

**RASSEGNA**

# HDL E ATEROSCLEROSI: LA LEZIONE DEI DEFICIT GENETICI DI HDL

## HDL and atherosclerosis: insights from inherited HDL disorders

**LAURA CALABRESI<sup>1</sup>, MONICA GOMARASCHI<sup>1</sup>, SARA SIMONELLI<sup>1</sup>,  
ALICE OSSOLI<sup>1</sup>, ELDA FAVARI<sup>2</sup>, FRANCO BERNINI<sup>2</sup>, GUIDO FRANCESCHINI<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Centro Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

<sup>2</sup>Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma;

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Università degli Studi di Milano

**SUMMARY**

Plasma high density lipoproteins (HDL) comprise a highly heterogeneous family of lipoprotein particles, differing in density, size, surface charge, and lipid and protein composition. Epidemiological studies have shown that plasma HDL level inversely correlates with atherosclerotic cardiovascular disease. The most relevant atheroprotective function of HDL is to promote the removal of cholesterol from macrophages within the arterial wall and deliver it to the liver for excretion in a process called reverse cholesterol transport. In addition, HDL can contribute to the maintenance of endothelial cell homeostasis and have potent antioxidant properties. It has been long suggested that individual HDL subclasses may differ in terms of their functional properties, but which one is the good particle remains to be defined. Inherited HDL disorders are rare monogenic diseases due to mutations in genes encoding proteins involved in HDL metabolism. These disorders are not only characterized by extremely low or high plasma HDL levels but also by an abnormal HDL subclass distribution, and thus represent a unique tool to understand the relationship between plasma HDL concentration, HDL function, and HDL-mediated atheroprotection.

**Keywords:** *High density lipoproteins; HDL subclasses; inherited HDL disorders; cholesterol efflux; endothelium; carotid intima media thickness.*

**Introduzione**

Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato l'esistenza di una forte correlazione inversa tra livelli plasmatici di HDL-colesterolo (HDL-C) e incidenza di malattie cardiovascolari (1, 2). Il ruolo delle HDL nella protezione cardiovascolare è

*Indirizzo per la corrispondenza*

Laura Calabresi

Dipartimento di Scienze Farmacologiche  
e Biomolecolari

Università degli Studi di Milano

Via Balzaretti, 9 - 20133 Milano

E-mail: laura.calabresi@unimi.it

stato però di recente messo in discussione da studi di randomizzazione mendeliana (3-5), così come da trial clinici condotti con farmaci che pur in grado di aumentare i livelli plasmatici di HDL-C non hanno mostrato beneficio sugli eventi cardiovascolari (6-8). Questa discrepanza potrebbe essere spiegata dal fatto che il parametro HDL-C misurato nel plasma non rappresenti la reale efficienza del sistema HDL, che è certamente complesso e coinvolge particelle diverse con funzionalità variabile (9).

Questa breve rassegna si propone di discutere le proprietà strutturali e funzionali delle HDL dei portatori dei disordini genetici di HDL nel tentativo di chiarire la relazione tra le diverse sottoclassi HDL e l'ateroprotezione mediata da queste lipoproteine.

### Le lipoproteine ad alta densità (HDL)

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) (densità 1,063-1,21 g/mL) rappresentano un gruppo eterogeneo di particelle di piccole dimensioni con diametro compreso tra 7 e 12 nm.

La componente proteica principale delle HDL è rappresentata dall'apolipoproteina A-I (apoA-I), che gioca un ruolo fonda-

mentale nella biogenesi e nella funzione delle HDL; l'apoA-II rappresenta la seconda proteina strutturale delle HDL. Oltre ad apoA-I e apoA-II, le HDL trasportano numerose proteine, tra cui enzimi, proteine di trasporto dei lipidi e proteine di fase acuta (10).

Le HDL possono essere separate in sottoclassi in funzione di densità, dimensioni, composizione e mobilità elettroforetica (9) (*Figura 1*). In base alla densità le HDL possono essere distinte in HDL2 (1,063-1,125 g/ml), più grandi e leggere, e HDL3 (1,125-1,21 g/ml), più piccole e dense. Le HDL2 e le HDL3 possono essere ulteriormente separate in base alla dimensione in cinque sottoclassi: HDL3c, diametro 7,2-7,8 nm; HDL3b, 7,8-8,2 nm; HDL3a, 8,2-8,8 nm; HDL2a, 8,8-9,7 nm; HDL2b, 9,7-12,0 nm in HDL2a e HDL2b (11). La gran parte delle HDL circolanti ha forma sferica e presenta la tipica migrazione in posizione  $\alpha$  su gel di agarosio, da cui il nome di  $\alpha$  lipoproteine. Una piccola porzione di HDL ha invece forma discoidale con conseguente migrazione in posizione pre- $\beta$  su gel di agarosio (12).

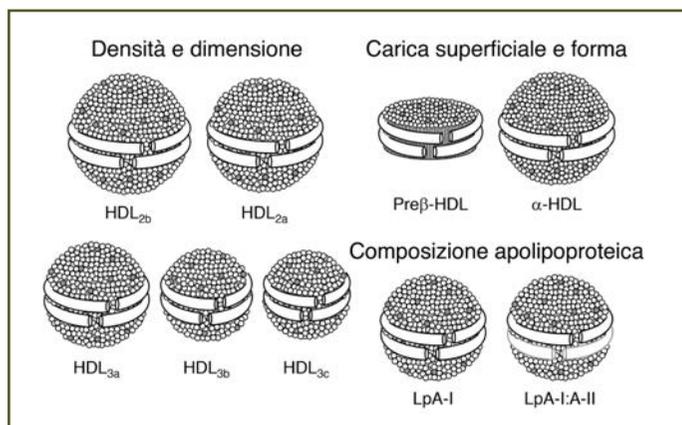
Il sistema HDL è molto dinamico e le particelle HDL sono sottoposte a un continuo rimodellamento nel plasma, grazie all'azione di numerosi enzimi e proteine di trasferimento dei lipidi (13) (*Figura 2*).

La relazione tra le diverse sottoclassi HDL e il rischio cardiovascolare resta da definire, anche se alcuni studi suggeriscono che le HDL2, e quindi le particelle di dimensioni maggiori, siano associate a minor rischio cardiovascolare (14-16).

