



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Hiperkolesterolemia Familiarra:
PCSK9 aldaeren karakterizazioa
tratamendu pertsonalizaturako**

*Asier Larrea, Shifa Jebari,
Unai Galicia, Rocio Alonso,
Asier Benito-Vicente, B. Kepa Uribe
eta Cesar Martin*

76-83 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.10>



Hiperkolesterolemia Familiarra: PCSK9 aldaeren karakterizazioa tratamendu pertsonalizaturako

Larrea, Asier¹; Jebari, Shifa¹; Galicia, Unai¹; Alonso, Rocio¹; Benito-Vicente,
Asier¹; Uribe B. Kepa¹; Martin, Cesar¹

¹*Biofisika unitatea (CSIC, UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila,
UPV/EHU*

asierlarrea@yahoo.es

Laburpena

Gaixotasun kardiobaskularrak mundu mailan heriotza gehien sortzen dituzten arrazoiak dira, gehienbat bizimodu ez osasuntsuagatik. Hala ere, badaude banako batzuk zeintzuek arrazoi genetikoek erruz pairatzen dituzten, Hiperkolesterolemia Familiarra (HF) izeneko gaixotasun autosomiko gainartzaile bat izanik. 3 geneetan gertatzen dira aldaerak batez ere: *LDLR*, *ApoB* eta *PCSK9*. Aldaeren identifikazioa, mekanismoa ezartzea eta tratamendua sortzea oso zaila da, baina beharrezkoa gaixotasunaren aurka egiteko. Ikerketa honen helburua funtzio-irabaztea duten 7 *PCSK9* aldaeren karakterizazio funtzionala era ziur eta erraz batean egitea ahalbidetzen duen metodologia bat sortzea izan da, tratamendu pertsonalizatua emateko. Horretarako, *PCSK9*-ren polimorfismo ohikoenak karakterizatu dira sakonki.

Hitz gakoak: Hiperkolesterolemia Familiarra, *PCSK9*, *LDLR*, *ApoB*

Abstract

Cardiovascular diseases are the main worldwide reason of death, especially due to non-healthy lifestyle. However, there are some individuals that suffer from it due to genetic reasons, having an autosomic dominant disease called Familial Hypercholesterolemia (FH). Mutations occur mostly in 3 genes: LDLR, ApoB and PCSK9. The identification, the stablishing of the mechanism and developing of treatment are very difficult processes, but they are necessary to face up the disease. The goal of this research is to set up an easy and reliable methodology to functionally characterize the activity of PCSK9 gain of function variants in order to provide a personalized treatment. Therefore, we have extensively characterized the seven more common gain-of-function PCSK9 variants.

Key words: Familial Hypercholesterolemia, PCSK9, LDLR, ApoB

1. Sarrera eta motibazioa

Gaixotasun kardiobaskularrak mundu mailan heriotza arrazoi nagusiak dira, 2016 urtean ia 16 milioi hildako utzita, Munduko Osasun Erakundearen (MOE) arabera. Bihotz eta odol hodietan kolesterola pilatzean, odolaren fluxua eten daiteke, bihotzekoak izateko aukerak handituz. Afekzio hauek bizimoduarekin erlazioa izan dezakete, eta kirola eginez edo janari osasuntsuagoa janez kolesterol mailak jaitسي daitezke (Ness eta Powles, 1997). Hala ere,

batzuetan kolesterol maila altuaren arrazoia ez dagokio bizimoduari, geneei baizik. Banako batzuek gene zehatz batzuetan aldaketak dituzte, aldaera deiturikoak, eta odolean kolesterol gehiago izatea ekarri dezake, Hiperkolesterolemia Familiarra (HF) izeneko gaixotasuna pairatuz. HF duten pertsonak tendoietako xantoma, zahartzaroko arkuak edo arterosklerosia izaten dute (Lopez, 2008).

