

**TECNICHE DIAGNOSTICHE**

# IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE

**GIULIANA FORTUNATO, MARIA DONATA DI TARANTO**

Lo sviluppo di aterosclerosi e delle derivanti patologie cardiovascolari ha un'indubbia base genetica, essendo spesso riscontrate nelle diverse generazioni delle famiglie colpite. Tantissimi studi hanno cercato di identificare i fattori genetici che potessero spiegare lo sviluppo di aterosclerosi, identificando prevalentemente polimorfismi a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism - SNP*) ognuno dei quali poteva giustificare solo una piccolissima parte del rischio cardiovascolare, per cui solo la loro presenza contemporaneamente poteva realmente conferire aumentato rischio. L'impatto delle varianti comuni (MAF >1%), spesso con scarso impatto sulla funzione proteica, è di solito interpretato utilizzando dei sistemi a punteggio cui ogni variante aggiunge una piccola quota pesata in base all'impatto della stessa sul rischio, ovvero i *polygenic risk score* (1).

Benché le nuove tecnologie siano perfettamente in grado di identificare contemporaneamente molteplici alterazioni genetiche, che si sono rivelate associate allo sviluppo di placche aterosclerotiche in studi sperimentali, l'utilità clinica dei test genetici è connessa essenzialmente alla diagnosi di ben determinate condizioni che comportano aumentato rischio di aterosclerosi.

Diversi tentativi sono stati fatti per cercare di identificare le varianti connesse allo sviluppo dei fattori di rischio dell'aterosclerosi, come il diabete o l'ipertensione. Già nel 2016, una *review* sull'importanza dei test genetici nell'aterosclerosi aveva ristretto le aree di applicazione a 2, ovvero la diagnosi di ipercolesterolemia familiare (FH) e la farmacogenetica (2). Quest'ultima può aiutare nella gestione terapeutica del paziente, non nella fase diagnostica o predittiva dell'aterosclerosi, mentre la diagnosi genetica di FH aiuta ad identificare con certezza i pazienti affetti in modo da instaurare la terapia più opportuna.

## Tipi di alterazioni genetiche alla base dell'aterosclerosi

### *Ipercolesterolemia Familiare*

La FH è una patologia con ereditarietà co-dominante ed effetto a dose genica, causata da varianti nei diversi geni legati alla funzione di endocitosi delle LDL, principalmente *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Conseguenza di tali alterazioni sono livelli costantemente elevati di colesterolo-LDL, fin dalla nascita, che costituiscono la base per lo sviluppo di placche aterosclerotiche (3). La FH è diagnosticabile clinicamente in base a diversi criteri, principalmente quelli pro-

posti dal Simon Broome e dal *Dutch Lipid Clinic Network*, che ritengono la presenza di una variante patogena un fattore che consente quasi da solo di porre una diagnosi definitiva della patologia.

Le varianti patogene nei diversi geni causativi contribuiscono contemporaneamente al fenotipo (ereditarietà co-dominante) e il fenotipo finale è legato al numero di varianti patogene (dipendenza della dose genica). Infatti, la FH si può manifestare in due forme, la forma eterozigote (HeFH) e quella detta "omozigote" (HoFH), che può essere causata da varianti in omozigosi, in eterozigosi composta (due varianti diverse sui due alleli dello stesso gene) o in doppia eterozigosi (due varianti in eterozigosi su due geni differenti). La forma omozigote è molto più grave della forma eterozigote, mostrando livelli di colesterolo-LDL superiori a 500 mg/dL associati alla possibilità di manifestazione di eventi coronarici acuti già nell'infanzia, se la patologia non è opportunamente diagnosticata e trattata.