### Funzioni delle HDL

#### *Trasporto inverso del colesterolo*

La capacità di promuovere la rimozione di colesterolo dai macrofagi della parete arteriosa e di trasportare tale colesterolo

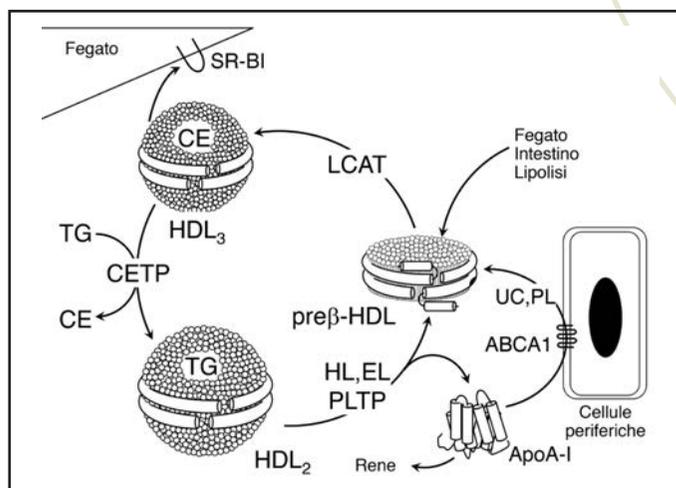


**Figura 1** - Eterogeneità delle HDL (disegni non in scala).

al fegato per l'escrezione, in un processo chiamato trasporto inverso del colesterolo (RCT) (17), rappresenta la funzione antiaterogena più rilevante e nota delle HDL.

La rimozione del colesterolo non esterificato dalle cellule, primo step del RCT, costituisce il passaggio fondamentale nel determinare la velocità dell'intero processo ed avviene tramite molteplici meccanismi (18) che coinvolgono sia processi di diffusione passiva che sistemi di trasporto attivi (Figura 3). Il rilascio di colesterolo per diffusione acquosa avviene in tutti i tipi di cellule e risulta facilitato quando sulla membrana cellulare viene espresso il recettore scavenger BI (SR-BI). Sia la diffusione acquosa che l'efflusso SR-BI-mediato vengono promossi da HDL mature e di grandi dimensioni (18, 19). Il trasporto attivo è mediato dal trasportatore ABCA1, appartenente alla famiglia dei trasportatori *ATP-binding cassettes*, che promuove l'efflusso unidirezionale di fosfolipidi e colesterolo verso apolipoproteine povere in lipidi e HDL immature a forma discoidale chiamate pre $\beta$ -HDL (18, 19). I macrofagi possono inoltre rilasciare colesterolo attraverso il trasportatore ABCG1, che media l'efflusso di colesterolo a pre $\beta$ -HDL e HDL mature, ma non permette il rilascio di colesterolo a apolipoproteine scarsamente lipidate (18, 19). Sebbene tutte le sottoclassi HDL abbiano la capacità di promuovere l'efflusso di colesterolo cellulare interagendo con specifiche proteine di membrana, il contenuto plasmatico di pre $\beta$ -HDL, che promuovono principalmente l'efflusso di colesterolo attraverso il trasportatore ABCA1, sembra essere di primaria importanza nel determinare la variabilità della risposta individuale nel processo di efflusso macrofagico (20).

Ad oggi la funzionalità delle HDL nel singolo individuo può essere valutata misurando nel siero la "Capacità di promuo-



**Figura 2** - Interconversione plasmatica delle HDL. TG: trigliceridi; CE, esteri del colesterolo; UC, colesterolo non esterificato; PL, fosfolipidi; LCAT, lecitina:colesterolo aciltransferasi; CETP, proteina di trasferimento dei CE; HDL, lipasi epatica; EL, lipasi endoteliale; PLTP, proteina di trasferimento dei PL.

vere efflusso di colesterolo" (CEC) con metodiche validate che si basano sia su tecniche radioisotopiche che fluorimetriche. Il ruolo della CEC del siero come indice di protezione cardiovascolare è stato per la prima volta suggerito da uno studio in cui questa variabile ha mostrato una relazione inversa con l'ispessimento medio-intimale carotideo indipendentemente dai livelli plasmatici di HDL-C in due distinte coorti di soggetti (21). Questa e successive indicazioni (22) suggeriscono che la funzionalità delle HDL, misurata tramite la CEC, può essere più rilevante delle loro concentrazioni plasmatiche nella definizione del rischio cardiovascolare. Il valore predittivo della CEC è stato recentemente dimostrato da uno studio prospettico condotto su circa 3.000 soggetti in prevenzione primaria, in cui la CEC è risultata inversamente correlata all'incidenza degli eventi, in modo indipendente dai livelli plasmatici di HDL-C (23).

Una volta accumulatosi nelle HDL, il colesterolo viene esterificato nel plasma

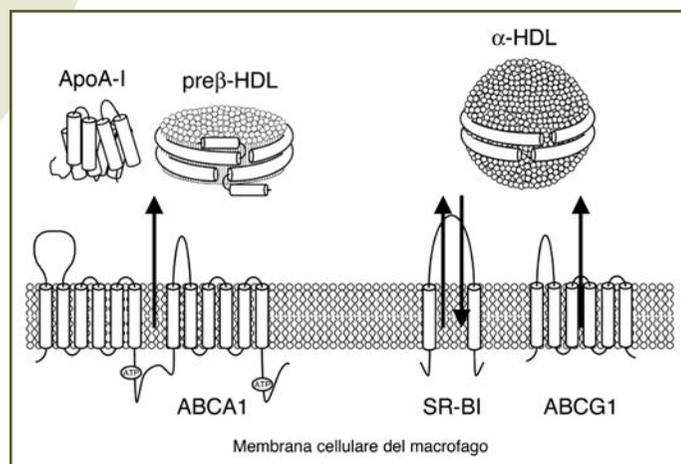


Figura 3 - Meccanismi di efflusso di colesterolo cellulare.

dall'enzima lecitina: colesterolo aciltransferasi (LCAT), con formazione di esteri del colesterolo (24). La maggior parte degli esteri del colesterolo viene in seguito trasferita, in cambio di trigliceridi, dall'enzima CETP alle lipoproteine ricche in apoB (VLDL e LDL) che vengono a loro volta captate nel fegato tramite specifici meccanismi di interazione recettoriale per il successivo catabolismo (25). Una frazione minore di esteri del colesterolo viene invece trasportata direttamente al fegato dalle HDL e rilasciata in seguito ad interazione col recettore SR-BI (26), che a livello epatico media l'uptake di colesterolo esterificato ma anche di colesterolo non esterificato (27).

