

STUDI SISA

STUDIO DEL miRNOME E CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL LDLR

PER L'IDENTIFICAZIONE DI NUOVE CAUSE MOLECOLARI DELL'IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

miRNome study and functional characterization of LDLR for the identification of new molecular causes of Familial Hypercholesterolemia

MARIA DONATA DI TARANTO

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II e CEINGE Biotecnologie Avanzate S.C.a R.L., Napoli

SUMMARY

Background. Familial Hypercholesterolemia (FH) is a severe dyslipidaemia consisting in dramatically increased levels of LDL and total cholesterol leading to premature atherosclerosis. FH is a monogenic disease caused by mutations in the *LDLR*, *APOB* or *PCSK9*. In around 20% of patients the genetic cause has not been identified.

Objectives. In order to identify additional pathogenic mechanisms, we propose to characterize the LDLR status and to study the miRNome of patients without mutations in the traditionally associated genes. Aim 1: Functional characterization and expression of LDLR. Aim 2: Identification of miRNA alterations.

Methods. Twenty patients without mutations in *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* genes have been characterized assaying the functional activity and the expression (mRNA and protein) of LDLR in patient's cells using fluorescent LDL or an antibody. The miRNome analysis have been performed by Small RNA sequencing followed by miRNA mapping toward a miRNA database. Analysis was performed comparing data between patients and 10 controls.

Results. The LDLR characterization allowed to obtain different populations of patients with: 1. normal LDLR activity; 2. decreased activity with decreased expression of LDLR; 3. decreased activity with normal LDLR expression. miRNA sequencing identified 1784 miRNAs; 198 miRNA are differently expressed between patients and controls, 30 up-regulated and 168 down-regulated.

Conclusions. A defective function of LDLR have been observed for the first time in FH patients without causative mutations, explaining the phenotype development. A large number of miRNAs differently expressed have been identified, suggesting a relevant role of these molecules in the development of FH.

Keywords: *Familial Hypercholesterolemia, miRNome, LDLR activity, expression regulation.*

Studio finanziato
con la borsa di
Studio Andrea
Mezzetti 2015

Indirizzo per la corrispondenza

Maria Donata Di Taranto

Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche

Università degli Studi di Napoli Federico II - Via S. Pansini, 5 - 80131 Napoli

Email: ditaranto@ceinge.unina.it

Obiettivi

L'ipercolesterolemia familiare (IF) autosomica dominante è una grave dislipidemia che consiste nel notevole aumento del colesterolo LDL che si accumula nei tessuti e causa xantomi tendinei, xantelasma, arco corneale e aterosclerosi prematura associata ad eventi cardiovascolari precoci (1, 2). La patologia è causata da mutazioni nei geni codificanti per il recettore delle LDL (*LDLR*), per l'unica apolipoproteina contenuta nelle LDL, l'apolipoproteina B (*APOB*) e per la proteasi che induce la degradazione del *LDLR* dopo l'endocitosi (*PCSK9*). Recenti studi epidemiologici hanno stimato che la patologia allo stato eterozigote ha una prevalenza pari a 1:200, evidenziando che una notevole porzione di pazienti è ancora non diagnosticata e quindi non trattata adeguatamente (3). La diagnosi precoce permette di iniziare precocemente la terapia e prevenire le complicanze cardiovascolari (4). L'identificazione di una mutazione causativa di IF permette di estendere lo studio genetico ai familiari e così di identificare un numero più ampio di soggetti affetti, alcuni dei quali anche in età pediatrica (screening a cascata).

In circa il 20% dei pazienti con sospetto clinico di IF non vengono riscontrate mutazioni nei geni causativi (1) e la ricerca è attualmente focalizzata sull'identificazione di ulteriori cause molecolari di IF; diversi studi sono stati condotti per identificare nuovi geni causativi o per validare l'ipotesi di una base poligenica (5, 6). Gli studi condotti per identificare nuovi geni ha messo in evidenza la complessità delle basi genetiche dell'IF, suggerendo che è necessario studiare altri meccanismi genetici che influenzano lo sviluppo della patologia (7, 8).

Abbiamo ipotizzato che il fenotipo dislipidico possa essere causato non solo

dalla presenza di una mutazione, ma anche da ulteriori meccanismi come un'alterata regolazione dell'espressione genica indotta dall'anormale presenza di microRNA (miRNA). I miRNA sono RNA di circa 20 nucleotidi in grado di legare RNA messaggeri (target) in base alla complementarità di sequenza e di indurre la degradazione o il silenziamento (9).

