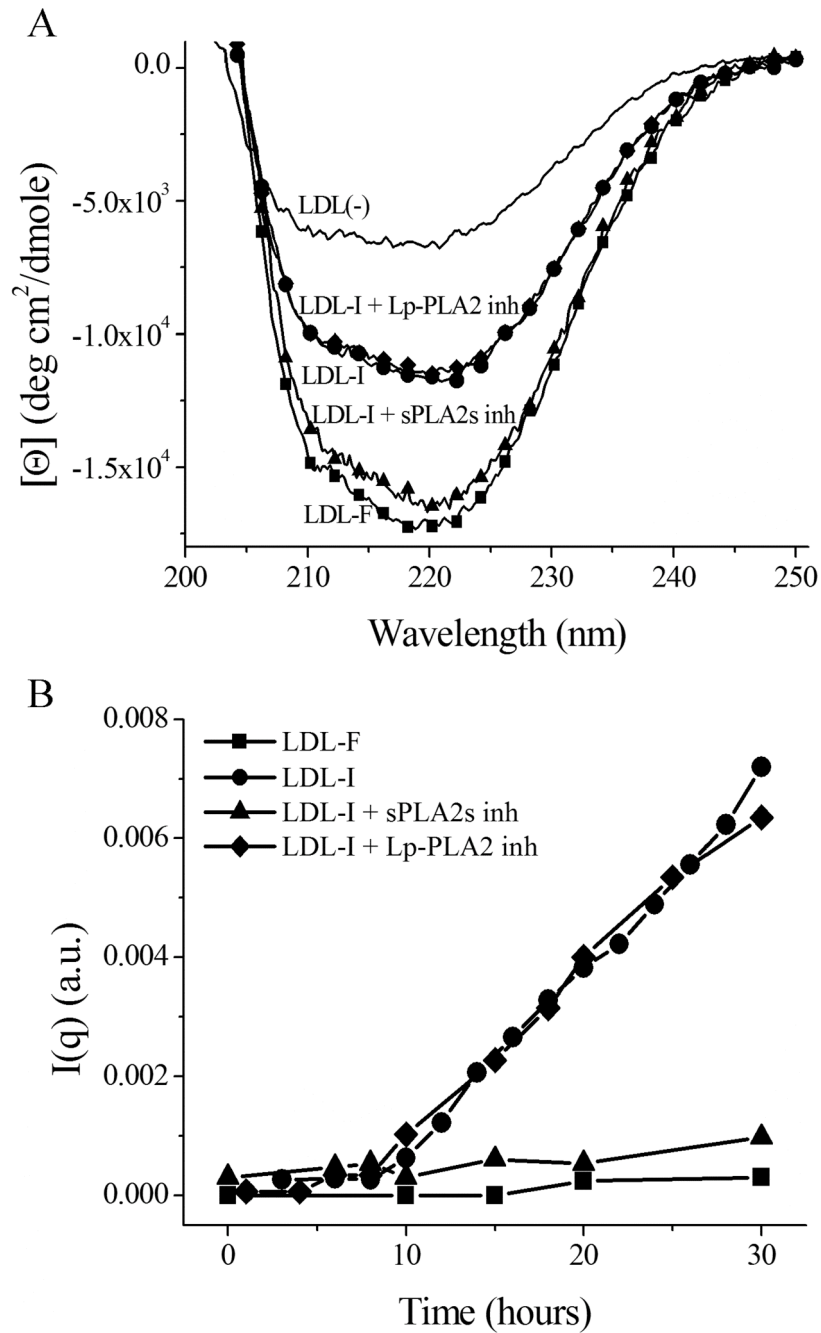


Fig. 11 Perdita di ellitticità dell'apoproteina delle LDL e loro aggregazione dopo idrolisi fosfolipidica. A) Spettri di CD e B) curve di intensità di light scattering ottenute da: LDL-F (■), LDLI isolate dopo 20 ore di incubazione del plasma (●), anche in presenza degli inibitori delle sPLA2s (▲) e delle Lp-PLA2 (◆). In (A) sono riportati gli spettri di CD delle LDL(-) (linea continua) isolate e raccolte mediante cromatografia.

