

УДК 616.153.915?008.9?02:575.173

Ю.М. ПАНЧИШИН

ГЕН PCSK9 ЯК ПРИЧИНА ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ ЛІПІДІВ

Мутації певних генів мають відношення до метаболізму ліпідів. Серед них є ген proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), мутації якого асоціюються як з гіпер- так і гіпохолестеролемією. PCSK9 розглядається як потенційна мішень в лікуванні порушень метаболізму ліпідів.

Рівень холестеролу (ХС) крові визначається декількома чинниками: використанням апопротеїн-В (*apoB*)-вмісних ліпопротеїнів клітинами, що здатні експресувати *apoB*-рецептори (*apoB-R*); функціонуванням цих рецепторів; продукцією *apoB* печінкою; мутацією генів, які мають відношення до вище переліченого.

У 2003 р. М. Abifadel et al. [1] описали регіон хромосоми 1, який вміщує 41 ген, один із яких ідентифіковано як ген PCSK9 - proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. Це дозволило виділити автосомно-домінантну гіпохолестеролемію (гіпоХС) у Французькій популяції.

Proprotein convertase subtilisin/kexin9 - член родини серинових пропротеїн конвертаз ссавців, які необхідні для утворення нейропептидів, прогормонів, цитокінів, факторів росту, рецепторів білків клітинної поверхні [30,29]. Пропотеїн конвертаза експресується в печінці, товстій кишці, мезенхімальних клітинах нирки, кишковому епітелії [29]. Кількість її зростає під час регенерації гепатоцитів і диференціації нервових клітин [29].

Пропотеїн конвертаза, яку кодує ген PCSK9, регулює число *apoB-R* на поверхні клітини та швидкість кліренсу ліпопротеїнів низької густини (ЛНГ). Надекспресія гену внаслідок мутації веде до значного зростання *apoB-R* на поверхні клітини та гіпоХС [6], до збільшення ХС-ЛНГ, внаслідок зменшення білка ЛНГ-рецепторів у гепатоцитах. Причому синтез цього білка не зменшується, а різко зростає його розпад у гепатоциті [19]. Ген PCSK9 регулюється стеролами. Харчовий ХС пригнічує його експресію [20]. Експресія PCSK9 регулюється харчовим ХС у мишей, внутрішньоклітинним рівнем стеролів у культурі клітин через sterol regulatory element binding protein transcription factors (SREBPs). SREBPs належать до родини транскрипційних факторів, які підвищують експресію багатьох генів, що мають відношення до синтезу ХС, жирних кислот і ЛНГ-рецепторів [12]. Індукція PCSK9 вказаним протеїном дозволила допустити участь першої молекули в метаболізмі ХС.

Надекспресія PCSK9 в клітинах HepG2 є причиною зменшення білка ЛНГ-рецепторів у середині клітини та на її поверхні. Причому це зменшення зумовлено значною деградацією *apo B-R*, а не зменшенням його синтезу. Можна сказати, що ЛНГ-рецептор це субстрат для пропротеїн конвертази. Встановлено, що фізіологічна функція PCSK9 знижувати кількість ЛНГ-рецепторів пов'язана з "loss-of-function" (зниженням функції) у людей і мишей. У той же час гетерозиготи з мутацією в алелі PCSK9 мають істотно нижчий рівень ХС-ЛНГ, що асоціюється зі зростанням кількості ЛНГ-рецепторів [7]. Т.А. Lagace et al. [15] продемонстрували, що ендогенний PCSK9 швидко секретується з клітин, екстрацелюлярний PCSK9 може інтерналізуватися через *apoB-R* гепатоцитів і фібробластів; інкубація з екстрацелюлярним PCSK9 веде до втрати *apoB-R* з поверхні клітин і прискореної деструкції цих рецепторів в ізольованих гепатоцитах. Зростання в циркуляторному руслі ферменту PCSK9 приводить до зменшення *apoB-R* і зростання величини ХС у плазмі крові [15]. PCSK9 може функціонувати, як екстра-, так і інтраклітинно, але невідомо, як білок функціонує в нормі та патології [15].

