

Una nueva mutación en el promotor del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad asociada a hipercolesterolemia familiar en homocigosis y heterocigosis

Patricia Esperón^{a,b}, Víctor Raggio^a y Mario Stoll^a

^aÁrea de Genética Molecular. Comisión Honoraria Para la Salud Cardiovascular. Montevideo. Uruguay.

^bCátedra de Biología Molecular. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad hereditaria, relativamente frecuente y asociada al desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria prematuras. En este trabajo, describimos el hallazgo de una nueva mutación (-47C>A) en la región promotora del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (rLDL), principal encargado de este fenotipo. Esta mutación se identificó en una familia uruguaya con un fenotipo típico de HF, en la cual aparecen individuos heterocigotos y homocigotos para la mutación debido a la existencia de consanguinidad. El cambio nucleotídico ocurre en un sitio conservado y funcionalmente relevante del promotor; región en la que anteriormente se han descrito diversas mutaciones que provocan descensos drásticos en la actividad transcripcional del gen. No se han detectado otras variantes en las regiones analizadas del gen.

Los análisis genéticos del rLDL asociados a otros genes de susceptibilidad permiten establecer un perfil genómico de riesgo cardiovascular, de aplicación muy necesaria en el tratamiento clínico de familias con HF.

Palabras clave:

Receptor de LDL. cLDL. Enfermedad cardiovascular. Región promotora. Hipercolesterolemia familiar.

A NEW MUTATION IN THE LDL RECEPTOR PROMOTER GENE ASSOCIATED WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA IN HOMO AND HETEROZYGOSIS

Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited disease, relatively frequent and associated with premature development of atherosclerosis and coronary heart disease. We report a family with several members affected by FH whose phenotype was presumably caused by a substitution of a cytosine by adenine in the promoter region (-47C>A) of the LDL receptor gene (LDLR). This mutation was identified in an Uruguayan family with a typical phenotype of HF in which there are hetero and homozygous individuals for the mutation, due to inbreeding. This mutation, which has not previously been described, is located on a conserved and functionally relevant domain of the promoter. In this region several mutations have been previously described and it has been demonstrated that they cause drastic decrease in LDLR gene transcriptional activity. No other sequence variants have been detected in the sequenced LDLR gene regions.

A molecular analysis of LDLR gene together with other susceptibility genes allows establishing a genomic profile of cardiovascular risk, highly

Correspondencia: Dr. M. Stoll.
Área de Genética Molecular.
Comisión Honoraria Para la Salud Cardiovascular.
Bvar. Artigas, 2358. 11800 Montevideo. Uruguay.
Correo electrónico: mstoll@montevideo.com.uy

Recibido el 3 de julio de 2008 y aceptado el 17 de octubre de 2008.

applicable in the clinical management of families with FH.

Key words:

LDL receptor. LDL-C. Cardiovascular disease. Promoter region. Familial hypercholesterolemia

La hipercolesterolemia familiar (HF) (OMIM #143890) es una enfermedad hereditaria, autosómica, generalmente con una presentación dominante, asociada al desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria. La frecuencia estimada es de 1:500 en la forma heterocigota, mientras que en su presentación homocigota la frecuencia desciende a valores de 1:1.000.000. Los pacientes con HF suelen presentar valores de colesterol total (CT) y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) muy elevados, así como xantomas tendinosos y/o arco corneal como manifestación del depósito tisular de colesterol¹.

En más del 80% de los casos, la causa genética de la HF se encuentra principalmente en mutaciones del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (rLDL) ubicado en el cromosoma 19 y hasta la fecha se ha informado de más de 900 mutaciones patogénicas². Otros *loci*, como el de la apolipoproteína (Apo) B100 (mutación R3500)³ y el de PCSK9⁴ también se han correlacionado con la etiopatogenia de la HF dominante.

El estudio concomitante de los datos clínicos, bioquímicos y moleculares, realizado en una población de 57 pacientes, nos permitió encontrar en una familia con HF una mutación aún no descrita en la región regulatoria (promotor) del gen del rLDL. En esta familia, donde aparece consanguinidad, hallamos individuos que presentan la mutación en forma homocigota y otros en forma heterocigota, con claras diferencias en los valores séricos de colesterol total y cLDL.