#### HDL e protezione endoteliale

Per molti anni l'endotelio è stato considerato come una barriera inerte atta a separare la parete vasale dal torrente circolatorio; recentemente è stato dimostrato che oltre ad esercitare un ruolo strutturale l'endotelio è coinvolto nella regolazione della funzionalità vasale. In condizioni fisiologiche l'endotelio è un monostrato continuo con una superficie anti-adesiva per le cellule circolanti; inoltre produce e

rilascia una serie di molecole vasoattive, quali ossido nitrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), che agiscono sulle cellule muscolari lisce sottostanti regolando il tono vasale. La perdita della funzionalità endoteliale è un evento chiave del processo aterosclerotico e si caratterizza per la ridotta disponibilità di molecole ad azione vasodilatante e per l'aumento di permeabilità, dovuto alla perdita di continuità del monostrato e all'espressione sulla superficie endoteliale di molecole favorevoli all'adesione delle cellule circolanti. Numerosi studi condotti *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che le HDL contribuiscono a preservare l'omeostasi endoteliale, inibendo la produzione di molecole pro-infiammatorie e di adesione cellulare, promuovendo il rilassamento della parete vasale ed il mantenimento dell'integrità della barriera endoteliale (28). Infatti, le HDL stimolano la produzione ed il rilascio di molecole vasoattive quali NO e PGI<sub>2</sub> da parte delle cellule endoteliali. L'aumentata produzione di NO è dovuta all'induzione dell'espressione e attivazione dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) (29, 30); tale effetto è mediato dall'interazione dell'apoA-I con il recettore scavenger SR-BI (31) e dalla conseguente attivazione della via di segnale PI3K/Akt, che porta alla fosforilazione di eNOS. Inoltre, anche la sfingosina-1-fosfato (S1P), uno sfingolipide presente in piccole quantità nelle HDL, può mediare l'attivazione di eNOS per interazione con il proprio recettore S1P3 (32). Le HDL sono in grado di aumentare anche la biodisponibilità di PGI<sub>2</sub> attraverso diversi meccanismi che coinvolgono sia la componente lipidica che proteica delle HDL (33, 34). La PGI<sub>2</sub> è prodotta dalle cellule endoteliali a partire da arachidonato per azione delle ciclossigenasi (Cox-1 e soprattutto Cox-2) e della PGI<sub>2</sub> sintasi. Le HDL possono for-

nire alle cellule l'arachidonato contenuto nei loro fosfolipidi ed esteri del colesterolo oppure possono rendere disponibile l'arachidonato presente nelle membrane attivando fosfolipasi calcio-dipendenti (33, 35, 36); inoltre, le HDL aumentano il contenuto cellulare di Cox-2 mediante meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali (34, 37). Le due principali sottoclassi HDL2 e HDL3 si sono dimostrate ugualmente efficaci nel promuovere il rilascio di NO e PGI2 *in vitro* (38, 39).

Le HDL sono in grado di inibire l'espressione delle molecole di adesione cellulare (CAMs) indotta da stimoli diversi nelle cellule endoteliali (40, 41), prevenendo così l'adesione delle cellule circolanti e la loro transmigrazione attraverso la parete vasale. I meccanismi responsabili di questo effetto non sono ancora stati completamente elucidati e potrebbero comprendere l'inibizione da parte delle HDL dell'attività della sfingosina chinasi e della traslocazione nucleare di NF-κB, e l'aumento dell'espressione di eme-ossigenasi 1 mediata da SR-BI (42, 43). Le HDL3 si sono dimostrate nettamente più efficaci delle HDL2 nell'inibire l'espressione delle molecole di adesione cellulare in cellule endoteliali (44).

#### *Attività antiossidante delle HDL*

A livello endoteliale, lo stress ossidativo promuove la formazione di LDL ossidate che si accumulano nei macrofagi della parete arteriosa e ne promuovono la trasformazione in cellule schiumose. Le HDL, grazie alle loro proprietà antiossidanti contribuiscono a proteggere la parete vasale dal danno ossidativo attraverso diversi meccanismi (45), il primo dei quali consiste nella rimozione di lipidi ossidati dalle LDL (45).

Dopo essere stati incorporati nelle HDL, i lipidi ossidati possono venire degradati

dagli enzimi antiossidanti trasportati dalle HDL stesse, quali PON-1, PAF-AH e LCAT, oppure possono essere ridotti da apoA-I e apoA-II con la concomitante ossidazione dei loro residui metioninici (46).

Le diverse sottoclassi HDL esercitano differenti proprietà antiossidanti: le HDL3 sono più efficaci delle HDL2 nell'accumulare e nell'inattivare i lipidi reattivi grazie al maggior contenuto e alla diversa conformazione di apoA-I, insieme all'impoverimento in sfingomielina (45).

Le HDL3 piccole e dense, sono infatti più resistenti alle modifiche ossidative rispetto alle più grandi e meno dense HDL2 (47).

#### **Disordini genetici del sistema HDL**

I disordini ereditari del sistema HDL sono rare patologie monogeniche causate da mutazioni in geni che codificano per diverse proteine coinvolte nel metabolismo delle HDL. Mutazioni a carico dei geni *ABCA1*, *APOA1*, e *LCAT* causano ipoalfalipoproteinemia, mentre quelle del gene della *CETP* portano a iperalfalipoproteinemia. Il gene *ABCA1* è localizzato sul cromosoma 9 (9q31) e codifica per una proteina di membrana di 2.261 residui aminoacidici appartenente alla famiglia dei trasportatori ABC. Ad oggi, in letteratura sono state riportate più di 170 diverse mutazioni del gene *ABCA1* in grado di modificare in maniera differente la funzionalità della proteina *ABCA1*. Mutazioni a carico di entrambi gli alleli del gene *ABCA1* causano la malattia di Tangier (TD), una rara patologia di tipo recessivo caratterizzata da un'assenza quasi completa di HDL (48). Nei soggetti eterozigoti la perdita di funzionalità di *ABCA1* porta al deficit familiare di HDL, disordine molto più comune e relativamente più lieve, che determina un'ampia varietà di fenotipi clinici e biochi-

mici in base al tipo di mutazione presente nei portatori (49). Uno degli aspetti chiave, dal punto di vista biochimico, del TD è un efflusso di colesterolo difettoso dalla membrana plasmatica delle cellule verso gli accettori extracellulari (50). La mancata attività di ABCA1 previene la lipidazione dell'apoA-I e, di conseguenza, la formazione di HDL. Nel plasma di soggetti con TD sono presenti solo pre $\beta$ -HDL mentre le HDL sferiche e mature sono totalmente assenti; gli eterozigoti presentano particelle HDL di piccole dimensioni, povere di colesterolo e relativamente arricchite in apoA-I (51).