DISCUSSIONE

Gli alti livelli di LDL nel plasma rappresentano uno dei maggiori fattori di rischio per la malattia cardiovascolare e sono la fonte della maggior parte del colesterolo che si accumula nella parete arteriosa. La ritenzione subendoteliale delle LDL è un processo patogenico chiave in quanto porta alla formazione dei droplets lipidici evidenti fin dalle fasi precoci dell'aterogenesi ^(5,75-77). Successivamente, la risposta biologica a questa ritenzione di materiale lipidico è costituita da una reazione infiammatoria. Rimane da stabilire un collegamento tra i livelli di LDL nel plasma e l'accumulo di materiale lipidico subendoteliale, cioè rimane da determinare una modificazione delle LDL tale da trasformare questo carrier del colesterolo in un pericoloso agente in grado di attivare la risposta cellulare infiammatoria. In questo studio abbiamo evidenziato che in presenza di LDL(-), la sottoclasse elettronegativa dove l'apoproteina è misfolded, le LDL vanno incontro ad una aggregazione amiloidogena. I prodotti precoci di questa aggregazione, gli intermedi globulari, sono estremamente simili ai droplets subendoteliali. I nostri risultati inoltre suggeriscono che il misfolding dell'apoproteina sia una modificazione delle LDL necessaria per innescare i meccanismi patogenici attraverso la formazione di aggregati. In comune con diverse altre proteine o peptidi generalmente più piccoli e nonostante una massiccia presenza di lipidi in stretta interazione con l'apoproteina, le LDL vanno incontro ad aggregazione in assoluto accordo con tutti i paradigmi dell'amilodogenesi ^(67, 78-80), e cioè: 1) un'iniziale modificazione strutturale, principalmente un aumento di struttura β vs una diminuzione dell' α -elica, rende la proteina incline all'aggregazione attraverso un'interazione β - β ; 2) nonostante siano composte da diverse proteine, i depositi di amiloide mostrano delle dinamiche di

formazione simili, dove una fase di latenza è seguita da un periodo di rapida crescita, un comportamento tipico dei processi di nucleazione, così come la cristallizzazione; 3) un'augmentata concentrazione di proteina misfolded o di aggregati preformati abbrevia la fase di latenza; 4) quando la soglia di nucleazione viene raggiunta, l'amiloidogenesi procede spontaneamente attraverso la formazione di strutture intermedie che in seguito evolvono in strutture amiloide-simili; 5) durante questo processo, il misfolding si diffonde a tutte le proteine in aggregazione; 6) infine, proteine chaperon possono effettivamente inibire l'aggregazione, sia assistendo il refolding, sia impedendo l'interazione tra proteine misfolded.

A differenza di altri studi sull'aggregazione delle proteine, e specificatamente sull'aggregazione delle LDL, nessuna manipolazione fisica, chimica o biochimica, è stata necessaria per indurre la formazione di aggregati. Infatti, il trigger iniziale è rappresentato dalle LDL(-), fisiologicamente presenti nel plasma a differenti concentrazioni. In soggetti sani la concentrazione di LDL(-) è al di sotto del 10%, mentre concentrazioni più alte correlano positivamente con altri marker di rischio di malattia cardiovascolare ^(34, 81-84).