Pacientes y métodos

Estudiamos a los integrantes de una familia con antecedentes de dislipemia grave con valores de colesterol muy elevados y episodios cardiovasculares tempranos estudiados previamente por Alallón et al⁵. Luego de establecer el diagnóstico de HF en el paciente índice y tras obtener el consentimiento escrito, se le realizó un estudio genético. A partir del ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído de sangre periférica se realizó la amplificación por PCR de los 18 exones y la región promotora del gen del rLDL. Las condiciones y *primers* utilizados fueron los descritos por Hobbs et al⁶. Después, los productos amplificados se secuenciaron de forma automática en un equipo ABI PRIS 377 (Perkin Elmer) con los mismos oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

Una vez que se encontró la mutación en la región promotora del gen del rLDL en el paciente índice, se secuenció esta región a partir de los productos amplificados por PCR de los ADN de los familiares que participaron en este estudio.

También se analizó a los pacientes para la determinación de la mutación ApoB R3500Q⁷ y para los polimorfismos Cys112Arg y Arg158Cys del gen de la ApoE por análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)⁸.

Todos los integrantes de la familia dieron su consentimiento informado por escrito y el Comité de Ética de la Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular aprobó el estudio.

Resultados

Caso clínico

Se analizó a una familia detectada a partir del caso índice JSC de sexo masculino de 55 años de edad, referido para su evaluación a la policlínica de genética, debido a una dislipemia grave, diagnosticada a los 31 años, con cifras máximas de CT de 714 mg/dl (tabla 1). El paciente es hipertenso leve, ex fumador, presentó desarrollo progresivo de xantomas en codo y dorso de mano, xantelasmas y halo corneano. A los 30 años tuvo un infarto agudo de miocardio (IAM). A los 42 años se demuestra por coronariografía una lesión de 3 vasos (lesión suboclusiva en descendente anterior; múltiples lesiones suboclusivas en circunfleja y ectasia del tronco coronario derecho), por lo que se le realizaron 2 *bypass*. A los 52 años, ante la reaparición de la sintomatología, se le realiza una nueva coronariografía que muestra: lesión moderada de tronco de coronaria izquierda; lesión proximal de circunfleja; segundo ramo marginal ocluido en tercio medio; descendente anterior ectásica con lesión grave en tercio proximal; ramo diagonal ectásico que se ocluye en tercio medio; coronaria derecha ectásica con irregularidades difusas de la pared con lesión moderada en tercio proximal; puente venoso aorta-descendente posterior ocluido. El ecocardiograma mostró hipertrofia del ventrículo izquierdo, disfunción diastólica, doble lesión de válvula aórtica calcificada con estenosis moderada e insuficiencia leve.

De la historia familiar destaca (fig. 1): el caso índice es hijo de un matrimonio consanguíneo (los padres son primos hermanos). La madre (83) presenta dislipemia e hipertensión, estenosis aórtica grave, sin elementos de isquemia miocárdica. El padre falleció por cáncer vesical a los 83 años, se desconocen otros datos. Tenía un hermano gemelo monocigótico que falleció a los 38 años por IAM; otro hermano varón falleció a los 29 años por muerte súbita cardiovascular, así como 2 hermanas dislipémicas: una con cifras de CT > 400 mg/dl y otra hermana (45) dislipémica (con cifras de CT su-

Tabla 1. Datos fenotípicos de los individuos analizados en el ámbito molecular. Se muestran las características de los 12 individuos analizados