La FH è caratterizzata da un'elevata eterogeneità genetica legata alla presenza di diversi geni causativi, in ognuno dei quali sono state identificate diverse varianti patogene (più di 2000 varianti solo nel gene *LDLR*) (4). La diagnosi genetica di FH è complicata proprio dalla complessità delle sue basi genetiche perché i geni da analizzare sono molteplici e il fenotipo biochimico e clinico aiuta solo in parte ad indirizzare l'analisi genetica. A causa della variabilità fenotipica, alcuni pazienti eterozigoti possono presentarsi con altissimi livelli di colesterolo-LDL, similmente ai pazienti HoFH. In realtà, anche il tipo di variante e il gene in cui è presente la variante hanno impatto sulle manifestazioni fenotipiche della patologia. Le varianti genetiche che portano a totale perdita di funzione della proteina codificata hanno un effetto biochi-

mico e clinico più grave rispetto alle varianti che portano ad una proteina con una funzione solamente ridotta. Inoltre, nella FH, le varianti nel gene *LDLR* sono risultate generalmente più dannose di quelle negli altri geni (4). Questo aspetto evidenzia come l'analisi genetica permetta non solo la diagnosi, ma anche una valutazione prognostica, consentendo al clinico che deve gestire il paziente di sapere quali pazienti avranno le conseguenze cliniche peggiori. In ogni caso, a parità di livelli di colesterolo LDL, i pazienti con varianti causative di FH hanno un rischio aumentato di patologia coronarica, probabilmente a causa della presenza di livelli alti di colesterolo-LDL fin dalla nascita (5). Inoltre, la FH è stata riconosciuta come fattore che da solo assegna al paziente una classificazione di rischio molto elevato (3) che è legato ad una necessità di un target terapeutico di colesterolo LDL molto basso.

L'identificazione di una variante patogena di FH, aiuta non solo la diagnosi nel paziente in cui è stata identificata, ma permette di estendere lo screening ai familiari, identificando ulteriori pazienti affetti da FH (screening a cascata). L'utilità clinica dell'analisi molecolare nella FH è riconducibile a:

- porre diagnosi definitiva di FH e quindi inquadrare correttamente il rischio cardiovascolare del paziente;
- determinare con certezza lo stato genetico (HeFH o HoFH) del paziente;
- discriminare il tipo di variante causativa di patologia, permettendo una valutazione prognostica;
- effettuare lo screening a cascata, identificando ulteriori pazienti affetti.

#### *Gli score poligenici*

Gli score calcolati sulla contemporanea presenza di molteplici SNP hanno mostrato associazione con la presenza di atero-

sclerosi e delle sue complicanze, ma si sono rivelate poco efficaci come strumento diagnostico. Infatti, l'utilità clinica di un test diagnostico dipende dalla possibilità di intraprendere scelte mediche e terapeutiche che possono modificare la prognosi dei pazienti. Se la diagnosi di patologie mendeliane strettamente connesse ad aumentato rischio di patologie coronariche, come la FH, ha dei risvolti terapeutici precisi, lo stesso non si può dire per l'identificazione dei pazienti con alto score poligenico. Tra l'altro è stato dimostrato che il solo intraprendere uno stile di vita sano comporta l'annullamento della predisposizione genetica dovuta all'accumulo di polimorfismi (1). Come deve essere interpretato uno score poligenico elevato? Questo deve comportare un cambiamento nella gestione del paziente? La risposta a queste domande non può ancora essere data poiché mancano gli studi prospettici che mirano a tali validazioni (6). L'evoluzione tecnologica nella biologia molecolare insieme all'implementazione di metodiche computazionali efficienti e all'abbassamento dei costi di analisi, ha lasciato pensare che la chimera della medicina di precisione fosse molto vicina. Purtroppo, questa resta ad oggi ancora lontana relativamente all'aterosclerosi, in cui sono troppo forti le influenze dei fattori di rischio esterni.

*Modulatori dell'espressione genica:  
vescicole extracellulari e RNA  
non codificanti*

Gli RNA non codificanti sono importanti regolatori dell'espressione genica, implicati nello sviluppo di numerose patologie umane. Tra gli RNA regolatori più studiati troviamo i microRNA (miRNA - circa 22 nucleotidi) e i *long noncoding RNA* (lncRNA - >200 nucleotidi). Queste molecole sono coinvolte nei diversi processi patologici che costituiscono fattori di rischio per l'atero-

sclerosi, ma anche nello sviluppo stesso di placche aterosclerotiche. Infatti, gli RNA non codificanti sono implicati nella permeabilità endoteliale, nell'accumulo di lipidi nella parete vasale, nella risposta infiammatoria, nell'attivazione delle cellule muscolari lisce e nella rottura della placca (7).