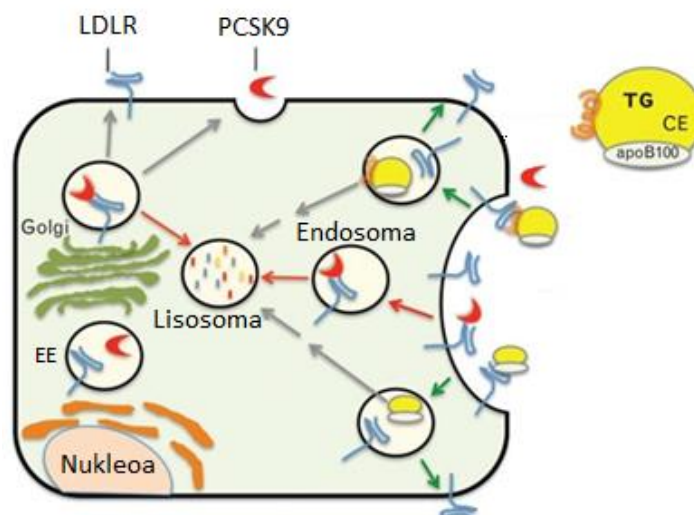
Gaitz hau izatea oso ohikoa da, 250 pertsonako 1-ek izanik (MOE), eta nahiz eta ondo jan edota kirola egin, banako hauek kolesterol maila altuak dituzte. HF izatearen errua aldatutako geneek sorturiko proteinena da, batez ere hirurena: *LDLR*, *ApoB* eta *PCSK9*.

LDLR (ingelesez, *Low-Density Lipoprotein Receptor*) odoleko kolesterola hartzeko erabiltzen den proteina da, energia behar duten zelulek elikagai bezala erabiltzeko. Kolesterola *LDL* (ingelesez, *Low-Density Lipoprotein*) molekuletan agertzen da, proteina eta beste lipido batzuekin batera. *LDLR* zelulen mintzean dago, *LDL* ezagutu, batu eta zelula barnean sartzen dira. Bertan, endosomataro doaz, non hartzaileak konformazio aldaketa bat jasan eta *LDL* askatzen duen, hau desegiteko, *LDLR*-a mintzera doan bitartean (*LDLR*-an aldaera daukatenen maiztasuna 1:500 da). Aldaera patogenoa izatekotan, zelulak ez dira gai kolesterola hartzeko eta odolean pilatzen da.

ApoB (ingelesez, *Apolipoprotein B*) *LDL*-etan kolesterolarekin batera dagoen molekula bat da, eta *LDLR*-ekin batzen da barneratua izateko. Kasu honetan ere, proteina honen genean aldaerarik egotekotan, ezingo da barneratu zelulan (*ApoB*-an aldaera daukatenen maiztasuna 1:1000 da).

Azkenik *PCSK9* (ingelesez, *Pro-protein Convertase Subtilisin-Kexin type 9*) dago (*PCSK9*-an aldaera daukatenen maiztasuna 1:2500 da). Proteina hau *LDLR*-ri batzen zaio eta behin endosoman, ez dio uzten konformazio aldaketa jasaten, honen degradazioa eraginez. Beraz, proteina hau funtzio irabaztea izatea eragiten duen aldaerarik badauka, HF izateko arriskua dago (Soutar eta Naoumova, 2007) (1. Irudia).

1. irudia. *LDLR*, *LDL* eta *PCSK9*-ren zikloa zelulan.



Duela gutxi hasi zen *PCSK9*-en funtzioa eta aktibitatea aztertzen, eta arrazoi horregatik gutxien ezagutzen den HF eragilea da. Gehien bat gibelean sortzen da, eta kolesterolaren zikloarekin duen loturagatik ezagutzen da. Oso proteina berezia da dituen hainbat ezaugarriengatik:

4 domeinuz osatua dago, seinale sekuentzia (nora joan behar ezartzen duena), prodomeinua, domeinu katalitikoa eta C-terminaleko domeinua. Proteina sortzean erretikulu endoplasmatikora doa, non prodomeinua mozten zaion, auto-mozketa izeneko prozesuan. Honek ez luke eraginik izan beharko, bere aktibitatea domeinu katalitikoan aurkitzen delako, baina prodomeinua berriz ere lotzen da proteinara, gune hori estaliz eta proteasa aktibitatea inaktibatuz. Azkenik, furina izeneko beste proteina batek bigarren mozketa bat eragin dezake zelulatik kanpo, proteina guztiz inaktibatuz (Cunningham *et al*, 2007).