| N.º en general | Sexo | Edad | Estado rLDL | CT (mg/dl) | cLDL (mg/dl) | cHDL (mg/dl) | TG (mg/dl) | ApoE | Signos ^a | CV ^b |
|----------------|------|------|--------------|------------|--------------|--------------|------------|-------|---------------------|-----------------|
| I | M | 83 | Heterocigoto | 327 | 257 | 32 | 161 | E3/E3 | + | - |
| II | M | 51 | Heterocigoto | 190 | SD | SD | 105 | E3/E3 | - | - |
| III | V | 55 | Homocigoto | 714 | 629 | 42 | 430 | E2/E3 | + | + |
| IV | M | 48 | Homocigoto | 482 | 430 | 20 | 148 | E3/E3 | + | + |
| V | V | 47 | Heterocigoto | 380 | SD | SD | SD | E3/E3 | + | + |
| VI | M | 45 | Homocigoto | 646 | 570 | 50 | 130 | E3/E3 | + | - |
| VII | V | 25 | Heterocigoto | 292 | SD | SD | SD | E3/E3 | - | - |
| VIII | M | 26 | Heterocigoto | 200 | SD | SD | SD | E3/E3 | - | - |
| IX | V | 23 | Heterocigoto | 360 | SD | SD | SD | E3/E4 | - | - |
| X | M | 16 | Heterocigoto | 320 | SD | SD | SD | E3/E3 | - | - |
| XI | M | 22 | Heterocigoto | 246 | SD | SD | SD | E3/E3 | - | - |
| XII | V | 5 | Normal | 158 | SD | SD | SD | E3/E3 | - | - |

ApoE: apolipoproteína E; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; CT: colesterol total; CV: cardiovascular; M: mujer; rLDL: receptor de las lipoproteínas de baja densidad; SD: sin datos TG: triglicéridos; V: varón.

Los valores de perfil lipídico mostrados son sin medicación hipolipemiente.

^aPresencia de xantomas, xantelasmas o arco corneal.

^bPresencia de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica demostrada en cualquier territorio o con cualquier manifestación clínica.

periores a 600 mg/dl) y a la que se ha revascularizado mediante *bypass*. Hijo (27) con CT > 300 mg/dl, así como varios sobrinos; 2 hijos fallecidos por enfermedad neoplásica.

El diagnóstico positivo de HF se basó en valores elevados de CT con predominio de cLDL, antecedentes de enfermedad arteriosclerótica prematura y un patrón de herencia compatible con transmisión dominante. Por otra parte, el análisis genealógico explica el hallazgo de individuos con una expresión más grave en la generación IV (fig. 1), con posibles portadores de una mutación en homocigosis.

Análisis moleculares

Se analizó el ADN genómico de los integrantes de la familia estudiada en busca de mutaciones en el gen del rLDL. Se constató que el paciente índice presentaba, en la secuencia de ADN correspondiente al promotor proximal, una transversión C>A en la posición -47, en estado homocigoto, al igual que 2 de sus hermanas, mientras que los hijos con diagnóstico clínico de HF eran heterocigotos para esta mutación (fig. 2). En las regiones analizadas del gen, no se detectaron otras variantes en la secuencia.

Esta mutación puede confirmarse mediante análisis de restricción de los productos amplificados por PCR: la presencia de una A en posición -47 destruye el sitio de restricción de la enzima *MnII*. De esta forma, es posible realizar un diagnóstico más rápido de otros integrantes de la familia.

En relación con el polimorfismo analizado de la ApoE, el probando era E2/E3, uno sobrino era E3/E4 y los demás integrantes eran E3/E3.

El probando y los miembros de su familia eran homocigotos para el alelo normal de ApoB-100 en el codón 3500.

Discusión

Hemos identificado una mutación puntal -47C>A ubicada en la región promotora proximal de 245 pb del gen del receptor de LDL, en una familia con diagnóstico clínico de HF. El paciente índice y 2 de sus hermanos son homocigotos para esta mutación.

La mutación -47C>A se ubica en el promotor del rLDL en el sitio de unión proximal del factor de transcripción Sp1 (repetido R3), funcionalmente relevante para lograr la transactivación del gen del rLDL por esteroides⁹. El R3 es el miembro más proximal de una tríada de repetidos imperfectos y contiene 9/10 pb que emparejan con la secuencia consenso GC. La mutación -47C>A aquí descrita modifica la secuencia de R3 y la diferencia del consenso GC (fig. 3). Se ha informado acerca de varias mutaciones en el repetido R3 que producen también un fenotipo de HF y reducen marcadamente la actividad del promotor hasta un 5-15% del valor normal^{2,10,11}. Adicionalmente, estudios de transfección mostraron que el reemplazo al azar en la región media de la secuencia del R3 conduce a una pérdida de actividad transcripcional¹².