Il gene che codifica per l'apoA1 è localizzato sul cromosoma 11 (11q23-q24) e codifica per un polipeptide di 243 aminoacidi. Finora sono state identificate più di 60 mutazioni a carico di questo gene; più della metà di esse sono associate a bassi livelli di HDL-C (52) e principalmente localizzate nella porzione centrale dell'apoA-I (53). L'apoA-I<sub>Milano</sub> (apoA-I<sub>M</sub>), caratterizzata dalla sostituzione dell'arginina in posizione 173 con una cisteina, è stata la prima mutante dell'apoA-I ad essere descritta nell'uomo (54, 55) ed è certamente la variante meglio caratterizzata. La presenza della cisteina, tipicamente assente nell'apoA-I, permette alla variante di formare dimeri tra due catene della proteina stessa. Tutti i portatori identificati ad oggi sono eterozigoti per la variante e presentano ridotti livelli plasmatici di HDL-C, un deficit parziale di LCAT e livelli variabili di ipertrigliceridemia (56, 57). Le HDL dei portatori dell'A-I<sub>M</sub> sono piccole e dense (58) e arricchite in particelle discoidali contenenti la forma dimerica della variante (59).

Il gene *LCAT* è localizzato sul cromosoma 16 (16q22), e codifica per una glicoproteina di 416 residui aminoacidici. Mutazioni a carico del gene che codifica per LCAT causano una parziale o completa perdita

di attività enzimatica e ipoalfalipoproteinemica (60). I portatori di due alleli *LCAT* mutati presentano una severa riduzione dei livelli plasmatici di HDL-C associata a molteplici alterazioni nella struttura delle HDL e nella distribuzione delle sottoclassi HDL, con una selettiva deplezione delle particelle di grandi dimensioni contenenti apoA-II e la predominanza di piccole pre $\beta$ -HDL (61, 62). I soggetti eterozigoti sono caratterizzati da livelli plasmatici di HDL-C mediamente bassi e da un arricchimento in piccole particelle pre $\beta$ -HDL (61, 62).

Il gene della CETP, localizzato sul cromosoma 16 (16q21), codifica per una glicoproteina idrofobica di 476 aminoacidi. Ad oggi, sono state descritte circa 40 mutazioni di questo gene, la maggior parte delle quali identificata in soggetti giapponesi. I portatori di due alleli mutati presentano livelli plasmatici di HDL-C cinque volte superiori alla norma (63, 64). La completa assenza di attività enzimatica della CETP impedisce il trasferimento di esteri del colesterolo dalle HDL alle altre lipoproteine determinando così l'accumulo di questi esteri del colesterolo nelle HDL stesse, che divengono, in questo modo, particolarmente grandi (64, 65). I portatori eterozigoti mostrano un aumento dei livelli plasmatici di HDL-C e di apoA-I e un incremento della dimensione delle HDL (64, 66).

#### *Efflusso di colesterolo cellulare in disordini genetici del sistema HDL*

L'abilità delle HDL di portatori di disordini genetici del sistema HDL di promuovere l'efflusso cellulare di colesterolo (CEC) è stata valutata in diversi laboratori. I risultati dei vari studi non sempre sono stati sovrapponibili; questo può essere dovuto all'utilizzo di diversi modelli cellulari che esprimono livelli variabili dei trasportatori implicati nel processo di efflusso di colesterolo. Negli ultimi dieci anni, i nostri

gruppi hanno valutato, utilizzando saggi sperimentali validati e riproducibili, la CEC di sieri di portatori di deficit di LCAT e CETP e di portatori di apoA-I<sub>M</sub> (Tabella 1). I risultati di questi studi hanno permesso di confrontare l'impatto dei disturbi genetici del sistema HDL sul processo di efflusso e hanno fornito importanti informazioni sulla relazione tra la distribuzione delle particelle HDL e gli specifici trasportatori coinvolti in tale processo.

In soggetti portatori della variante A-I<sub>M</sub> il siero è più efficiente rispetto al siero dei controlli nel promuovere l'efflusso di colesterolo mediato da ABCA1 (59). Un risultato probabilmente dovuto all'accumulo nel siero di questi soggetti di piccole particelle pre $\beta$ -HDL contenenti una singola molecola del dimero A-I<sub>M</sub>-A-I<sub>M</sub> (59). Al contrario, l'efflusso mediato da ABCG1 e da SR-BI risulta ridotto rispetto al controllo, riflettendo la ridotta concentrazione di particelle HDL mature riscontrata nel siero dei portatori (59, 67).

Un andamento del profilo di efflusso analogo è stato osservato nei portatori di deficit di LCAT. L'efflusso cellulare di colesterolo indotto dal siero dei portatori via trasportatore ABCA1 è significativamente maggiore rispetto al valore di controllo e

correla con la concentrazione plasmatica di pre $\beta$ -HDL (68). Al contrario, anche nei portatori di deficit di LCAT l'abilità del siero nel promuovere l'efflusso via ABCG1 e SR-BI è ridotta in maniera significativa e correla con i livelli plasmatici di HDL (60). Particolarmente interessante è stata l'osservazione che il siero di portatori di deficit di LCAT ha la stessa efficienza del siero controllo nel ridurre il contenuto intracellulare di colesterolo in macrofagi peritoneali arricchiti con questo lipide (68), un modello di cellula schiumosa dove l'efflusso di colesterolo avviene attraverso tutti i meccanismi precedentemente descritti (69). Questa osservazione indica che l'aumentato efflusso mediato dalle pre $\beta$ -HDL via ABCA1 possa compensare il ridotto efflusso mediato dalle HDL mature via ABCG1 e SR-BI osservato in questi sieri.