L'obiettivo di questo lavoro è stato lo studio del miRNoma (l'insieme di tutti i miRNA contenuti nella cellula) in pazienti con diagnosi clinica di IF e assenza di mutazioni nei geni causativi e il confronto dei risultati con quelli ottenuti in un gruppo di soggetti normolipidici. Per meglio focalizzare l'attenzione sul tipo di alterazione molecolare presente nei singoli pazienti è stato caratterizzato lo stato funzionale di *LDLR*.

Lo studio dei pazienti senza mutazioni aveva quindi un duplice fine:

1. Caratterizzare lo stato funzionale e l'espressione del *LDLR*.
2. Analizzare il miRNoma e identificare i miRNA differenzialmente espressi tra pazienti e controlli.

Materiali e Metodi

Pazienti e campioni

In studi precedenti erano stati identificati diversi pazienti con diagnosi clinica di IF in cui non erano state trovate mutazioni nei geni causativi (10). Per questi pazienti e per 10 soggetti di controllo normolipidici sono stati raccolti campioni di sangue da cui sono state isolate le cellule mononucleate (PBMC) utilizzate negli esperimenti.

Caratterizzazione del LDLR

La caratterizzazione funzionale del *LDLR* è stata effettuata quantificando sia l'attività del recettore che i livelli di proteina sulla membrana plasmatica delle cellule dei pazienti. Le cellule mononucleate

sono state messe in coltura per 48 ore in mezzo Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM), con 10% di siero privo di lipoproteine per indurre sovraespressione del LDLR, 1 μ M ionomicina e 10 ng/ml di forbolo miristato acetato per stimolare la duplicazione dei linfociti T, aumentando ulteriormente la necessità di endocitare lipoproteine (11). In seguito alla stimolazione, le cellule sono state trattate in 2 modi differenti:

1. Quantizzazione dell'attività recettoriale: le cellule sono state incubate in mezzo senza siero in presenza di 10 μ g/ml di LDL fluorescenti (DiL-LDL) per 3 ore a 37°C per permettere il legame e l'endocitosi delle lipoproteine.
2. Quantizzazione dei livelli di proteina in membrana: le cellule sono state lavate in PBS freddo con 0,5% BSA e incubate per 1 ora a 4°C con un anticorpo monoclonale diretto contro LDLR e poi con un anticorpo secondario fluorescente (12).

In entrambi i casi la quantizzazione della fluorescenza è stata effettuata al citometro a flusso (FACSCanto - Becton-Dickinson).

miRNA sequencing

Lo studio del miRNoma è stato effettuato attraverso il sequenziamento massivo di tutti i piccoli RNA (Small RNA-sequencing). I miRNA, estratti dalle cellule di sangue periferico con il kit mirVana (Life Technologies), sono stati utilizzati per preparare le librerie con il kit Illumina TruSeq Small RNA Library Prep. Il sequenziamento è stato effettuato con il sequenziatore HiSeq 2500 (Illumina).

L'analisi dei dati ottenuti dal sequenziamento è stata effettuata attraverso la un pre-processamento che consisteva nella rimozione delle sequenze di adattamento inserite nella fase di preparazione delle librerie e nell'eliminazione delle sequenze

che non soddisfacevano i requisiti di qualità. L'identificazione dei miRNA è stata effettuata attraverso mappaggio contro le sequenze di miRNA presenti nel database miRBase (13).

Identificazione dei pathway

L'identificazione dei potenziali geni target dei miRNA differenzialmente espressi e l'identificazione dei pathway molecolari in cui essi sono coinvolti è stata effettuata con la piattaforma Ingenuity Pathway Analysis (IPA) e con il programma mirPath v.3. Ulteriori analisi, più focalizzate sui geni coinvolti nelle dislipidemie, sono state condotte analizzando accuratamente i dati sulle interazioni molecolari presenti in letteratura.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con PASW v. 18.0 (SPSS Inc.) e ha compreso test di normalità (Kolmogorov-Smirnov), confronto delle medie con t-test per le distribuzioni parametriche e Mann-Whitney per le distribuzioni non parametriche. Il confronto di frequenze è stato effettuato attraverso test del chi-quadro.

Risultati

Caratterizzazione dell'espressione e della funzione del LDLR

Nei 20 pazienti affetti da IF, in cui non sono state identificate mutazioni causative, è stata effettuata la quantizzazione dell'espressione del LDLR sulla membrana plasmatica e della attività funzionale del LDLR. I 10 soggetti sani di controllo hanno permesso di definire i livelli normali di attività ed espressione di LDLR ed effettuare i confronti. Questa duplice caratterizzazione ha permesso di identificare 3 differenti gruppi di pazienti:

1. pazienti con normale attività e normali livelli di recettore in membrana;

2. pazienti con ridotta attività di LDLR ma con normali livelli di proteina;
3. pazienti con ridotta attività e ridotti livelli di proteina.