Ще однією функцією гена PCSK9 є зменшення кількості *apoB-R* на поверхні клітин, що асоціюється з автосомно-рецесивною гіперхолестеролемією (гіперХС) [32].

В експерименті на клітинній лінії гепатоцитів вивчено кількість ЛНГ-рецепторів залежно від типу мутації гену PCSK9. У випадку втрати функції гена до продукції пропротеїн конвертази в клітинах зростали в порівнянні із немутованим геном кількість *apoB-R* та інтерналізація ЛНГ в клітину на 16% і 36% відповідно. Якщо мутація веде до підвищеної продукції пропротеїн конвертази, то на поверхні клітин зменшуються кількість *apoB-R* на 23% та інтерналізація ЛНГ на 38% [6]. Важливими для розуміння процесів регуляції гомеостазу ХС є експериментальні дані.

Ловастатин у мишей без гену PCSK9 зменшував рівень ХС на 20,6 %, тоді як у генетично немодифікованих мишей зниження ХС було лише на 12 % [25].

Мутація гену PCSK9, що веде до гіпоХС, серед афроамериканців зустрічається у 2 %, серед популяції Південної Африки в 3,1 % [11]. А. Ноорер et al. [11] вивчили частоту двох генетичних мутацій PCSK9 - Y142X і C679X ? в африканській популяції з низьким рівнем ХС. Перша мутація в даній популяції не виявлена, друга спостерігалася в 3,7 %. Носії мутації C679X мали нижчий рівень ХС-ЛНГ у порівнянні з неносіями - $1,6 \pm 0,03$ і $2,2 \pm 0,07$ ммоль/л відповідно. Ця ж мутація серед здорових чоловіків Великої Британії виявляється приблизно в 2 % [26]. Мутація R46L серед білої раси частіша, ніж серед чорної, - 3,2 % і 0,6 % відповідно, й асоціюється зі зменшенням ХС-ЛНГ на 21 % [14].

Цікаво, що пропротеїн конвертаза при гіпоХС і експресованих на поверхні гепатоцитів ароВ-Р локалізується в ендосомах й апараті Гольджі, а при відсутності ароВ-Р на поверхні клітин - в ендоплазматичному ретикулумі [23]. Високий рівень пропротеїн конвертази пов'язаний з підвищенням ХС-ЛНГ у плазмі, а низький - з нижчим [8]. Серед чорношкірого населення, яке не мало нонсенс-мутації (nonsense mutation, утворення неповних нефункціональних пептидів), 9,7% мали коронарні випадки протягом 15-річного спостереження, в 1 з 85 (1,2%) обстежених, які мали таку мутацію, розвинулася коронарна хвороба серця [8]. Якщо в осіб з мутацією 46L рівень ХС-ЛНГ був 40 мг/дл, то частота ІХС зменшувалася на 88 %. Коли ж в осіб з цією ж мутацією ХС-ЛНГ = 20 мг/дл, зменшення частоти ІХС було тільки на 50 % [8].

Якщо нормально функціонуючий PCSK9 редукує число ЛНГ-рецепторів, то мутація гену PCSK9 веде до зростання їх числа і гіпоХС. Однак, переконливих даних про те, що мутація гену з втратою функції пропротеїн конвертази веде до гіпоХС не має. Описано 6 мутацій PCSK9, які пов'язують з гіпоХС і три - з гіперХС [33, 17].