Al contrario di quanto descritto sinora, il siero proveniente da soggetti con mutazioni a carico del gene che codifica per CETP mostra un efflusso mediato da ABCA1 ridotto rispetto al siero controllo, mentre l'efflusso tramite ABCG1 e SR-BI è paragonabile o aumentato (64). Questi risultati non sorprendono alla luce dell'aumentato accumulo nel plasma dei portatori di HDL grandi e maturi, ritenute essere i più effi-

**Tabella 1 - Proprietà strutturali e funzionali delle HDL di portatori di difetti genetici di HDL.**

	Portatori A-I <sub>M</sub>	Deficit di LCAT	Deficit di CETP
HDL-C	↓	↓	↑↑
Sottoclassi HDL	↑ HDL piccole ↓ HDL grandi	↑ pre $\beta$ -HDL ↓ HDL grandi	↑ HDL grandi
Efflusso di colesterolo cellulare	↑ efflusso ABCA1-mediato	↑ efflusso ABCA1-mediato	↓ efflusso ABCA1-mediato ↑ efflusso ABCG1-mediato
Funzionalità endoteliale	↑ inibizione espressione CAMs ↑ produzione di NO	NA	→ inibizione espressione CAMs ↓ produzione di NO
Attività antiossidante	↓ attività PON1	↓ attività PON1	↑ attività antiossidante

NA, dati non disponibili.

cienti accettori di colesterolo tramite questi meccanismi.

In questo caso, i sieri dei portatori hanno mostrato una capacità significativamente ridotta rispetto ai sieri controllo di rimuovere il colesterolo da macrofagi arricchiti (64), osservazione che conferma il ruolo dell'efflusso mediato da ABCA1 ad accettori pre $\beta$ -HDL quale principale meccanismo responsabile della rimozione cellulare di colesterolo.

#### *HDL e protezione endoteliale in disordini monogenici del sistema HDL*

Ad oggi, un numero limitato di studi ha valutato l'impatto di mutazioni che causano ipo- o iper-alfalipoproteinemia familiare sulla capacità delle HDL di preservare l'omeostasi endoteliale. A tal fine possono essere utilizzati due approcci:

- 1) valutare nei portatori di mutazioni parametri di funzionalità endoteliale *in vivo* o *ex vivo*, quali la vasodilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale (FMD) (70) o la concentrazione plasmatica di molecole pro-infiammatorie (71);
- 2) testare *in vitro* su modelli cellulari l'attività di HDL isolate dal plasma dei portatori.

I saggi funzionali condotti *in vitro* su HDL isolate consentono di definire se il cambiamento dei parametri di funzionalità endoteliale osservati *in vitro/ex vivo* rappresentano la semplice conseguenza del diverso numero di HDL circolanti (aumentato o ridotto nei diversi difetti genetici) o sono il riflesso di un'alterazione della funzionalità delle HDL stesse.

I portatori di mutazioni nel gene che codifica per il trasportatore ABCA1 presentano valori di FMD notevolmente ridotti rispetto ai soggetti controllo, indicativi di una compromissione del sistema di regolazione del tono vasale. Tale compromis-

sione potrebbe essere causata dalla carenza di HDL nel plasma dei portatori, poiché l'infusione di HDL sintetiche normalizza la loro funzionalità endoteliale (72). Ad oggi, non sono ancora stati condotti studi *in vitro* su HDL isolate dai portatori di mutazioni per ABCA1, pertanto non è possibile escludere che la ridotta vasodilatazione evidenziata nei portatori sia dovuta ad una alterazione della loro capacità di stimolare il rilascio di molecole vasoattive.

Nei portatori di apoA-I<sub>M</sub> la funzionalità endoteliale è stata valutata come vasodilatazione in risposta all'iperemia reattiva e misurando la concentrazione plasmatica di molecole d'adesione.

In questo caso, i valori di vasodilatazione ottenuti sono paragonabili a quelli dei soggetti controllo (73) nonostante concentrazioni plasmatiche di HDL-C molto ridotte, condizione normalmente associata ad una compromissione della vasodilatazione (73, 74).

Anche la concentrazione plasmatica di CAMs è comparabile nei portatori di apoA-I<sub>M</sub> e nei controlli (73). Studi *in vitro* hanno fornito una spiegazione per la preservata funzionalità endoteliale osservata nei portatori dell'apoA-I<sub>M</sub> nonostante la severa ipoalfalipoproteinemia; infatti, le HDL dei portatori hanno una capacità di indurre la produzione di NO e di esercitare attività anti-infiammatorie in cellule endoteliali superiore alle HDL isolate da soggetti controllo (73) (Tabella 1).

Nel deficit genetico di CETP, la capacità delle HDL di modulare l'omeostasi endoteliale *in vitro* è stata valutata recentemente isolando le lipoproteine dal plasma di un numero limitato di portatori (38) (Tabella 1). Le loro HDL hanno mostrato una capacità di inibire l'espressione di VCAM-1 in cellule endoteliali comparabile a quella delle HDL isolate dai soggetti controllo; in accordo, i portatori presentano concentra-

zioni plasmatiche di CAMs ridotte rispetto ai controlli, a causa del numero elevato di HDL circolanti nel loro plasma (38).

Al contrario, le HDL dei soggetti con deficit genetico di CETP hanno mostrato una compromissione della capacità di attivare eNOS e promuovere la produzione di NO in cellule endoteliali rispetto alle HDL dei controlli, probabilmente a causa della minor concentrazione di S1P nelle loro HDL (38).

#### *Attività antiossidante delle HDL in disordini monogenici del sistema HDL*

Ad oggi, le proprietà antiossidanti delle HDL isolate da portatori con disordini genetici del sistema HDL sono state oggetto di un numero limitato di studi.

L'attività antiossidante delle HDL isolate da soggetti con mutazioni a carico dei geni che codificano per ApoA-I, ABCA1 e LCAT è risultata ridotta rispetto all'attività riscontrata nelle HDL dei soggetti controllo (75).