La riduzione dell'attività in questi pazienti era simile a quella osservata in pazienti con mutazioni in *LDLR* note come causative di IF e precedentemente caratterizzate.

Studio del miRNoma

Al fine di identificare la causa della ridotta attività del LDLR, è stato effettuato lo studio del miRNoma attraverso "miRNA-sequencing", ovvero sequenziamento massivo di tutti i piccoli RNA presenti nelle cellule dei pazienti.

Nei 30 campioni analizzati, sono stati identificati 1784 miRNA. In seguito a normalizzazione dell'espressione, sono stati eliminati i miRNA con espressione troppo bassa per essere ritenuta attendibile e sono stati quindi ottenuti 897 miRNA da analizzare. Il confronto dell'espressione dei miRNA tra pazienti e controlli è stato effettuato attraverso il test del chi-quadro nel caso i miRNA fossero espressi in meno di 10 su 30 campioni (258 miRNA) o attraverso il confronto di medie per i miRNA espressi in più di 10 su 30 campioni (639 miRNA). Il confronto di medie è stato effettuato attraverso il t-test (528 miRNA) o il Mann-Whitney (111 miRNA) in dipendenza della normalità della distribuzione.

Analisi dei miRNA in relazione alla funzione del LDLR

In totale sono stati 198 miRNA differenzialmente espressi tra pazienti e controlli, 30 miRNA iper-espressi e 168 ipo-espressi nei pazienti rispetto ai controlli. Lo stesso procedimento di analisi statistica è stato effettuato per l'analisi dei miRNA differenzialmente espressi tra i pazienti appartenenti ai diversi gruppi stabiliti in base alla caratterizzazione funzionale del LDLR. I miRNA

differenzialmente espressi tra la classe 1 e le classi 2, 3 e controlli erano 100; 12 miRNA erano iper-espressi e 88 erano ipo-espressi nella classe 1 rispetto agli altri gruppi. Dal confronto della classe 2 con la classe 3 e i controlli sono emersi 146 miRNA statisticamente differenti: 20 iper-espressi e 126 ipo-espressi. Il confronto della classe 3 è stato effettuato con i controlli ed ha evidenziato 69 miRNA differenzialmente espressi, 54 iper-espressi e 15 ipo-espressi nei pazienti rispetto ai controlli. Risultati preliminari circa lo studio dei potenziali geni target dei miRNA differenzialmente espressi e dei pathway in cui sono coinvolti hanno identificato processi cellulari molto generici.

Attualmente è in corso l'analisi mirata dei miRNA differenzialmente espressi al fine di identificare i processi metabolici che possano essere responsabili dello sviluppo del fenotipo ipercolesterolemico. In particolare le analisi saranno differenziate in base ai diversi gruppi ottenuti con la caratterizzazione funzionale, distinguendo tra i processi che portano alla riduzione dell'espressione di LDLR (classe 3), alla riduzione dell'attività del recettore (classe 2) e che non coinvolgono il recettore (classe 1).

Discussione

La presente ricerca ha affrontato lo studio molecolare dei pazienti affetti da FH in cui non sono state identificate mutazioni causative. È stato dimostrato per la prima volta che, anche in assenza di mutazioni nei geni *LDLR*, *PCSK9* o *LDLRAP1*, è possibile riscontrare un difettivo funzionamento di LDLR e che in una parte dei pazienti tale difetto è plausibilmente causato da una riduzione dell'espressione di LDLR nella membrana. Questo risultato suggerisce che la ridotta attività di LDLR è il meccanismo molecolare alla base del fenotipo ipercolesterolemico.

Il riscontro di una riduzione di espressione/attività di LDLR anche in assenza di mutazioni suggerisce che il test funzionale potrebbe essere un utile strumento per identificare il difetto molecolare nei pazienti affetti da IF, oltre che uno strumento per la caratterizzazione funzionale delle varianti genetiche (14).

Benché in letteratura sia presente uno studio in cui è stato valutato il ruolo di alcuni miRNA nell'IF (15), il presente studio è il primo che affronta l'analisi dei miRNA con una valutazione totalitaria dei miRNA presenti nelle cellule dei pazienti attraverso

il sequenziamento di tutto il miRNoma. L'elevato numero di miRNA differentemente espressi evidenzia come tali molecole siano importanti nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica nei pazienti affetti da IF. Poiché ogni miRNA riconosce diversi target, l'analisi dei possibili geni riconosciuti e down-regolati dai miRNA è particolarmente complessa. I dati preliminari hanno permesso di identificare alcuni pathway funzionali, ma analisi approfondite sono ancora in corso. Infine, sarà necessario effettuare la validazione dei miRNA al fine di dimostrare la loro azione regolatrice sui geni target.