У роботі К.Е. Berge et al. [4] продемонстровано наявність мутації гену PCSK9 у 15,8 % практично здорових осіб з рівнем ХС ? 4 ммоль/л. Виявлені мутації - R46L, R237W, G106R, N157K. Ні одна із них не виявлена в 441 особи з гіперХС. Але в осіб з генетично детермінованою родинною гіпербеталіпопротеїнемією (ГБЛП) такі мутації спостерігалися. Серед 34 осіб з родинною ГБЛП виявлено три мутації гену PCSK9 - дві R46L і одну N157K, а рівень ХС і ХС-ЛНГ в крові в них був нижчий на 12 % і 21 % відповідно в порівнянні з тими, у кого ці мутації не виявлялися.

Серед популяції французів мутація R46L була виявлена у 2,2 % нормохолестеролемічних суб'єктів [1], але не діагностована в осіб з родинною ГБЛП [2]. На основі власних даних і даних літератури К.Е. Berge et al. [4] наголошують, що мутації гену PCSK9 ? R46L, R237W, G106R, N157K ? можуть не виявлятися у хворих з родинною ГБЛП, але є типовими для суб'єктів з гіпоХС. Для мишей, які не мають гену PCSK9, характерний фенотип гіпоХС [25], а в людей декілька мутацій цього гену асоціюються зі зниженим рівнем ХС [35,9,7,4].

Ж. Мауне et al. [21] допустили можливість використання PCSK9 як маркера регуляції гомеостазу ХС в умовах цілого організму. Для цього дослідники розробили методику вакцинації DNA нативної про протеїн конвертази і обстежили 182 особи з нормоліпемією. Рівень PCSK9 в обстежених коливався у межах 0,42-12,3 мікрог/мл [21]. За середніми показниками чоловіки та жінки не відрізнялися. Між кількістю PCSK9 у крові чоловіків та ХС і ХС-ЛНГ виявлено істотний прямий кореляційний зв'язок. У жінок така кореляція не виявлена [21].

Молекула PCSK9 може бути причиною родинної гіперХС. Ген, що кодує її продукцію, розміщений на хромосомі 1p32 в осіб із родинною гіперХС і не пов'язаний з мутацією генів ЛНГ-рецептора і ароВ [34, 10, 13].

Серед білошкірих та чорношкірих осіб у Dallas Heart Study виділили 17 місенс-мутацій (кодується інша амінокислота) PCSK9, з яких ідентифікували 3, що асоціювалися із зниженням ХС-ЛНГ від 3 до 30 % ? R46L, L235F, A443T. Вміст тригліцеридів у носіїв таких мутацій не був збільшений. Місенс-мутації в гені PCSK9 можуть викликати гіперХС. Два варіанти нонсенс-мутації PCSK9, які знайдені у 2% чорношкірих осіб, пов'язані зі зниженням ХС-ЛНГ. Серед населення північної Африки у 3,7% осіб визначалася мутація C679X, яка пов'язана з 27% зменшенням рівня ХС-ЛНГ ($1,6 \pm 0,3$ і $2,2 \pm 0,7$ ммоль/л) [11].

Розглядають п'ять нових мутацій PCSK9. Мутація R215H сприяла гіперХС. G236S і N354I пов'язані з гіпоХС. Мутації A245T і R272Q були подібні до нормальних генетичних варіантів [5]. Дві нонсенс-мутації PCSK9 (Y142X і C679X) асоціюються з позитивною гіпоХС і протекцією проти коронарної хвороби серця. Серед 520 осіб різних етнічних груп в Західній Африці була знайдена тільки мутація C679X. Всі її носії були гетерозиготними. Можливо саме наявністю C679X

пояснюється нижчий рівень коронарної хвороби серця на африканському континенті [31]. Пацієнти з мутацією D374Y PCSK9 були молодші від осіб з гетерозиготною гіперХС ($20,8 \pm 14,7$ і $30,2 \pm 15,7$ рр. відповідно, $p = 0,003$), мали вищий рівень ХС до лікування ($13,6 \pm 2,9$ і $9,6 \pm 1,6$ ммоль/л; $p = 0,004$), який утримувався вищим і після лікування статинами. У них на понад 10 років раніше діагностувалася коронарна хвороба ($35,2 \pm 4,8$ проти $46,8 \pm 8,9$ років; $p = 0,002$) [22]. За даними Т. Fasano et al. [9] в одного пацієнта з сімейною ГБЛП та в двох з гіпоХС знайдена нова мутація в кодуючій частині гена, що проявляється урізаним пептидом Ala68fsLeu82X. Двоє пацієнтів з сімейною ГБЛП та чотири з гіпоХС були носіями мутації R46L, яка пов'язана зі зменшенням ХС-ЛНГ та іншими рідкісними змінами (T77I, V114A, A522T і P616L) амінокислот.