PCSK9 LDLR-ri batzeko ezinbestekoa da prodomeinua askatzea eta domeinu katalitikoa estaltzea. Hala ere, nahiz eta LDLR-ren degradazioan parte hartzen duen, PCSK9-k bere sorreran ere laguntzen du (Strøm *et al*, 2014). Ezaugarri hauengatik, PCSK9-k era ezberdinetan eragin dezake kolesterolaren pilaketa: LDLR gutxiago sortzea eraginez, afinitate handiagoz batzea LDLR-ri edota PCSK9 gehiago jariatzea (Horton *et al*, 2008).

Gaixotasuna aldaera bati dagokion jakitea oso zaila da, aurretik hainbat froga egin behar direlako, eta aldaera bakoitzak zer eragin duen ezartzea zailagoa oraindik, hauek banan-banan aztertu beharra sortuz. Nahiz eta PCSK9 maiztasun txikiena duen mutatuko proteina izan, oso ikerketa gutxi egin dira honen inguruan, eta tratamendua zailagoa da arrazoi horregatik. Gainera, aldaera bakoitzak mekanismo ezberdin bidez eragiten du gaixotasunean, konponbide ezberdinak erabili beharra sortuz kasu bakoitzerako.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Gaur egun HF detektatzeko odoleko analisiak egiten dira batez ere, kolesterol maila neurtzeko. Teknika hau ez da oso zehatza, hainbat faktorek eragiten dutelako kolesterolean. Gainera, behin HF duela esan ondoren, zer proteinatan dagoen aldaera jakin behar da, eta azkenik aldaerak zer eragin daukan. PCSK9-ren kasuan erabiltzen den tratamendua anti-PCSK9 antigorputzak dira, odolean zehar dagoen proteina inaktibatuz. Hala ere, PCSK9 aldaera batzuek zelula barnean daukate eragina, odolera irten aurretik, eta tratamendu hori ez zen erabilgarria izango (Zhang *et al*, 2015).

Lan honen helburua PCSK9 aldaeren karakterizazioa errazten duen metodologia bat ezartzea da, gaixotasun hau duten banakoen identifikazioa erraztuz eta bakoitzari tratamendu eraginkorrago eta pertsonalizatuago bat sortzea ahalbidetuz. Horretarako PCSK9-ren mekanismoa ezarri behar da, 3 ezaugarri ezberdin aztertuz

1. PCSK9-ren prozesamendua eta jariaketa maila
2. LDLR-ren adierazpena
3. LDL barneraketa

3. Ikerketa muina

3.1. PCSK9-ren adierazpena eta purifikazioa

PCSK9 aldaeren DNA sekuentzia HF pairatzen zuten pazienteen sekuentziaziotik lortu zen, ondoren plasmidoetan sartzeko. HEK293 zelulak transfektatu ziren plasmidoekin, proteina sortu zezaten. Zelula lerro hau giza giltzurrunetik dator, eta ez du PCSK9 propiorik sortzen, beraz, lortutako proteina guztiak aldaera izango du. Transfektatu gabeko eta PCSK9 aldaera ezberdinak zituzten 8 plasmidoekin transfektatuko zelulak erabili ziren.

Ondoren PCSK9-ren adierazpena handitzea eragin zen, medio xehe bat erabilita. Egoera horrek zelulek LDLR-a sortzea eragin zuen, baina horrekin batera PCSK9 jariatzea eragin zen. PCSK9-ren jariaketak medioa proteina horretan aberatsa izatea eragin zuen eta bertatik purifikatu zen PCSK9 afinitate kromatografia bidez, beranduago zitometria frogatan erabiltzeko.