Preliminarmente ⁽⁶²⁾, abbiamo caratterizzato l'aggregazione usando LDL purificate dal plasma che era stato precedentemente incubato overnight a 37°C. Il metodo sviluppato per analizzare gli aggregati è stato quindi usato per la caratterizzazione degli intermedi globulari, ed i risultati sono estremamente consistenti. Sia nell'aggregazione iniziata da LDL(-), sia in quella che avviene utilizzando LDL isolate da plasma incubato, gli intermedi globulari si formano dopo un'interazione reaction-limited ⁽⁸⁵⁾. In questo meccanismo, non tutte le interazioni producono aggregati poiché la probabilità di adesione tra le unità elementari è <1; le collisioni risultano favorevoli quando coinvolgono siti "adesivi" (es. un riconoscimento tra siti

specifici sulla superficie della particella). Le predizioni di un meccanismo di aggregazione “reaction-limited” correlano con una dimensione frattale degli aggregati che indica chiaramente che le particelle elementari di LDL, di ~ 22nm di dimensione, mantengono la loro individualità all'interno dell'aggregato, con una totale assenza di fusione. Questo risultato è importante in quanto indica che i nostri aggregati di LDL non implicano processi ossidativi, i quali ultimi portano infatti alla fusione di particelle, oltre ad una loro dimensione finale decisamente inferiore, con un diametro finale di 34 ± 0.2 nm, senza evolvere in aggregati più larghi.

Abbiamo anche rilevato una diminuita ellitticità nelle LDL purificate da plasma incubato ⁽⁶²⁾, che suggerisce nuovamente un'aggregazione guidata dal misfolding. Possiamo quindi affermare che le LDL(-) misfolded sono prodotte nel plasma dopo un'incubazione di diverse ore a 37°C, mimando quindi il rimodellamento che avviene nelle LDL durante la loro vita intravascolare.

Durante l'evoluzione dell'aggregazione a formare fibrille, gli intermedi globulari sono mantenuti e si assemblano linearmente prendendo le sembianze di una collana di perle. Inoltre, gli intermedi precoci sono ancora evidenti come unità elementari delle successive fibre ispessite che si formano per l'associazione laterale delle fibrille precoci. Nel complesso si può dire che l'aggregazione delle LDL iniziata dalle LDL(-) non appare assolutamente essere un processo casuale. L'interessante possibilità di aggiungere l'aterosclerosi alla lista delle malattie amiloidogeniche è rafforzata anche dalla scoperta che gli aggregati globulari qui descritti, sono notevolmente simili ai droplets trovati nelle placche ateromatose, il cui diametro medio va dai 100 ai 400 nm. Gli aggregati prodotti in vitro da proteolisi, lipolisi od ossidazione hanno un diametro inferiore di due volte rispetto a quello delle LDL native ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾, suggerendo quindi un processo di fusione, piuttosto che di aggregazione ⁽⁶²⁾. Il meccanismo di

aggregazione “reaction-limited”, così come la propagazione del misfolding a tutte le LDL, ben si adatta alla scoperta che lungo la sequenza dell’apoB-100 esistono 3 siti inclini ad un cambiamento da α -elica a struttura β . Di questi, il sito centrale appare particolarmente rilevante sia per la sua estrema propensione al misfolding, sia per la sua collocazione nel dominio $\alpha 2$. Infatti questo dominio è stato precedentemente proposto come una struttura flessibile, capace di regolare la dimensione delle particelle di LDL, e coinvolto nella modulazione della forma e densità dell’intera particella ^(69, 88), attraverso cambiamenti conformazionali in risposta ad un differente contenuto lipidico. Tutto suggerisce un possibile sito per la nucleazione nella apoB-100.

Le lipoproteine modificate trattenute nel subendotelio in forma di droplets, sono riconosciute come lo stimolo iniziale per l’attivazione dell’endotelio e il recruitment di macrofagi, di cellule T e di mastociti, così come della successiva migrazione delle cellule muscolari lisce ^(5,75-77). Nel plasma umano è stato riportato che concentrazioni di LDL(-) superiori al 10% correlano positivamente con altri marker di rischio della malattia cardiovascolare ^(34, 81-84). In questo contesto, la possibilità di occorrenza dell’aggregazione *in vivo* delle LDL dipende da altri e diversi fattori che promuovono o inibiscono l’aggregazione e che promuovono o inibiscono la clearance. Infine, in analogia con l’osservazione relativa ad altre amiloidosi, per le quali gli aggregati prefibrillari sono riconosciuti come i più dannosi, gli aggregati globulari di LDL potrebbero emergere come gli attuali agonisti, iniziatori della risposta alla ritenzione infiammatoria caratteristica dell’aterogenesi precoce.

