

## IL GENE PCSK9: UN NUOVO GENE IMPLICATO NEL CONTROLLO DELLACOLESTEROLEMIA

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

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

*[The PCSK9 gene: a new gene controlling cholesterolemia]*

### RIASSUNTO

La distribuzione dei livelli plasmatici di colesterolo è regolato da interazioni complesse tra geni e fattori ambientali.

Mutazioni del gene PCSK9 sembrano modulare i livelli di LDL-C. Sono note mutazioni con guadagno di funzione associate ad ipercolesterolemia e mutazioni con perdita di funzione che determinano ipocolesterolemia.

**Parole chiave:** Ipercolesterolemia, ipocolesterolemia, PCSK9, mutazioni

### SUMMARY

*The distribution of cholesterol plasma is regulated by complex interactions between genes and environmental factors. Mutations of PCSK9 gene seem to modulate the levels of LDL-C. Mutations of PCSK9 gene with gain of function are associated to hypercholesterolemia and mutations with loss of function determine hypocholesterolemia.*

**Key words:** Hypercholesterolemia, hypocholesterolemia, PCSK9, mutations

### Introduzione

La distribuzione dei livelli plasmatici di colesterolo è regolato da interazioni complesse tra geni e fattori ambientali.

Un importante contributo per identificare i fattori genetici è derivato dallo studio di disordini monogenici caratterizzati da marcate variazioni della colesterolemia dovute a variazioni dei livelli di LDL-C (definiti iper- ed ipo-colesterolemie primitive).

### Ipercolesterolemie monogeniche a trasmissione co-dominante

Le ipercolesterolemie monogeniche a trasmissione co-dominante comprendono un gruppo geneticamente eterogeneo di disordini caratterizzati da un aumento dei livelli di LDL-C.

Esse possono essere causate da mutazioni:

- nel recettore delle LDL (LDL-R) con conseguente ridotta captazione e catabolismo cellulare delle LDL plasmatiche (Ipercolesterolemia Familiare - tipo 1, FH-1);

- nel gene per l'apolipoproteina B-100 (apoB-

100) con sintesi di un'apoB-100 difettiva incapace di legare l'LDL-R (ApoB Familiare Difettiva, FH tipo 2, FH-2);

- nel gene del PCSK9 con alterazione della funzione dell'enzima proteolitico PCSK9 ( FH-tipo 3, FH-3).

Nel 2003 Abifadel et al<sup>(1)</sup>, hanno identificato, in famiglie francesi con diagnosi clinica di FH, un locus sul cromosoma 1 associato a ipercolesterolemia. In questa regione sono state identificate alcune mutazioni in un nuovo gene denominato PCSK9.

Le due mutazioni del gene PCSK9 trovate nelle famiglie francesi, consistevano in sostituzioni aminoacidiche non conservative: serina 127 arginina (S127R) e fenilalanina 216 leucina (F216L). In seguito sono state identificate altre rare mutazioni missenso in pazienti con ipercolesterolemia tipo FH-3, identificati in vari paesi<sup>(2,5)</sup>.

In Italia sono state descritte due nuove mutazioni missenso del gene PCSK9, (arginina 496 triptofano, R496W e asparagina 425 serina, N425S) in due pazienti con diagnosi clinica di FH-1 omozigote che sono risultati portatori anche di mutazioni del gene LDL-R (doppia eterozigosi per mutazioni dei geni LDL-R e PCSK9)<sup>(6)</sup>.

### **Ipocholesterolemie monogeniche a trasmissione co-dominante**

Le ipocolesterolemie monogeniche sono generalmente dovute ad una riduzione dei livelli di colesterolo, LDL-C e di apoB. Il termine ipobetalipoproteinemia (HBL) è usato come sinonimo di ipocolesterolemia, ad indicare ridotti livelli di betalipoproteine (LDL).

La HBL primitiva è dovuta a difetti genetici che riducono la secrezione di lipoproteine contenenti apoB nel fegato e nell'intestino<sup>(7)</sup>, un concetto che, tuttavia, deve essere rivisto alla luce della scoperta del gene PCSK9 (vedi oltre). Il prototipo di HBL monogenica è l'ipobetalipoproteinemia familiare (FHBL), un disordine co-dominante caratterizzato da livelli plasmatici di LDL-C ed apoB inferiori al 5° percentile<sup>(7)</sup>.

La FHBL può essere legata al gene apoB o indipendente da esso. La FHBL meglio caratterizzata è quella identificata in famiglie in cui il fenotipo HBL co-segrega con mutazioni del gene apoB. La maggior parte delle mutazioni del gene apoB determina l'inserimento di codoni di stop prematuri nell'mRNA, con formazione di apoB troncate di dimensioni variabili da apoB-2 ad apoB-89 (cioè dal 2% all'89% delle dimensioni dell'apoB-100 normale, secondo la nomenclatura in centili). In alcune famiglie l'FHBL non co-segrega con il gene apoB ma con altri loci (es. cromosoma 3p21)<sup>(7)</sup>.