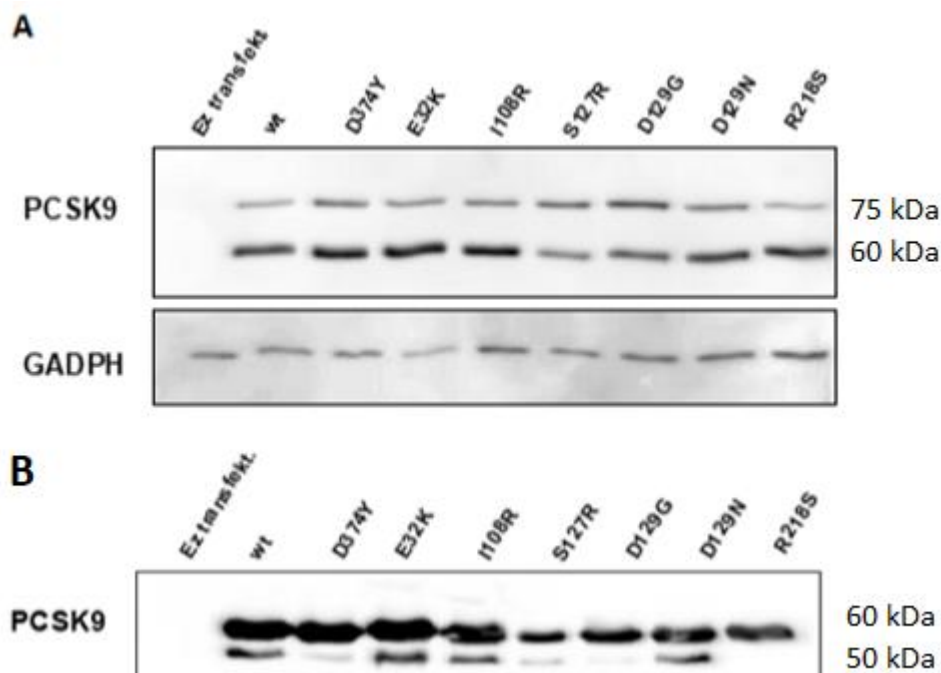
3.2. PCSK9-ren prozesamendua eta jariaketa

Behin PCSK9 lortzeko gai ginela ikusita, aldaera bakoitzaren eragina aztertu zen. Proteina era berean sortu zen, zelulak transfektatuz eta medio xehea jarriz, baina gero ez zen purifikatu. PCSK9 aldaeren eragina ikusteko, lehenengo proteinaren prozesamendua eta jariaketa mailak neurtu ziren, prozesamendua prodomeinuaren mozketak izanik. Prozesatu gabeko proteina ez denez zelulatik irtetzen, zelulak zeuden medioaz gain, zelulen barnea ere aztertu zen.

Hasteko, medioa hartu zen, aurreko pausuan bezala, baina ez zen purifikatu, PCSK9 aldaerek proteina gehiago edo gutxiago sortzen zuten ikusteko. Zuzenean Western blot bat egin zen 9 laginekin, transfektatu ez zen lagina eta GAPDH proteina konstitutiboa erabiliz kontrol bezala (**2. Irudia, A**). Ondoren, zelulak hartu eta sonikazio bidez lisatu ziren, gero zentrifugatu eta zelula hondakinak baztertzeke. Berriz ere, Western blot bidez analizatu ziren laginak (**2. Irudia, B**).

2. Irudiko A atalean PCSK9 aldaerek prozesamendu eta jariaketan daukaten eragina ikusten da. S127R eta D129G kasuetan izan ezik, 60 kDa-tako banda 75 kDa-takoa baina handiago da, bi aldaera horietan proteina ez dela ondo prozesatzen erakutsiz. Gainera, prozesatzen ez den PCSK9 ezin da jariatua izan, eta **2. Irudiko B atalean** bi aldaera horien medioan proteina gutxiago dagoela ikusten da. Bestalde, D374Y eta R218S aldaerek 50 kDa-tako banda txikiagoa daukate, furinarekiko erresistentzia erakutsiz. Azkenik, E32K aldaerak jariaketa maila handiagoa dutela nabari da.