Sebbene, gli RNA non codificanti siano sicuramente coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi, il loro ruolo come marker diagnostici necessita ancora di ulteriori validazioni (8). Questo è anche dovuto al fatto che alcuni RNA non codificanti risultano alterati nella lesione aterosclerotica, dove svolgono la loro funzione, ma non a livello del sangue periferico. Allo stesso modo, benché diversi geni abbiano mostrato differente espressione a livello della placca aterosclerotica o del sangue periferico, la valutazione dell'espressione genica non può essere utilizzata per fini diagnostici.

Le vescicole extracellulari, ovvero vescicole secrete da tutti i tipi di cellule, contengono lipidi, proteine e materiale genetico, prevalentemente RNA non codificanti, che trasportate dal sangue possono fungere da regolatori genetici in altri distretti. Esistono vescicole extracellulari di diverse dimensioni, gli esosomi, le microvescicole e i corpi apoptotici. L'analisi di tali vescicole e del loro contenuto richiede un passaggio di isolamento che può essere effettuato in molteplici modi e su cui manca attualmente una standardizzazione. Di conseguenza l'analisi del materiale genetico contenuto nelle vescicole extracellulari non può essere considerata a fini diagnostici, benché il numero di studi sempre crescente contribuirà a definirne l'utilità (9).

In sintesi, gli RNA non codificanti, liberi nel plasma o contenuti nelle vescicole extracellulari sono dei promettenti biomarker, ma allo stato attuale non utilizzabili per ottenere informazioni definite.

## Approcci metodologici alla diagnosi molecolare

L'innovazione metodologica nel sequenziamento genico attraverso lo sviluppo delle procedure di *Next Generation Sequencing* (NGS) ha sicuramente migliorato la diagnosi della FH permettendo di analizzare molti geni contemporaneamente, cioè i 3 geni principali (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*), i geni raramente causativi (*APOE* e *LDLRAP1*), i geni il cui ruolo patogenico è attualmente dibattuto (*STAP1* e *CH25H*) e i geni causativi di altre dislipidemie che portano ad un fenotipo in parte sovrapponibile alla FH (*ABCG5*, *ABCG8*, *LIPA*) che possono essere utili nella diagnosi differenziale (10). Possono essere anche analizzate le regioni in cui sono presenti gli SNP che permettono di calcolare gli score poligenici per l'ipercolesterolemia o il rischio cardiovascolare. Data l'importanza del trat-

tamento terapeutico dei pazienti affetti, l'analisi molecolare può anche includere lo studio delle varianti associate alla risposta o agli eventi avversi legati alla terapia con statine.

La *tabella 1* riassume le metodologie utilizzabili e i relativi campi di applicazione. Il sequenziamento con NGS prevede due passaggi essenziali, la selezione delle regioni da analizzare (per cattura o per arricchimento) e il successivo sequenziamento massivo. La scelta delle regioni da analizzare può essere mirata a specifici geni o includere tutti gli esoni (esoma) o gli esoni appartenenti a geni conosciuti per essere causa di malattie ereditarie (mendelioma) o tutto il genoma (incluse le regioni non codificanti). Sicuramente l'analisi di un pannello di geni è il metodo più vantaggioso per fini diagnostici, evitando di dover analizzare un'enorme quantità di dati, mentre gli studi "omici" sono fonda-

**Tabella 1 - Metodologie di biologia molecolare utili nella diagnosi di ipercolesterolemia familiare.**

Approccio metodologico	Target analitici	Applicabilità diagnostiche e criticità
Sequenziamento tradizionale	Geni piccoli, singoli esoni e regioni specifiche	Metodo diagnostico in uso in passato; utile per cercare varianti note nella famiglia (screening a cascata).
Multiplex Ligation Probe Amplification	Analisi delle copy number variant (CNV)	Attualmente disponibile solo per il gene <i>LDLR</i>
Next Generation Sequencing	Pannelli genici	Metodo attualmente più utilizzato per fini diagnostici. Si può includere l'analisi di SNP per il calcolo degli score poligenici. L'analisi delle CNV dipende dal coverage.
	Esoma o Mendelioma	Metodo utile soprattutto ai fini di ricerca per identificare varianti causative in pazienti negativi. Ampia mole di dati da analizzare.
	Genoma	Metodo utile soprattutto ai fini di ricerca per identificare varianti causative in pazienti negativi, se si sospetta il coinvolgimento di geni non ancora identificati. Mole di dati molto ampia e difficoltà legate all'elevata variabilità delle regioni non codificanti.
Array comparative genomic hybridization	Regioni selezionate o intero genoma	Analisi di CNV. Per l'analisi di singoli esoni nei geni di interesse sono necessari kit ad elevata risoluzione.