RIASSUNTO

Premesse. L'Ipercolesterolemia Familiare (FH) è una dislipidemia grave caratterizzata da livelli elevati di LDL, che portano ad aterosclerosi precoce. FH è una malattia monogenica causata da mutazioni di LDLR, APOB o PCSK9; in circa il 20% dei pazienti non è stata identificata la causa genetica. Obiettivi. Al fine di identificare ulteriori meccanismi patogenetici, ci si propone di caratterizzare LDLR e di studiare il miRNoma di pazienti senza mutazioni nei geni tradizionalmente associati.

Obiettivo 1: caratterizzazione funzionale ed espressione di LDLR.

Obiettivo 2: identificazione delle alterazioni di miRNA. Metodi. 20 pazienti senza mutazioni nei geni LDLR, APOB e PCSK9 sono stati caratterizzati per analizzare l'attività funzionale e l'espressione (mRNA e proteina) di LDLR nelle cellule, utilizzando LDL o un anticorpo fluorescente. L'analisi del miRNoma è stata condotta su sequenze Small RNA seguite da mappatura di miRNA verso un database miRNA; sono stati confrontati i dati dei pazienti con quelli di 10 controlli.

Risultati. La caratterizzazione di LDLR ha permesso di osservare pazienti con: 1. attività normale di LDLR; 2. diminuzione dell'attività con diminuzione dell'espressione di LDLR; 3. diminuzione dell'attività con espressione normale di LDLR. Il sequenziamento di miRNA ha identificato 1784 miRNAs; 198 miRNA sono espressi in modo diverso tra i pazienti e i controlli, 30 regolati e 168 ridotti.

Conclusioni. Una funzione difettosa di LDLR è stata osservata per la prima volta nei pazienti FH senza mutazioni causali, spiegando lo sviluppo del fenotipo. Sono stati identificati un gran numero di miRNA diversamente espressi, suggerendo un ruolo rilevante di queste molecole nello sviluppo di FH.

Parole chiave: *Ipercolesterolemia Familiare, miRNoma, attività di LDLR, espressione genica.*

Bibliografia

- Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology*. 2011; 5: S9-S17.
- Talmud PJ, Futema M, Humphries SE. The genetic architecture of the familial hyperlipidaemia syndromes: rare mutations and common variants in multiple genes. *Curr Opin Lipidol*. 2014; 25: 274-81.
- Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013; 34: 3478-90a.
- Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 217:3-46, 2011.

5. Futema M, Plagnol V, Li K, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet.* 2014; 51: 537-44.
6. Futema M, Shah S, Cooper JA, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem.* 2015; 61: 231-8.
7. Chen H, Wang L, Jiang J. Transcriptome and miRNA network analysis of familial hypercholesterolemia. *International journal of molecular medicine.* 2014; 33: 670-6.
8. Medina MW, Gao F, Naidoo D, et al. Coordinately regulated alternative splicing of genes involved in cholesterol biosynthesis and uptake. *PloS one.* 2011; 6: e19420.
9. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature.* 2009; 457: 396-404.
10. Romano M, Di Taranto MD, D'Agostino MN, et al. Identification and functional characterization of LDLR mutations in familial hypercholesterolemia patients from Southern Italy. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 493-96.
11. Romano M, Di Taranto MD et al. An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDLR mutations. *J Lipid Res.* 2011; 52: 2095-100.
12. Ruotolo A, Di Taranto MD, D'Agostino MN, et al. The novel variant p.Ser465Leu in the PCSK9 gene does not account for the decreased LDLR activity in members of a FH family. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52: e175-8.
13. Giurato G, De Filippo MR, Rinaldi A, et al. iMir: an integrated pipeline for high-throughput analysis of small non-coding RNA data obtained by smallRNA-Seq. *BMC Bioinformatics.* 2013; 14: 362.
14. Di Taranto MD, D'Agostino MN, Fortunato G. Functional characterization of mutant genes associated with autosomal dominant familial hypercholesterolemia: integration and evolution of genetic diagnosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015; 25: 979-87.
15. Martino F, Carlomosti F, Avitabile D, et al. Circulating miR-33a and miR-33b are up-regulated in familial hypercholesterolaemia in paediatric age. *Clin Sci (Lond)* 2015; 129: 963-72.