2. irudia. HEK293 zelulen lisatuaren (A) eta medioaren (B) PCSK9 detekzioa Western blot bidez.



3.3. PCSK9-ren eraginaren azterketa zitometria bidez

Prozesamendua eta jariaketa datuak lortu ondoren, LDL barneraketa eta LDLR adierazpena aztertu ziren. Horretarako PCSK9-ren eragina zelulatan ikusi behar zen, zitometria bidez. Teknika hau fluoreszentzia neurtzeko gai denez, esperimentu honetarako fluoreszentea zen FITC-rekin markatu ziren LDL molekula eta LDLR-ren aurkako antigorputzak.

Bi zelula lerro erabili ziren: Aurretik azaldutako HEK293, zeinak PCSK9 aldaerak plasmidoan zituen, eta HepG2, giza gibelesko minbizi zelula. Zelula hauek PCSK9 sortzeko gaitasuna dute, plasmidirik gabe, baina denek andui basatia sortzen dute. Beraz, HepG2 zelulei kanpotik gehitu zitzaizkien PCSK9 aldaerak, aurretik purifikatutakoak, eta kontrolarekin konparatuz hauen eragina bakarrik aztertu zen.

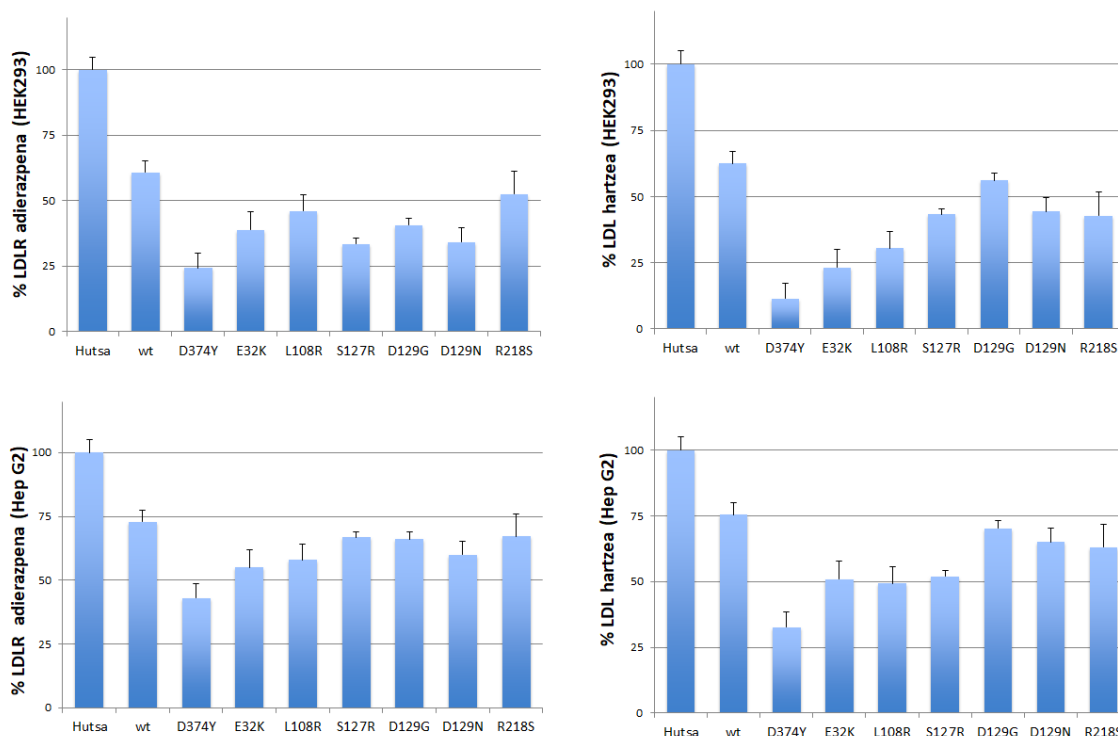
3.3.1. LDL barneraketa

HepG2 zelulei purifikatutako PCSK9 gehitu ondoren ordu erdiz inkubatu ziren, eragina izan zezan, eta gero bi zelula motei FITC zeukan LDL gehitu zitzaizkien mediora. Bi orduz inkubatu ziren, LDL-a barneratua izan zedin, eta gero Tripkan urdina gehitu zitzaizkien zelulei. Molekula honek FITC-aren eragina deuseztatzen du, baina ez dauka eraginik zelula barnean, kanporatua izaten delako. Beraz, kanpoan geratu zen LDL-a ez zen kontutan hartu, bakarrik barneratua izan zena (**3 Irudia, A eta B**).

3.3.2. LDLR adierazpena

Froga hau aurrekoa bezala hasi zen, HepG2 zelulei PCSK9 aldaerak gehituz kanpotik. Hala ere, gero zelulak paraformaldehidoarekin fixatu ziren, momentu horretatik aurrera LDLR gehiago ez sortzeko. Ondoren LDLR-ren aurkako antigorputz primarioak gehitu zitzaizkien, LDLR-ri batu zirenak espezifikoak, azkenik FITC-rekin markatutako antigorputz sekundarioak gehitzeko, primarioak ezagutzen zituztenak. (**3 Irudia, C eta D**).