R.J. Schmidt et al. [27] повідомляють про новий варіант PCSK9 у людей, який назвали PCSK9sv. PCSK9sv має відсутні вісім кодуючих частин гена з 58 амінокислот і експресований в різних тканинах (печінці, тонкій кишці, простаті, матці, мозку і жировій тканині). PCSK9sv не змінює рівнів протеїну apoB-R.

Інактивація PCSK9 у мишей скорочує рівні ХС збільшуючи експресію в печінці протеїну ЛНГ-рецепторів і прискорює кліренс ХС-ЛНГ [18]. Визначається позитивна кореляція PCSK9 з ХС ($r=0,45$, $p = 0,006$) і ХС-ЛНГ ($r = 0,54$, $p = 0,001$), але не з тригліцеридами чи ХС-ЛВГ в осіб з цукровим діабетом [16].

Поява і вивчення PCSK9 стимулювало розвиток ще одного напрямку досліджень ? пошук речовин, які можуть впливати на функцію PCSK9 і, відповідно, розвитку нових методів лікування порушень метаболізму ліпідів [24, 28]

ЛІТЕРАТУРА

1. Abifadel M., Varret M., Rabes J.P., et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia // Nat. Genet. -2003. - V. 34. - P. 154-156. □ HYPERLINK "http://atvb.ahajournals.org/cgi/external_ref?access_num=10.1038/ng1161&link_type=DOI" □ □
2. Allard D., Amsellem S., Abifadel M., et al. Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia // Hum. Mut. - 2005. - V.26. - P.497.
3. Attie A. D. The Mystery of PCSK9 // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. -2004. - V.24. - P.1337.
4. Berge K. E., Ose L., Leren T. P. Missense Mutations in the PCSK9 Gene Are Associated With Hypocholesterolemia and Possibly Increased Response to Statin Therapy // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. -2006. - V.26. - P.1094.
5. Cameron J., Holla O.L., Laerdahl J.K., et al. Characterization of novel mutations in the catalytic domain of the PCSK9 gene // J. Intern. Med. -2008. - V.263. - P.420-431
6. Cameron J., Holla O.L., Ranheim T., et al. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors // Hum. Mol. Genet. - 2006. - V.15. - P.1551-1558.
7. Cohen J., Pertsemlidis A., Kotowski I.K., et al. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9 // Nat. Genet. - 2005. - V. 37. - P.161-165.
8. Cohen J.C., Boerwinkle E., Mosley T.H.Jr., Hobbs H.H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease // NEJM. - 2006. -- V.354. - P.1264-1272/
9. Fasano T., Cefalu A.B., Di Leo E., et al. A novel loss of function mutation of PCSK9 gene in white subjects with low-plasma low-density lipoprotein cholesterol // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. -2007. - V.27. - P.677-681
10. Haddad L., Day I.N., Hunt S., et al. Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia / A non-LDLR, non-APOB kindred // J. Lipid. Res. -1999. - V.40. - P.1113-1122.
11. Hooper A.J., Marais A.D., Tanyanyiwa D.M., Burnett J.R. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population // Atherosclerosis. -2007. - V.193. - P.445-448.
12. Horton J.D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis // Biochem. Soc. Trans. -2002. - V.30. - P.1091-1095.
13. Hunt S.C., Hopkins P.N., Bulka K., et al. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2000. - V.20. - P.1089-1093.
14. Kotowski I.K., Pertsemlidis A., Luke A., et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol // Am. J. Hum. Genet. - 2006. - V.78. - P.410-422.
15. Lagace T.A., Curtis D.E., Garuti R., et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice // J. Clin. Invest. - 2006. - V.116. - P.2995-3005.
16. Lambert G., Ancellin N., Charlton F., et al. Plasma PCSK9 Concentrations Correlate with LDL and Total Cholesterol in Diabetic Patients and Are Decreased by Fenofibrate Treatment // Clin Chem. - 2008.
17. Leren T.P. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia // Clin. Genet. -2004. - V. 65. - P.419-422.
18. Lopez D. Inhibition of PCSK9 as a novel strategy for the treatment of hypercholesterolemia. // Drug. News. Perspect. - 2008. - V.21. - P.323-330
19. Maxwell K.N., Breslow J.L. Proprotein convertase subtilisin kexin 9: the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia // Curr. Opin. Lipidol. -2005. - V.16. - P.167-172.
20. Maxwell K.N., Soccio R.E., Duncan E.M. et al. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice // J. Lipid. Res. -2003. - V.44. - P.2109-2119
21. Mayne J., Raymond A., Chaplin A., et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2007. - V.361. - P.451-456.
22. Naoumova R.P., Tosi I., Patel D., 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. -2005. - V.25. - P.2654-2660
23. Nassoury N., Blasiolo D.A., Tebon Oler A., et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR // Traffic. - 2007. - V.8. - P.718-732.
24. Persson L., Galman C., Angelin B., Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors // Endocrinology. - 2009. - V.150. - P.1140-1146.