mentali nella ricerca di cause genetiche alternative, ma richiedono un'analisi elaborata. Bisogna tenere presente che nella diagnosi molecolare di tutte le malattie genetiche, è fondamentale stabilire correttamente la patogenicità delle varianti identificate nel paziente. Diverse varianti rare identificate in pazienti clinicamente sospetti di FH, sono in seguito risultate non patogeniche, per cui adesso è raccomandato seguire delle linee guida internazionali per interpretare il significato clinico delle varianti rare identificate durante l'analisi genetica (4). Secondo tali linee guida, le varianti dovrebbero essere classificate in 5 classi: patogeniche, probabilmente patogeniche, varianti di incerto significato, probabilmente benigne e benigne. Diversi aspetti sono considerati in tale valutazione, come la segregazione della variante con il fenotipo all'interno delle famiglie affette o l'analisi funzionale delle varianti mediante studi in vitro, che ha un forte impatto sulla valutazione finale.

Per l'analisi delle grandi delezioni o duplicazioni, ovvero del numero di copie dei differenti esoni di cui è composto un gene (*Copy Number Variant* - CNV), il sequenziamento con NGS deve essere impostato in maniera da ottenere un elevato numero di sequenze (coverage) per le regioni di interesse, aumentando i costi dell'analisi. La maggior parte dei pannelli attualmente disponibili permette solo l'analisi delle CNV nel gene *LDLR*, tralasciando possibili altre cause di FH, come la duplicazione dell'intero gene *PCSK9* (11). In alternativa, l'analisi di tali alterazioni dovrebbe essere effettuata con *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) o con *array comparative genomic hybridization* (aCGH), metodologie implementate strettamente per l'analisi

delle CNV. Uno dei vantaggi sostanziali dell'uso del NGS è la possibilità di analizzare contemporaneamente tutti i geni causativi, permettendo l'identificazione dei soggetti HoFH, soprattutto quelli con un fenotipo non particolarmente suggestivo.

## Bibliografia

1. Aragam KG, Natarajan P. Polygenic Scores to Assess Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk: Clinical Perspectives and Basic Implications. *Circ Res.* 2020; 126: 1159-1177.
2. Paynter NP, Ridker PM, Chasman DI. Are Genetic Tests for Atherosclerosis Ready for Routine Clinical Use? *Circ Res.* 2016; 118: 607-619.
3. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020; 41: 111-188.
4. Di Taranto MD, Giacobbe C, Fortunato G. Familial hypercholesterolemia: A complex genetic disease with variable phenotypes. *Eur J Med Genet.* 2020; 63: 103831.
5. Khera AV, Won HH, Peloso GM, et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67: 2578-2589.
6. Brown EE, Sturm AC, Cuchel M, Braun LT, Duell PB, Underberg JA, Jacobson TA, Hegele RA. Genetic testing in dyslipidemia: A scientific statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol.* 2020; 14: 398-413.
7. Jaé N, Dimmeler S. Noncoding RNAs in Vascular Diseases. *Circ Res.* 2020; 126: 1127-1145.
8. Zhu L, Li N, Sun L, et al. Non-coding RNAs: The key detectors and regulators in cardiovascular disease. *Genomics.* 2020; S0888-7543(20)31983-2.
9. Charla E, Mercer J, Maffia P, Nicklin SA. Extracellular vesicle signalling in atherosclerosis. *Cell Signal.* 2020; 75: 109751.
10. Iacocca MA, Hegele RA. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17: 641-651.
11. Iacocca MA, Wang J, Sarkar S, et al. Whole-Genome Duplication of *PCSK9* as a Novel Genetic Mechanism for Severe Familial Hypercholesterolemia. *Can J Cardiol.* 2018; 34: 1316-1324.