Le HDL dei portatori mostrano infatti una minor efficacia nell'inattivare le LDL ossidate, probabilmente per la ridotta atti-

vità degli enzimi PON e PAF-AH (75) (Tabella 1). In un secondo studio, i livelli di lipidi ossidati sono stati valutati in un numero consistente di soggetti olandesi portatori di deficit di LCAT con risultati che mostrano un leggero aumento di fosfolipidi ossidati nei soggetti eterozigoti ma non negli omozigoti (76). L'enzima LCAT possiede note proprietà antiossidanti (77) e, sulla base di tali proprietà, il risultato emerso nei portatori olandesi, in cui l'enzima è deficitario, risulta essere abbastanza sorprendente. Il mancato aumento di lipidi ossidati in tali soggetti suggerisce una maggior efficacia delle HDL dei portatori di deficit di LCAT nella rimozione di fosfolipidi ossidati.

In un recente studio è stata infine valutata l'attività antiossidante delle HDL e delle sue sottoclassi nei portatori di deficit di CETP. Le HDL dei portatori, grazie alle proprietà antiossidanti delle sottoclassi HDL3b e HDL3c, presenti nei soggetti con deficit di CETP, mostrano una capacità di prevenire l'ossidazione delle LDL superiore alle HDL di soggetti controllo (78) (Tabella 1).

**Tabella 2 - Caratteristiche dei portatori di difetti genetici di HDL**

	Portatori A- <sub>IM</sub>	Deficit di LCAT	Deficit di CETP	Controlli
N	21	40	4	122
Età (anni)	42,2±17,5	41,7±17,0	55,5±29,5	41,9±16,3
Genere (M/F)	11/10	25/15	3/1	72/50
Colesterolo totale (mg/dl)	189,2±49,6	164,2±56,5	222,0±90,7	199,6±33,2
LDL-Colesterolo (mg/dl)	131,7±35,0	102,7±51,5	102,8±21,0	125,0±31,0
HDL-Colesterolo (mg/dl)	19,8±9,8	30,1±17,4	102,3±72,3	53,6±14,0
Trigliceridi (mg/dl)	186,0±107,2	156,5±111,3	83,8±41,0	107,7±63,1
Apolipoproteina A-I (mg/dl)	78,5±28,1	83,3±34,2	169,0±72,0	136,2±22,8
Apolipoproteina A-II (mg/dl)	17,3±4,8	23,9±11,8	46,3±12,6	37,1±5,7

I dati riportati si riferiscono a 21 portatori eterozigoti dell'apoA-IM (79), 12 portatori omozigoti e 28 eterozigoti di deficit di LCAT (85) e 1 portatore omozigote e 3 eterozigoti di deficit di CETP (64). I dati sono espressi come medie±DS.

### Disordini genetici del sistema HDL e aterosclerosi preclinica

L'ispessimento medio-intimale (IMT) carotideo, che rappresenta un valido marcatore di aterosclerosi, è stato misurato in numerosi portatori di disordini genetici di HDL con risultati spesso sorprendenti. I portatori dell'apoA-I<sub>M</sub> presentano valori di IMT carotideo analoghi a quelli di soggetti controllo di pari età e genere (Figura 4), nonostante i livelli plasmatici di HDL-C molto ridotti (Tabella 2) (79).

Al contrario, i portatori della variante L202P dell'apoA-I presentano IMT carotideo aumentato e associato a elevato rischio cardiovascolare (80). Il diverso impatto delle due mutazioni, associate a livelli paragonabili di HDL-C e apoA-I (79, 80), sull'aterosclerosi preclinica trova probabilmente spiegazione nell'effetto delle mutazioni sulla struttura e funzione dell'apoA-I. La variante A-I<sub>M</sub> contiene una cisteina che permette la formazione di una proteina dimerica con emivita prolungata (81) e particolarmente efficiente nel promuovere efflusso

di colesterolo cellulare (59); al contrario l'apoA-I(L202P) è una proteina con ridotta capacità di promuovere efflusso di colesterolo (82).

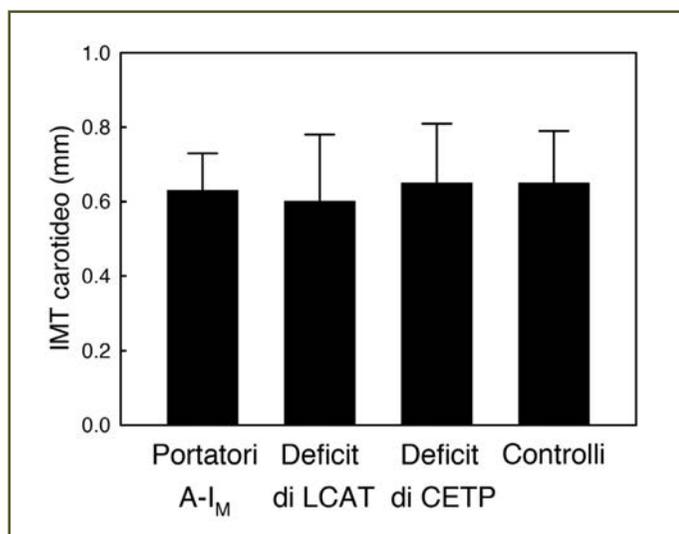
Tre studi condotti da gruppi diversi hanno valutato l'aterosclerosi preclinica, misurata come IMT carotideo, in portatori di deficit di LCAT (83-85). I risultati suggeriscono che l'assenza dell'enzima LCAT, sia totale che parziale, non si associa ad aumentata aterosclerosi.

Lo studio italiano da noi condotto ha valutato 40 portatori di deficit di LCAT (12 omozigoti e 28 eterozigoti, Tabella 2) confrontati con 80 controlli di pari genere ed età (85). I risultati mostrano che non solo l'aterosclerosi preclinica non è aumentata nei portatori di deficit di LCAT, ma il valore medio di IMT carotideo è sorprendentemente inferiore nei portatori rispetto ai controlli (Figura 4).

Pochi dati di IMT carotideo sono disponibile per i portatori di deficit di CETP di origine caucasica. Uno studio ha valutato 25 eterozigoti per la mutazione IVS7+1 confrontati con familiari non portatori (86) e un secondo studio ha valutato 4 portatori della mutazione R37X (Tabella 2) confrontati con controlli di pari genere ed età (64). I due studi, pur con numeri limitati, hanno dimostrato che le mutazioni nel gene *CETP* hanno effetto neutro sull'IMT carotideo.