E' verosimile, quindi, che il fenotipo HBL derivi da mutazioni di altri geni candidati non ancora identificati. Recenti osservazioni hanno evidenziato che mutazioni di PCSK9 possono essere responsabili di ipobetalipoproteinemia (vedi oltre).

### **Il gene PCSK9**

Il gene PCSK9 è localizzato sul cromosoma 1p33-p34.3, è costituito da 12 esoni e si estende per 22 Kb. Codifica per una glicoproteina di 692 aminoacidi, espressa principalmente nel fegato, nelle cellule mesenchimali renali, nell'epitelio intestinale, oltre che nel tessuto nervoso<sup>(8,9)</sup>.

PCSK9 (proteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9) è una proteina convertasi della famiglia delle proteasi<sup>(10)</sup>.

Nel fegato il gene PCSK9 è regolato dai livelli intracellulari di colesterolo. Il promotore del gene PCSK9 contiene elementi responsivi agli steroli e la sua trascrizione è ridotta in presenza di elevati livelli di colesterolo e viceversa stimolata da ridotti

livelli di colesterolo, grazie l'intervento dei fattori di trascrizione SREBP1a e SREBP2 (sterol regulatory element-binding proteins)<sup>(11)</sup>.

### **Mutazioni nel gene PCSK9**

Mutazioni del PCSK9 sembrano modulare i livelli di LDL-C plasmatico influenzando l'espressione sulla membrana plasmatica dell'LDL-R. Sono note mutazioni missenso con guadagno di funzione di PCSK9 (Gain of Function) associate ad aumento di LDL-C plasmatici e ipercolesterolemia e mutazioni nonsense con perdita di funzione (Loss of Function) che determinano riduzione dell'LDL-C plasmatico e si associano ad ipocolesterolemia.

### **Mutazioni con guadagno di funzione (Gain of Function) del gene PCSK9 e ipercolesterolemia**

Studi in vitro e in modelli animali suggeriscono che alcune mutazioni missenso del gene PCSK9 conferiscono un "guadagno di funzione" all'enzima.

Topi che sovra-esprimono PCSK9 "wild-type" o mutanti di PCSK9 identificati nei pazienti FH-3 presentano un raddoppio dei livelli di colesterolo totale per incremento specifico di 5 volte di LDL-C.<sup>(11,12)</sup>

L'incremento dei livelli di LDL-C sembrano dipendere da un meccanismo mediato dall'LDL-R poichè l'over-espressione del PCSK9 in topi knock-out per l'LDLR non si associa all'incremento dei livelli di LDL-C<sup>(11,12)</sup>.

Comunque l'esatto meccanismo con cui PCSK9 degrada l'LDL-R deve ancora essere determinato.

Considerati i risultati finora ottenuti si può affermare che PCSK9 interviene nel modulare l'attività dell'LDL-R; le mutazioni missenso che conferiscono un guadagno di funzione potrebbero esagerare questa funzione fisiologica dell'enzima, portando a ulteriore riduzione dell'attività dell'LDL-R e quindi al manifestarsi dell'ipercolesterolemia

### **Mutazione con perdita di funzione (Loss of Function) del gene PCSK9 e ipocolesterolemia**

Recenti osservazioni hanno evidenziato che alcune mutazioni di PCSK9 sono causa di ridotti livelli plasmatici di LDL-C.

In uno studio di popolazione (Dallas Heart Study) sono state identificate due mutazioni nonsense di PCSK9 (tirosina 142 stop, Y142X e cistei-

na 679 stop, C679X) che determinano la formazione di proteine PCSK9 tronche, prive di funzione, rispettivamente di 141 e 678 amino acidi.

Tali mutazioni erano presenti nel 2-3% di soggetti Afro-Americani, che avevano ridotti livelli di LDL-C rispetto agli individui non portatori appartenenti alla stessa popolazione. La riduzione dei livelli di LDL-C presenti nei portatori di Y142X e C679X (40% dei livelli normali) è simile a quelli riscontrati nella FHBL classica dovuta a mutazioni del gene apoB. Le due mutazioni nonsense sono molto rare in Americani di origine Europea<sup>(13,14)</sup>.

In altri studi di popolazione è emerso che alcune sostituzioni aminoacidiche non-conservative di PCSK9 (es. arginina 46 leucina, R46L, leucina 253 fenilalanina L253F, ed alanina 443 treonina A443T) sono più frequenti in soggetti ipocolesterolemici, sebbene l'effetto di queste varianti sui livelli di LDL-C (riduzioni da 3.5% a 30%) sia meno marcato di quello delle mutazioni nonsense di cui sopra<sup>(14,15)</sup>.