3. irudia. HEK293 eta HepG2 zelulatan PCSK9-ren eragina ikusteko eginiko zitometria frogak. (A) HEK293 zelulatan LDLR adierazpena. (B) HEK293 zelulatan LDL barneraketa. (C) HepG2 zelulatan LDLR adierazpena. (D) HepG2 zelulatan LDL barneraketa.



3. irudia. Aztertuz aldaerak talde ezberdinetan banatu daitezke. Lehendabizi, D374Y, E32K eta L108R, zeintzuek seinale gutxiago daukaten LDL hartzean LDLR sorreran baino, bai HepG2 zein HEK293 zelulatan. Bigarren taldean S127R eta D129G daude, kasu honetan alderantzizko eragina izanik HEK293 zeluletan eta andui basatiaren eragina izanik HepG2 zeluletan. Azkenik, D129N eta R218S aldaerak daude, bitarteko erantzun bat izanik.

3.4. Eztabaida

Lortutako emaitza guzti hauekin PCSK9 aldaera bakoitzaren mekanismoa aztertu dugu eta bat datoz orain arte bibliografian argitaturako datuekin. Gure metodologiak erakusten duen moduan, **D374Y**, (Pandit *et al*, 2015), **E32K** (Noguchi *et al*, 2010) eta **L108R** (Abifadel *et al*, 2012) aldaerek LDLR-kiko afinitatea handitzen zuten. Gainera, aldaeren adierazpena aztertzeak, E32K aldaerak gehiago jariatzen duela erakutsi du, azpimarratuz bere GOF aktibitatea.

Western blot eta zitometria bidez, baieztatu dugu **S127R** (Cameron *et al*, 2005) eta **D129G** (Homer *et al*, 2008) aldaerek sorkuntza prozesuan arazoak dituztela, beraz, ez dira ondo prozesatzen ezta jariatzen. Akats honek LDLR-ren sorreran laguntzea ekiditen du, sorrera maila txikituz baina afinitatea aldatu gabe. Mekanismo honen bidez, aldaera hauek HF sorrarazten dute.

R218S-ren kasuan, polimorfismo honek furinarekiko erresistentzia ematen diola ikusi dugu. Honek PCSK9 funtzional gehiago egotea eragiten du, nahiz eta gehiago ez jariatatu edota afinitatea handiagoa izan (Glerup *et al*, 2017).