Si bien no contamos con estudios *in vitro* que demuestren una disminución de la actividad transcripcional como consecuencia de la mutación -47C>A, consideramos que ésta es la causa del fenotipo HF encontrado en esta familia, debido a que:

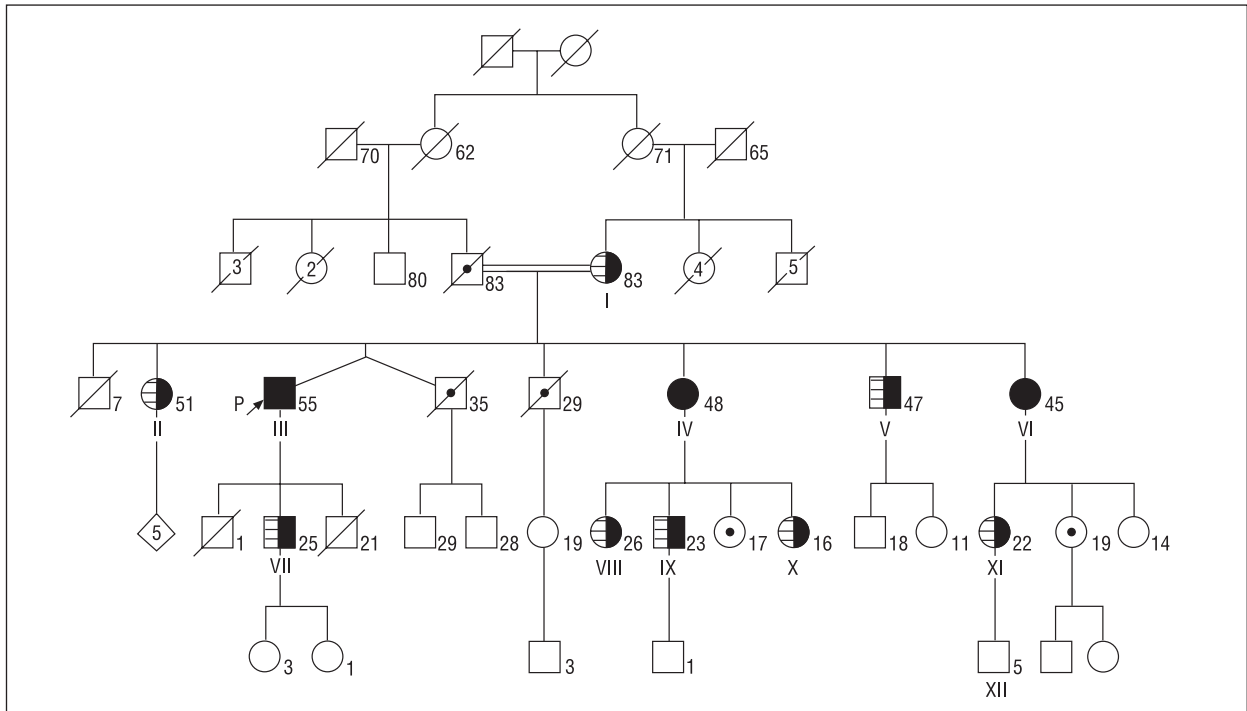


Figura 1. Genealogía de la familia analizada. El paciente índice (paciente III) está indicado por una flecha. Los miembros de la familia homocigotos para la mutación $-47C>A$ son marcados con símbolos llenos, los heterocigotos con símbolos semillenos. Los individuos marcados con un punto son casos con presumible hipercolesterolemia familiar (por cifras de colesterol total o antecedentes de enfermedad arteriosclerótica temprana), pero en los que no se tiene confirmación en el ámbito molecular. Los números romanos debajo de algunos individuos remiten a la tabla 1. Los números a la derecha del símbolo corresponden a la edad.