### Conclusioni

La relazione tra ridotti livelli plasmatici di HDL-C e malattie cardiovascolari rappresenta la base per lo sviluppo di nuove terapie cardiovascolari mirate alle HDL. Recenti studi di randomizzazione mendeliana e i trial clinici condotti con gli inibitori della CETP, farmaci che producono un aumento significativo dei livelli plasmatici di HDL-C circolanti non associato a un be-



**Figura 4** - Valori medi di IMT carotideo nei portatori di disordini genetici del sistema HDL (portatori A-I<sub>M</sub>, n=21; deficit di LCAT, n=40; deficit di CETP, n=4) e soggetti controllo (n=122). I risultati sono espressi come medie±SD.21

neficio in termini di eventi cardiovascolari, hanno messo in discussione il ruolo delle HDL nella protezione cardiovascolare. I difetti genetici di HDL confermano che non sempre le concentrazioni ridotte di HDL-C si associano ad aterosclerosi, così come elevati livelli di HDL-C non necessariamente determinano ateroprotezione. Va sottolineato che nei difetti genetici di HDL non solo i livelli di HDL sono alterati (ridot-

ti o elevati), ma la distribuzione delle sottoclassi HDL risulta modificata, anche in maniera importante. I dati riassunti in questa rassegna suggeriscono che nei difetti genetici caratterizzati da HDL di piccole dimensioni e arricchite in particelle preβ il sistema HDL mantenga una corretta funzionalità, mentre nel difetto di CETP in cui si accumulano particelle molto grandi il sistema HDL sembra meno funzionale.

### RIASSUNTO

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) rappresentano un gruppo eterogeneo di particelle che differiscono in densità, dimensioni, composizione e mobilità elettroforetica. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione inversa tra livelli plasmatici di HDL-colesterolo (HDL-C) e il rischio cardiovascolare; tale relazione è indipendente dai livelli di LDL-colesterolo. L'effetto ateroprotettivo delle HDL trova spiegazione nel ruolo chiave da esse svolto nel trasporto inverso del colesterolo (RCT), il processo attraverso il quale il colesterolo viene rimosso dai macrofagi della parete arteriosa e veicolato al fegato per l'eliminazione. Oltre al ruolo nel trasporto inverso, le HDL esercitano una serie di attività vasoprotettive indipendenti dal metabolismo lipidico che potrebbero contribuire all'ateroprotezione. Il significato di questi effetti benefici, così come il ruolo di specifiche sottoclassi HDL o componenti delle HDL nel mediare queste proprietà rimane da definire. I disordini genetici di HDL includono varie malattie rare causate da mutazioni in geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo delle HDL. I disordini genetici di HDL non sono solo caratterizzati da livelli di HDL circolanti molto ridotti o molto elevati ma anche da alterazioni delle sottoclassi HDL e rappresentano quindi un importante strumento per valutare la relazione tra quantità e qualità delle HDL e loro attività antiaterogene.

**Parole chiave:** *Lipoproteine ad alta densità (HDL), sottopopolazioni HDL, deficit genetici di HDL, efflusso di colesterolo cellular, ispessimento medio-intimale carotideo.*

### Bibliografia

1. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977; 62: 707-714.
2. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996; 124 (Suppl.): S11-S20.
3. Johannsen TH, Kamstrup PR, Andersen RV, et al. Hepatic lipase, genetically elevated high-density lipoprotein, and risk of ischemic cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1264-1273, 2009.
4. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012; 380: 572-580.
5. Haase CL, Tybjaerg-Hansen A, Ali QA, et al. LCAT, HDL Cholesterol and Ischemic Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study of HDL Cholesterol in 54,500 Individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: E248-E256.
6. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2109-2122.
7. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2089-2099.
8. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med.* 2011; 365: 2255-2267.

9. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. High-density lipoprotein quantity or quality for cardiovascular prevention? *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 1494-1503.
10. Heinecke JW. The Protein Cargo of HDL: Implications for Vascular Wall Biology and Therapeutics. *J Clin Lipidol.* 2010; 4: 371-375.
11. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 1986; 128: 417-431.
12. Asztalos BF, Lefevre M, Foster TA, et al. Normolipidemic subjects with low HDL cholesterol levels have altered HDL subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1885-1893.
13. Rye KA, Barter PJ. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res.* 2014; 114: 143-156.
14. Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol.* 2003; 91: 12E-17E.
15. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 2181-2187.
16. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2185-2191.
17. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006; 113: 2548-2555.
18. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010; 21: 229-238.
19. Favari E, Calabresi L, Adorni MP, et al. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry.* 2009; 48: 11067-11074.
20. de la Llera Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, et al. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 796-801.
21. Khera AV, Cuchel M, De LL-M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 364: 127-135.
22. Favari E, Ronda N, Adorni MP, et al. ABCA1-dependent serum cholesterol efflux capacity inversely correlates with pulse wave velocity in healthy subjects. *J Lipid Res.* 2013; 54: 238-243.
23. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2383-2393.
24. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1529: 245-256.
25. Franceschini G, Maderna P, Sirtori CR. Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology. *Atherosclerosis.* 1991; 88: 99-107.
26. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, et al. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33398-33402.
27. Schwartz CC, VandenBroek JM, Cooper PS. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1594-1607.
28. Calabresi L, Gomaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1724-1731.
29. Kuvin JT, Ramet ME, Patel AR, et al. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J.* 2002; 144: 165-172.
30. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006; 98: 1352-1364.
31. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2001; 7: 853-857.
32. Nofer JR, van der GM, Tolle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004; 113: 569-581.
33. Pomerantz KB, Fleisher LN, Tall AR, et al. Enrichment of endothelial cell arachidonate by lipid transfer from high density lipoproteins: relationship to prostaglandin I2 synthesis. *J Lipid Res.* 1985; 26: 1269-1276.
34. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, et al. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 910-917.
35. Tamagaki T, Sawada S, Imamura H, et al. Effects of high-density lipoproteins on intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1996; 123: 73-82.
36. Van Sickle WA, Wilcox HG, Malik KU, et al. High density lipoprotein-induced cardiac pros-