A circa 30 anni dalla scoperta delle LDL elettronegative ⁽²⁵⁾ e successivamente della loro associazione con diversi marker di rischio della malattia cardiovascolare ^(41,81,83-84), nella nostra ricerca del meccanismo responsabile della generazione *in vivo* delle

LDL(-) abbiamo ottenuto l'evidenza di una conversione lipolitica spontanea delle nLDL in LDL(-) nel plasma. Abbiamo dimostrato questo processo semplicemente incubando il plasma a 37°C, il che risulta nella generazione di LDL(-) che hanno tutte le caratteristiche di proteine modificate, prone all'aggregazione, in accordo con le caratteristiche precedentemente descritte per le LDL(-) isolate da plasma fresco^(56,62,74). Nelle nostre condizioni *ex vivo*, questa immediata e massiva produzione di LDL è un processo equilibrio fuori dall'equilibrio, cioè in assenza di meccanismi di rimozione. La nostra procedura esclude anche la possibilità che le LDL(-) vadano incontro a modificazioni lipolitiche nella parete arteriosa, sia intra che extracellulare, e successivamente ritornino al compartimento plasmatico, problema che precedenti ricerche avevano lasciato aperto.

La notizia che *in vitro* la PLA2 del veleno di cobra promuove efficacemente la formazione di LDL(-) da nLDL⁽⁷²⁾ ci ha spinto alla ricerca di un meccanismo simile *in vivo*. Il nostro modello di incubazione del plasma non processato mostra inequivocabilmente che l'idrolisi della PC nelle LDL può avvenire nel plasma ed è accompagnata dalla formazione di LDL(-). Il fatto che questo processo sia dipendente dalla temperatura rappresenta un'argomentazione a favore di una reazione enzimatica: nessun aumento nelle LDL(-) è stato evidenziato con l'incubazione del plasma a 4°C. Tra gli enzimi lipolitici coinvolti nel "remodeling" intravascolare delle LDL, particolare attenzione è stata recentemente attribuita ad alcune delle 10 componenti della famiglia delle PLA2 secretorie (sPLA2s), calcio-dipendenti, ed a quella calcio-indipendente, la PLA2 associata alle lipoproteine (Lp-PLA2 o PAF-AH)⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾. Le LDL trattate *in vitro* con questi enzimi non sono state caratterizzate strutturalmente in passato, ma hanno mostrato di essere in grado di indurre una risposta cellulare che mima le fasi precoci dell'aterogenesi e che aumenta il legame delle lipoproteine con i

proteoglicani. I prodotti della loro attività sono lipidi proinfiammatori, così come i lisofosfolipidi e gli acidi grassi liberi. Osservazioni cliniche supportano fortemente anche un'associazione tra alti livelli di sPLA2s circolanti e un aumentato rischio di malattia cardiovascolare ^(89, 92-93), evidenziando così due possibili siti dove questi enzimi agiscono: il subendotelio, o alternativamente le lipoproteine circolanti.

Senza escludere altri possibili meccanismi per la modificazione delle LDL che avviene nel subendotelio, i nostri dati dimostrano che, nel plasma, l'attività fosfolipasica sulle LDL circolanti risulta in un'aumentata concentrazione dei lisofosfolipidi. Il chiaro effetto dell'inibitore dell'sPLA2s supporta fortemente il coinvolgimento di uno o più membri di questa famiglia di enzimi. Invece, la Lp-PLA2 è apparentemente esclusa, data la mancanza di effetti in presenza del suo inibitore specifico.