Recentemente una nuova mutazione nonsense responsabile di FHBL è stata identificata in soggetti Caucasic<sup>(16)</sup>.

Infine, topi con inattivazione del gene PCSK9 (PCSK9<sup>-/-</sup>) hanno una sostanziale riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo con pressochè totale assenza di LDL-C ed apoB nel plasma<sup>(17)</sup>. Il meccanismo alla base dell'effetto ipocolesterolemmizzante di queste mutazioni di PCSK9 non è completamente chiarito.

### Ruolo di PCSK9 come maggiore determinante genetico dei livelli di colesterolo plasmatico

Varianti del PCSK9 possono contribuire alle variazioni dei livelli plasmatici di LDL-C. Shioji et al<sup>(18)</sup> hanno studiato gli effetti di varianti comuni del PCSK9 sui livelli di colesterolo in una larga coorte rappresentativa della popolazione generale in Giappone; hanno trovato che 2 polimorfismi, intron 1/C(-161)T e esone 9/I474V, erano associati con i livelli di colesterolo totale (TC) e LDL-C.

Kotowski et Al<sup>(14)</sup> hanno caratterizzato lo spettro delle varianti del PCSK9. Lo studio di popolazione includeva tutti i partecipanti nel Dallas Heart Study, 3543 soggetti, il 50% dei quali erano Afro-Americani.

I risultati sono:

- le varianti nonsense e missenso del PCSK9 sono fortemente associate negli Afro-Americani con una riduzione del LDL-C fino al 49%;

- un SNP non codificante si associava ad un modesto incremento (3%) dei livelli di LDL-C.

In conclusione sono necessari ulteriori studi nelle popolazioni free living, specialmente Caucasiche, per valutare gli effetti delle comuni varianti del PCSK9 sui livelli plasmatici di LDL-C.

### Bibliografia

- 1) Abifadel, M.; Varret, M.; Rabes, J.-P.; Allard, D.; Ouguerram, K.; Devillers, M.; Cruaud, C.; Benjannet, S.; Wickham, L.; Erlich, D.; Derre, A.; Vileger, L. et al. *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Nature Genet.* 34: 154-156, 2003.
- 2) Leren TP: *Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Clin Genet* 65: 419-422, 2004.
- 3) Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, et al: *A mutation in PCSK9 causing autosomal dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree*. *Hum Genet* 114: 349-353, 2004.
- 4) Naoumova RP, Tosi I, Patel D, Neuwirth C, Horwell SD, et al: *Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow up and treatment response*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2654-60, 2005.
- 5) Allard D, Amsellem S, Abifadel M, et al: *Novel mutations in the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Hum Mutat* 26: 497, 2005 (mutation in brief e1-e9).
- 6) Pisciotta L, Oliva CP, Cefalù AB, Noto D, Bellocchio A., Fresa R, et al: *Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia*. *Atherosclerosis* 186: 433-440, 2006.
- 7) Schonfeld G, Lin X, Yue P: *Familial hypobetalipoproteinemia: genetic and metabolism*. *Cell Mol Life Sci* 62: 1372-1378, 2005.
- 8) Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M (2003). *The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation*. *PNAS* 100: 928-933.
- 9) Seidah NG, Chretien M. *Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides*. *Brain Res.* 1999; 848: 45-62.
- 10) Seidah NG, Chretien M. *Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides*. *Brain Res.* 1999; 848: 45-62.
- 11) Maxwell KN, Breslow JL. *Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7100-7105.
- 12) Park SW, Moon YA, Horton JD. *Post-transcriptional regulation of LDL receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a (PCSK9) in mouse liver*. *J Biol Chem* 2004; 279: 50630-50638.

- 13) Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH: *Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent non-sense mutations in PCSK9*. Nat Genet 37: 161-165, 2005.
- 14) Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, et al: *A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low density lipoprotein cholesterol*. Am J Hum Genet 78: 410-422, 2006.
- 15) Berge KE, Ose L, Leren TP: *Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 1094-1100, 2006.
- 16) Fasano T, Cefalu AB, Di Leo E, Noto D, Pollaccia D, Bocchi L, Valenti V, Bonardi R, Guardamagna O, Averna M, Tarugi P. *A Novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Mar; 27(3): 677-81.
- 17) Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, et al : *Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9*. Proc Natl Acad Sci 102: 5374-5379, 2005.
- 18) Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, InamotoN, Takagi S, GotoY, Nonogi H, Iwai N (2004). *Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese*. J Hum Genet 49: 109-114.

---

*Request reprints from:*

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