- tacyclin synthesis in vitro: relationship to cardiac arachidonate mobilization. *J Lipid Res.* 1986; 27: 517-522.
37. Norata GD, Callegari E, Inoue H, et al. HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 871-877.
  38. Gomaschi M, Ossoli A, Pozzi S, et al. eNOS Activation by HDL Is Impaired in Genetic CETP Deficiency. *PLoS One.* 2014; 9: e95925.
  39. Oravec S, Demuth K, Myara I, et al. The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion. *Thromb Res.* 1998; 92: 65-71.
  40. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, et al. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1987-1994.
  41. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 238: 61-65.
  42. Xia P, Vadas MA, Rye KA, et al. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33143-33147.
  43. McGrath KC, Li XH, Puranik R, et al. Role of 3beta-hydroxysteroid-Delta 24 reductase in mediating antiinflammatory effects of high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 877-882.
  44. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, et al. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 1450-1455, 1998.
  45. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.* 2010; 21: 312-318.
  46. Garner B, Waldeck AR, Witting PK, et al. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem.* 1998; 273: 6088-6095.
  47. Shuhei N, Soderlund S, Jauhiainen M, et al. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids Health Dis.* 2010; 9: 104.
  48. Nofer JR, Remaley AT. Tangier disease: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 2150-2160.
  49. Brunham LR, Singaraja RR, Hayden MR. Variations on a Gene: Rare and Common Variants in ABCA1 and Their Impact on HDL Cholesterol Levels and Atherosclerosis. *Annu Rev Nutr.* 2006; 26: 105-129.
  50. van Dam MJ, de Groot E, Clee SM, et al. Association between increased arterial-wall thickness and impairment in ABCA1-driven cholesterol efflux: an observational study. *Lancet.* 2002; 359: 37-42.
  51. Asztalos BF, Brousseau ME, McNamara JR, et al. Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. *Atherosclerosis.* 2001; 156: 217-225.
  52. Oldoni F, Sinke RJ, Kuivenhoven JA. Mendelian disorders of high-density lipoprotein metabolism. *Circ Res.* 2014; 114: 124-142.
  53. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12: 121-128.
  54. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, et al. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest.* 1980; 66: 892-900.
  55. Weisgraber KH, Bersot TP, Mahley RW, et al. A-IMilano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J Clin Invest.* 1980; 66: 901-907.
  56. Franceschini G, Baio M, Calabresi L, et al. Apolipoprotein A-I<sup>Milano</sup>. Partial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency due to low levels of a functional enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1990; 1043: 1-6.
  57. Franceschini G, Sirtori CR, Bosisio E, et al. Relationship of the phenotypic expression of the A-IMilano apoprotein with plasma lipid and lipoprotein patterns. *Atherosclerosis.* 1985; 58: 159-174.
  58. Franceschini G, Frosi TG, Manzoni C, et al. High density lipoprotein-3 heterogeneity in subjects with the apo-AIMilano variant. *J Biol Chem.* 1982; 257: 9926-9930.
  59. Favari E, Gomaschi M, Zanotti I, et al. A unique protease-sensitive high density lipoprotein particle containing the apolipoprotein A-IMilano dimer effectively promotes ATP-binding cassette A1-mediated cell cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2007; 282: 5125-5132.
  60. Calabresi L, Simonelli S, Gomaschi M, et al. Genetic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2012; 222: 299-306.
  61. Calabresi L, Pisciotta L, Costantin A, et al. The

- molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1972-1978.
62. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, et al. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res.* 2007; 48: 592-599.
  63. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, et al. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990; 323: 1234-1238.
  64. Calabresi L, Nilsson P, Pinotti E, et al. A novel homozygous mutation in CETP gene as a cause of CETP deficiency in a caucasian kindred. *Atherosclerosis.* 2009; 205: 506-511.
  65. Yamashita S, Maruyama T, Hirano K, et al. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 2000; 152: 271-285.
  66. Cefalu AB, Noto D, Magnolo L, et al. Novel mutations of CETP gene in Italian subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 2009; 204: 202-207.
  67. Franceschini G, Calabresi L, Chiesa G, et al. Increased cholesterol efflux potential of sera from ApoA-IMilano carriers and transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1257-1262.
  68. Calabresi L, Favari E, Moleri E, et al. Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis.* 2009; 204: 141-146.
  69. Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res.* 2007; 48: 2453-2462.
  70. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115: 1285-1295.
  71. Calabresi L, Gomasaschi M, Villa B, et al. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 656-661.
  72. Bisioendial RJ, Hovingh GK, Levels JH, et al. Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation.* 2003; 107: 2944-2948.
  73. Gomasaschi M, Baldassarre D, Amato M, et al. Normal vascular function despite low levels of high-density lipoprotein cholesterol in carriers of the apolipoprotein A-I (Milano) mutant. *Circulation.* 2007; 116: 2165-2172.
  74. Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R, et al. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial function in hyperlipemia. *Metabolism.* 2003; 52: 1191-1195.
  75. Daniil G, Phedonos AA, Holleboom AG, et al. Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 1213-1220.
  76. Holleboom AG, Daniil G, Fu X, et al. Lipid oxidation in carriers of lecithin: cholesterol acyltransferase gene mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 3066-3075.
  77. Goyal J, Wang K, Liu M, et al. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem.* 1997; 272: 16231-16239.
  78. Chantepie S, Bochem AE, Chapman MJ, et al. High-Density Lipoprotein (HDL) Particle Subpopulations in Heterozygous Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Deficiency: Maintenance of Antioxidative Activity. *PLoS One.* 2012; 7: e49336.
  79. Sirtori CR, Calabresi L, Franceschini G, et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I<sub>Milano</sub> mutant. The Limone sul Garda Study. *Circulation.* 2001; 103: 1949-1954.
  80. Hovingh GK, Brownlie A, Bisioendial RJ, et al. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44: 1429-1435.
  81. Roma P, Gregg RE, Meng MS, et al. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A-I, apo A-I<sub>Milano</sub>, associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1445-1452.
  82. Holleboom AG, Jakulj L, Franssen R, et al. In vivo tissue cholesterol efflux is reduced in carriers of a mutation in APOA1. *J Lipid Res.* 2013; 54: 1964-1971.
  83. Ayyobi AF, McGladdery SH, Chan S, et al. Lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency and risk of vascular disease: 25 year follow-up. *Atherosclerosis.* 2004; 177: 361-366.
  84. Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, et al. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation.* 2005; 112: 879-884.
  85. Calabresi L, Baldassarre D, Castelnuovo S, et al. Functional lecithin: cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans. *Circulation.* 2009; 120: 628-635.
  86. Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16: 139-145.