La misura del valore di GP del Laurdan è uno strumento utile per rilevare i cambiamenti indotti sui lipidi delle LDL da un aumentato contenuto di LPC. Le LPC possiedono una struttura simile a quella della maggior parte dei detergenti ed inducono una diminuzione dell'impacchettamento dei lipidi di superficie delle LDL. I valori della GP del Laurdan mostrano una significativa diminuzione, da 0.53 a 0.34. Sebbene questa evidenza non possa essere traslata in una valutazione quantitativa del cambiamento nella composizione dei lipidi, essa serve a fornire un'idea dell'effetto strutturale se comparato con quello osservato in membrane contenenti colesterolo: nelle vescicole fosfolipidiche contenenti il 30% di colesterolo (una concentrazione vicina a quella presente nelle membrane cellulari plasmatiche) una simile diminuzione della GP si osserva per un aumento della temperatura di più di 15 °C ⁽⁶¹⁾. La caratteristica delle LDL(-) consiste principalmente nel misfolding dell'apoB-100, con una conversione dalla struttura α a quella β . Dato che l'apoB-100 è una proteina

multifunzionale che interagisce fortemente con i lipidi, e possiede molte regioni funzionali in grado di rispondere a modificazioni chiave in domini specifici ⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾, non è sorprendente che la diminuzione dell'impacchettamento dei lipidi sia in grado di interessare la conformazione dell'apoB-100.

Una questione interessante concerne la relazione tra l'idrolisi dei fosfolipidi e il misfolding proteico. Seguendo un modello consensuale per la struttura delle LDL ⁽⁶⁹⁾, l'apoB-100 è localizzata sulla superficie esterna insieme alle teste polari dei fosfolipidi, ma allo stesso tempo penetra attraverso l'interfaccia, all'interno fino al core di colesterolo. In questa situazione, modificazioni conformazionali della proteina influenzano la struttura del core e viceversa ⁽⁸⁸⁾. Ulteriormente degno di nota è che utilizzando PLA2 da veleno di ape è stata alterata l'immunoreattività di un sito proteico sull'apoB-100 ⁽⁴²⁾. Un ulteriore esempio di questa azione reciproca tra struttura proteica e lipidica è fornita dalle nostre precedenti osservazioni che il legame alla proteina di una singola molecola di estradiolo per particella di LDL è in grado di intervenire sulla struttura sia della regione di interfaccia proteina-lipidi sia del core ⁽⁹⁷⁾. Possiamo inoltre concludere che l'idrolisi dei fosfolipidi con la conseguente diminuzione del loro impacchettamento, da una parte, e il misfolding dell'apoproteina dall'altra, rappresentano un ulteriore e chiaro esempio della stretta interazione strutturale lipidi-proteine.

Le LDL(-) prodotte in modo massivo nel plasma incubato sono a tutti gli effetti identiche a quelle presenti in piccola percentuale nel plasma fresco, compreso il carattere amiloidogenico della sua proteina. La possibilità che l'aggregazione possa essere innescata direttamente dalla LPC piuttosto che dal misfolding dell'apoB-100 è poco probabile. Sebbene l' LPC possieda caratteristiche simili a quelle dei detergenti e possa quindi promuovere la fusione, gli aggregati di LDL non contengono LDL

fuse. Abbiamo precedentemente dimostrato, nei cluster di LDL, la presenza di particelle delle dimensioni delle LDL. L'analisi frattale e la determinazione di un meccanismo di interazione "reaction-limited" suggeriscono che pochi e specifici siti proteici siano in grado di guidare l'aggregazione ⁽⁶²⁾.

Sebbene è possibile che oltre all'azione delle fosfolipasi secretorie ci siano altri meccanismi capaci di modificare la struttura lipidica e proteica delle LDL, il quadro che emerge dalle osservazioni presenti coinvolge un processo lipolitico che avviene nel plasma, in grado di destabilizzare la struttura lipidica delle LDL. Simultaneamente procede il misfolding dell'apoB-100, che rende le LDL prone all'aggregazione mediante un processo amiloidogenico.