25. Rashid S., Curtis D.E., Garuti R., et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9 //PNAS. - 2005. - V.102. - P.5374-5379
26. Scartezini M., Hubbart C., Whittall R.A., et al. The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men // Clin. Sci. (Lond). -2007. - V.113. - P.435-441.
27. Schmidt R.J., Zhang Y., Zhao Y., et al. A novel splicing variant of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 // DNA. Cell. Biol. - 2008. - V.27. - P.183-189
28. Seidah N.G. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia // Expert. Opin. Ther. Targets. - 2009. - V.13. - P.19-28.
29. Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L., et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation //PNAS. - 2003. - V. 100. - P.928-933.
30. Seidah N.G., Prat A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu // Essays Biochem. ? 2002. - V.38. - P.79-94.
31. Sirois F., Gbeha E., Sanni A., et al. Ethnic differences in the frequency of the cardioprotective C679X PCSK9 mutation in a West African population // Genet. Test. -- 2008. - V.12. - P.377-380.
32. Sun X.M., Eden E.R., Tosi I., et al. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia //Hum. Mol. Genet. -2005. - V.14. - P. 1161-1169.
33. Timms K.M., Wagner S., Samuels M.E., et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree //Hum. Genet. - 2004. -V. 114. - P. 349-353.
34. Varret M., Rabes J.P., Saint-Jore B., et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32 // Am. J. Hum. Genet. -1999. - V.64. - P.1378-1387.
35. Yue P., Averna M., Lin X., Schonfeld G. The c.43_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population // Hum. Mutat. ? 2006. - V.27. - P.460-466.

J. PANCHYSHYN

GENE PCSK9 AS CAUSE OF DISTURBANCE OF LIPID METABOLISM

Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) is a secreted glycoprotein that regulates the degradation of the low-density lipoprotein receptor. Single nucleotide polymorphisms in its gene associate with both hypercholesterolemia and hypocholesterolemia. The identification of PCSK9 regulation by these various treatments is important in understanding of the physiological function of this protein, and points to new targets for therapeutic treatments to increase hepatic LDLR numbers.

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра внутрішньої медицини №2, e-mail juliya.panchyshyn@rambler.ru

Дата поступлення: 10.03.2009 р.