Azkenik, **D129N**-ren inguruan lorturiko emaitzak ez datoz bat mekanismo ohikoenekin. Barne zein kanpo eragina duela dirudi polimorfismo honek (Fasano *et al*, 2009), baina orain arte ez da era egokian karakterizatu. Beraz, guk sortutako metodologiak lan horretan laguntzea espero dugu.

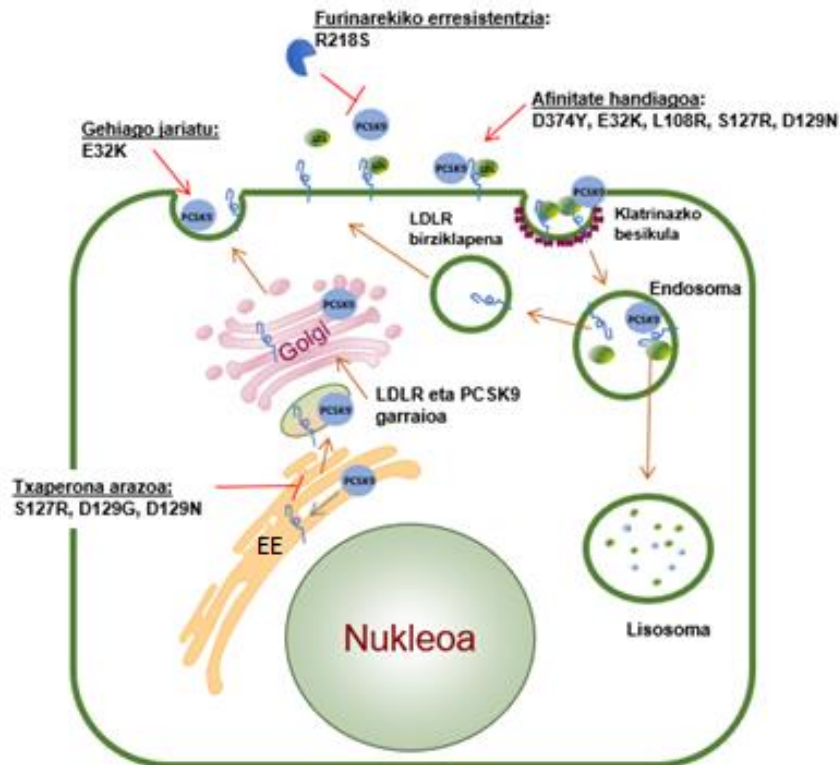
PCSK9 aldaera bakoitzaren mekanismoa **4. Irudian** laburbiltzen da.

Gaur egungo tratamendua anti-PCSK9 antigorputzak erabiltzean oinarritzen da, odolean dauden proteinak inaktibatuz. Hala ere, tratamendu horrek ez du eraginik barne eragina duten PCSK9 aldaeretan, S217R eta D129G esaterako, eta beste konponbide bat aurkitu beharko litzakete. Nahiz eta esparru hori lanaren helburu ez izan, behar bada txaperona edo LDLR-ren prozesamenduan laguntzen duen konposaturen bat eman beharko zen kasu hauetan. Era berean, ez da berdina PCSK9 gehiago jariatzea edo afinitate handiagoz lotzea LDLR-ri: Gehiago jariatzen bada, odoleko PCSK9 kontzentrazioaren arabera tratamenduaren dosia handitu beharko zen. Aldiz, afinitate handiagoz lotzen bada LDLR-ra, beste polimorfismoak baina eragin handiagoa izango du molekula bakoitzak, beraz, dosia handitu beharko zen ere, nahiz eta odoleko PCSK9 kontzentrazioa txikiagoa izan.

Gainera, nahiz eta lan honetan ikertutako PCSK9 aldaera gehienak deskribatuak egon, ez dute metodologia berdina eta zehatza jarraitu kasu denetan. Metodo zientifikoak dio emaitzak alderagarriak izateko era berean lortu behar izan direla, eta lan honetan proposaturako teknikek hori balioztatzen dute.