Rimangono aperte altre interessanti questioni, riguardanti la regolazione della concentrazione delle sPLA2s e/o della regolazione della loro attività *in vivo*, insieme alla determinazione dei processi metabolici in grado di rimuovere le LDL(-) che si formano in modo apparentemente continuo. Rispondere a queste domande potrebbe chiarire definitivamente il ruolo delle LDL(-) nella malattia vascolare ed aprire la strada a possibili interventi farmaceutici per regolare la loro concentrazione nel plasma.

BIBLIOGRAFIA

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
2. Ross R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131 Suppl:S3-4.
3. Teplitz L, Siwik DA. Cellular signals in atherosclerosis. *J Cardiovasc Nurs* 1994; 8(3): 28-52.
4. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57:791-804.
5. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 342: 115-26.
6. Stary HC, Chlander AB, Glagov S et al. A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 840-56.
7. Jonasson L, Holm J, Sicalli O et al. Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 1986; 6: 131-8.
8. Raines EW, Rosenfeld ME, ross R. The role of macrophages. In: Poster V, Ross R, Topol J editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. I, Philadelphia: Lippincott Raven, 1996: 539-55.
9. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its patobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963-6.
10. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signalling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res* 2001; 89: E41-5.
11. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: 2844-50.
12. Stemme S, Jonasson L, Holm J Hansson GK. Immunologia control of vascular cell growth in arterial response to injury and atherosclerosis. *Transplant Proc* 1989, 21: 3497-9.
13. Reidy MA. Neointimal proliferation: The role of basis PGP on vascular smooth cell proliferation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 172-6.
14. Reidy MA. Growth factors and arterial smooth muscle cell proliferation. *Ann NY Acad Sci* 1994; 12: 225-30.
15. Glass K, Witztum J. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-16.
16. Stamler J, wentworth D, Necton ID. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823-8.
17. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-8.
18. Cullen P, sculte H, Assmann G. The Munster Heart Study (PROCAM): total mortalità in middle-aged men s increased at low total and LDL cholesterol concentrations in smokers but not in nonsmokers. *Circulation* 1997; 96: 2128-36.

19. Howard g, Wagenknecht LE, Burke GL et al. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *JAMA* 1998; 279: 119-24.
20. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-47.
21. Oorni K, Pentikainen M, Ala-Korpela T. P, et al. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanism and effects on matrix interactions . *J lipid Res* 2000; 41: 1703-14.
22. Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:123-39.
23. Chisolm G. M, Steinberg D.. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis. *An overview. Free Radic. Biol. Med* 2000; 28: 1815-26.
24. Steinberg D, Witztum J. L. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002; 105: 2107-11.
25. Avogaro P, Bittolo-Bon G, cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 79-87.
26. Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. Characterization of a more electronegatively-charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Rad Biol Med* 1991; 11: 247-53.
27. Avogaro P, Bittolo-Bon G. Cazzolato G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis* 1991; 91: 163-71.
28. Hodis Hn, Kramsh DN, Avogaro P et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (electronegative LDL). *J Lipid Res* 1994; 35: 669-77.
29. Sevanian A, Hwang J, Hodis H et al. Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its associations with dense LDL subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 784-93.
30. Sevanian A, Bittolo-Bon G, Cazzolato G et al. Electronegative LDL is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res* 1997; 38: 419-28.
31. Tertovv VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA et al. Naturally occurring modified low density lipoprotein are similar f not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp mol Pathos* 1995; 62:166-72.
32. Shimano H, Yamada N, Ishibashi S et al. Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion exchange chromatography. *J Lipid Res* 1991; 32: 763-73.
33. Chappey B, Myara I, Benoit MO et al. Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low density lipoprotein (LDL): no evidence of peroxidative modifications. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259: 261-70.
34. Demuth K, Myara I, Chappey B et al. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 773-83.
35. Nishi K, Itabe H, Uno M et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with claque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1649-54.

36. Nyyssonen k, Kaikkonen J, Salonen JT. Characterization and determinants of an electronegatively-charged low density lipoprotein in human plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 681-89.
37. De Castellarnau C, Sanchez-Quesada JL, Benitez S et al. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2281-87.
38. Sanchez-Quesada JL, Camacho M, Anton R et al. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003; 166:261-70.
39. Holvoet P, Perez G, Zhao Z et al. Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerosis disease. *J Clin Invest* 1995; 95:2611-19.
40. Greilberger J, Wang X, Ledinski G et al. Presence of aldehydic epitopes on a minor low density lipoprotein fraction. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 1489-94.
41. Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Lucero L et al. Changes in low density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercises are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 2002; 160: 223-32.
42. Kleinman Y, Krul E.S, Burnus M et al. Lipolysis of LDL with phospholipase A₂ alters the expression of selected apoB100 epitopes and the interaction of LDL with cells. *J Lip Res* 1988; 29: 729-43.
43. Klouche M, Dorweiler M, Kirchmann R et al. On the pathogenesis of the atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med* 1995; 182: 1959-71.
44. Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Ribas V et al. Platelet activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative LDL subfraction. *Circulation* 2003; 108:92-6.
45. La Belle M, Blanche PJ, Krauss RM. Charge properties of low density lipoprotein subclasses. *J Lipid Res* 1997; 38: 690-700.
46. Sevanian A, Hodis HN, Hwang J et al. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res* 1995; 36: 1971-36.
47. Chang YH, Abdalla DSP, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 202-14.
48. Yang CY, Raja JL, Chen HH et al. Isolation, characterization and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23: 1083-90.
49. Ziouzenkova O, Asatryan L, Sahady D et al. Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2003; 278: 39874-81.
50. Sanchez-Quesada JL, Benitez S, Ordines.Llanos J. Electronegative low density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004;15: 329-35.
51. Lam TK, Carpentier A, Lewis GF et al. Mechanisms of the free fatty-acid induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E863-73.
52. Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H et al. Phospholipase A₂ in vascular disease. *Circ Res* 2001; 89: 298-304.

53. Suriyaphol P, Fenske D, Zahringer U et al. Enzymatically modified non oxidized low density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids. *Circulation* 2002; 106: 2581-87.
54. Sonoki K, Iwase M, Iino K et al. atherogenic role of phosphatidylcholine in low density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor. *Metabolism* 2003; 52:308-14.
55. Ursini F, Davies KJ, Maiorino M, Parasassi T, Sevanian A. Atherosclerosis: another protein misfolding disease? *Trends Mol Med* 2002; 8: 370-4.
56. Parasassi T, Bittolo-Bon G, Brunelli R, et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 82-89.
57. Qu X. W., Liu W. P., Qi Z. Y. et al. Phospholipase A2-like activity of human bocavirus VP1 unique region. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2008; 365: 158-63.
58. Tariq M., Elfaki I., Khan H. A., M. et al. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5798-5804.
59. Dentan, C., Tselepis A. D., Chapman M. J., et al. Pefabloc, 4-[2-aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 353-57.
60. Chen, J., Yang L., Foulks J. M., et al. Intracellular PAF catabolism by PAF acetylhydrolase counteracts continual PAF synthesis. *J Lipid Res* 2007; 48: 2365-76.
61. Parasassi, T., Di Stefano M., Loiero M., et al. Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 1994; 66: 120-32.
62. De Spirito M, Brunelli R, Mei G et al. Low density lipoprotein aged in plasma forms clusters resembling subendothelial droplets: aggregation via surface sites. *Biophys J* 2006; 90: 4239-4247.
63. Trovato A, Chiti F, Maritan A et al. Insight into the structure of amyloid fibrils from the analysis of globular proteins. *PLoS. Comput Biol* 2006; 2: 1608-1618.
64. Trovato A, Seno F, Tosatto S.C.E. The Pasta server for protein aggregation prediction. *Protein Eng. Des. Sel.* 2007; 20: 521-523.
65. Levine H. Quantitation of β sheet amyloid fibrils structures with Thioflavin T. *Methods Enzymol* 1999; G309; 274-84.
66. Bader R, Bamford R, Zurdo J et al. Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation. *J Mol Biol* 2006; 356: 189-208.
67. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature* 2003; 426: 884-90.
68. Albrecht M, Tosatto S.C.E., Lengauer T et al. Simple consensus procedures are effective and sufficient in secondary structure prediction. *Protein Eng* 2003; 16: 459-62.
69. Segrest J.P, Jones M.K, De Loof H, et al. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoprotein. *J Lipid Res* 2001; 42:1346-67.
70. Vullo A, Bortolami O, Pollastri G, et al. Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: W164-168.