Guzti honekin, lan honetan PCSK9-ren aldaera garrantzitsuenen karakterizazioa ahalbidetzen duen teknika estandarizatu bat sortu eta proposatzen da. Jada deskribatuak zein aldaera berriak aztertu dira, hiperkolesterolemia sortzeko mekanismoaren arabera sailkatuz eta tratamendu espezifikoak erabiltzeko aukera emanez.

4. irudia. Aztertutako PCSK9 aldaeren mekanismoen eskema. 5 mekanismo nagusi aurkitu dira: Txaperona arazoa, LDLR sortzea zailduz; PCSK9 gehiago jariatzea; Furinarekiko erresistentzia, aktibo den PCSK9 kopurua handituz; Afinitate handiagoa, LDLR-ri modu errazago batean barneratuz.



4. Ondorioak

Lorturiko emaitzek PCSK9 aldaeren akzio mekanismoen aniztasuna erakusten dute, modu erraz eta esanguratsu batean. Bakoitzak era ezberdinean eragiten du HF-ren hedapenean, eta bakoitza modu zehatzean tratatu beharko zen. Gaur egungo medikamentuek ez dute aldaera guztien aurka balio, eta tratamendu bereziak erabili beharko ziren beraien aurka. Hala ere, horretarako aurreko analisi bat behar da, eta teknika hauek jarraituz egin daitekeela uste eta proposatzen dugu.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Bi norabide edo helburu ezberdin ditugu: PCSK9 aldaera gehiago karakterizatzea, datu base handiago bat izateko eta akzio mekanismoak errazago ulertzeko; Bestalde, mekanismo ezberdinak dituzten aldaeren aurkako medikamentu edo tratamenduak sortzea. Orain arte kanpo eragina duten aldaeren aurkako medikamentuak daude, baina argi geratu da barne eragina dutenen kaltea ez zela horrela konponduko. Behar bada LDLR-ren prozesamenduan lagunduko lukeen proteina bat (txaperona) izan daiteke konponbidea, baina ikerketa asko egin behar da arlo honetan.

6. Erreferentziak

- Abifadel, M. *et al* (2012). Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 223(2), 394–400.
- Cameron, J., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., & Leren, T. P. (2006). Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum. Mol. Genet.*, 15(9), 1551–1558.
- Cunningham, D. *et al* (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14(5), 413–419.
- Fasano, T., Sun, X. M., Patel, D. D., & Soutar, A. K. (2009). Degradation of LDLR protein mediated by “gain of function” PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis*, 203(1), 166–171.
- Glerup, S., Schulz, R., Laufs, U., & Schlüter, K. D. (2017). Physiological and therapeutic regulation of PCSK9 activity in cardiovascular disease. *Basic Res. Cardiol.*, 112(3).
- Ness, A. R., & Powles, J. W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26(1), 1–13.
- Lopez, D. (2008). PCSK9: An enigmatic protease. *BBA-Mol. Cell Biol. L.*, 1781(4), 184–191
- Soutar, A. K., & Naoumova, R. P. (2007). Mechanisms of disease: Genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 4(4), 214–225.
- Homer, V. M. *et al* (2008). Identification and characterization of two non-secreted PCSK9 mutants associated with familial hypercholesterolemia in cohorts from New Zealand and South Africa. *Atherosclerosis*, 196(2), 659–666.
- Horton, J. D., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2007). Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 32(2), 71–77.
- Noguchi, T., *et al* (2010). The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. *Atherosclerosis*, 210(1), 166–172.
- Pandit, S. *et al* (2008). Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.*, 49(6), 1333–1343
- Strøm, T. B., Tveten, K., & Leren, T. P. (2014). PCSK9 acts as a chaperone for the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 457(1), 99–105.
- Zhang, X.-L. *et al* (2015). Safety and efficacy of anti-PCSK9 antibodies: a meta-analysis of 25 randomized, controlled trials. *BMC Medicine*, 13(1).