71. Sun Y, MacRae T. H. The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J* 2005; 272: 2613-27.
72. Asatryan L, Hamilton R. T, Isas J. M, et al. LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein. *J Lipid Res* 2005; 46: 115-122.
73. Carrer D. C, Vermehren C, Bagatolli L. A. Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: A two photon microscopy study. *J Control Release* 2008; 132: 12-20.
74. Parasassi T, De Spirito M, Mei G, Brunelli R, Greco G, Lenzi L. et al. Low density lipoprotein misfolding and amyloidogenesis. *FASEB J.* 2008; 22: 2350-56.
75. Skalen K, Gustaffson M, Ridberg E. K, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; 417: 750-4.
76. Williams K. J, Tabas I. Lipoprotein retention and clues for atheroma regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1536-40.
77. Nievelstein P.F, Fogelman A. M, Mottino G, et al. Lipidic accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1795-1805.
78. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 333 -66.
79. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding disease and biological evolution. *J Mol Med* 2003; 81: 678-99.
80. Lee CC, Nayak A, Sethuraman A et al. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys J* 2007; 92: 3448-58.
81. Sanchez-Quesad J. L, Otal-Entraigas C, Franco M, et al. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low density lipoprotein present in patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1999; 84:655-59.
82. Sanchez-Quesad J. L, Benitez S, Otal C, et al. Density distribution of electronegative LDL (LDL(-)) in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002; 43: 699-705.
83. Sanchez-Quesad J. L, Perez A, Caixas A, et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short duration IDDM and is closely related to glycaemic control. *Diabetologia* 1996; 39: 1469-76.
84. Ursini F, Sevanian A. Postprandial oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 599-605.
85. Weitz D. A, Lin M. Y, Huang J. S. Fractal and scaling in kinetic colloid aggregation. In *Physics of complex and Supramolecular Fluids* (Safran S. A, and Dark N. A. eds.) pp.509-45, Wiley-Interscience, New York.
86. Pentikainen M. O, Lehtonen E. M. P, Kovanen P. T. Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1996; 37:2638-49.
87. Oorni K, Kovanen P. T. Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro. *J Biol Chem* 2004; 279: 34776-84.

88. Hevonoja T, Pentikainen M. O, Hyvonen M. T, et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 189-210.
89. Sartipy P., Camejo G, Svensson L, et al. Phospholipase A modification of lipoproteins: potential effects on atherogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 507: 3-7.
90. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 3-58.
91. Karabina S. A, Brochériou I, Le Naour G, et al. Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB J.* 2006; 20: 2547-49.
92. Rosengren B, Jönsson-Rylander A. C, Peilot H, et al. Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 1301-08.
93. Boekholdt S. M, Keller T. T, Wareham N. J, et al. Serum levels of type II secretory phospholipase A2 and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 839-46.
94. Ettelaie, C, Haris P. I, James N. J, et al. Alterations in the structure of apolipoprotein B-100 determine the behaviour of LDL towards thromboplastin. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1345: 237-47.
95. Knott T. J, Pease R. J, Powell L. M, et al. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 1986; 323: 734-38.
96. Hevonoja T, Pentikäinen M. O, Hyvönen M. T, et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1488: 189-210.
97. Brunelli R, Greco G, Barteri M, et al. One site on the apoB-100 specifically binds 17-beta-estradiol and regulates the overall structure of LDL. *FASEB J.* 17: 2127-29.