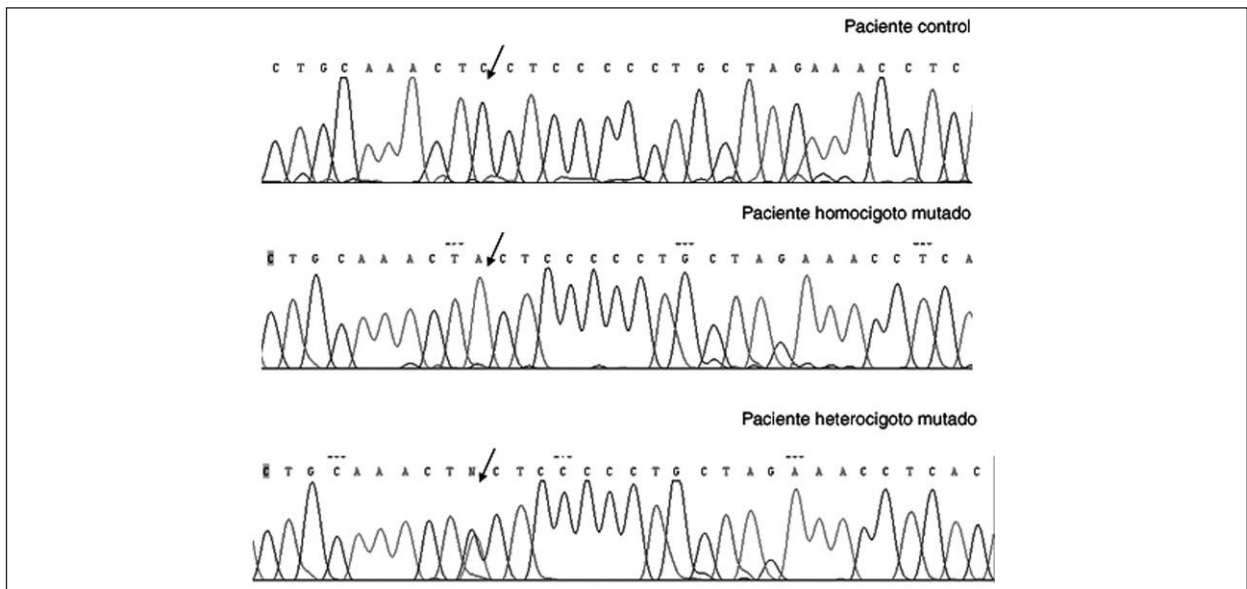


Figura 2. Comparación de la secuencia de nucleótidos en la región reguladora analizada en un individuo normal homocigoto, un paciente heterocigoto y un paciente homocigoto mutado. La flecha indica el cambio $C>A$ en posición -47 (numeración de acuerdo al sitio de inicio de la traducción).

a) esta mutación no se encontró en otros pacientes con fenotipo de HF, ni en individuos sanos del Uru-

guay; b) la misma se da en un sitio conservado y funcionalmente relevante para la regulación de la

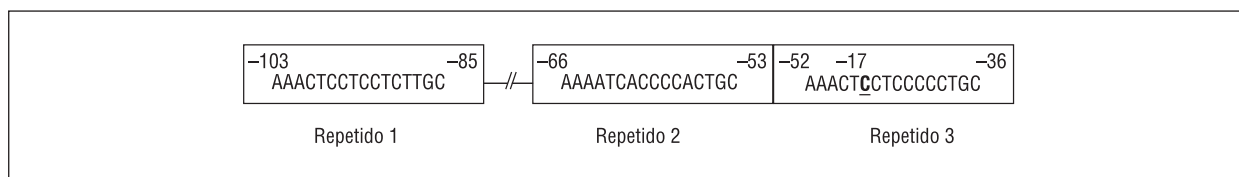


Figura 3. Secuencia nucleotídica de los elementos en cis del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad que regulan la transcripción basal y mediada por colesterol. Estos elementos se disponen en 3 repeticiones directas imperfectas de 16 pb ricas en GC. La mutación -47C>A aquí descrita se indica subrayada y en negrita.

transcripción del gen, como demuestra el análisis de otras mutaciones vecinas; *c*) se aprecia un efecto claro de dosis génica, ya que el fenotipo de los portadores heterocigotos de la mutación es más leve que el de los homocigotos (valores promedio de CT de 289 frente a 615 mg/dl). Los pacientes homocigotos, además, tienen antecedentes de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica prematura y valores de colesterol que en algunos casos exceden los 700 mg/dl.

Suponemos que la mutación analizada no causa una disminución tan drástica de la actividad transcripcional como otras descritas, ya que: *a*) los valores de CT en homocigotos, si bien marcadamente elevados, no exceden los 714 mg/dl; *b*) 2 individuos heterocigotos de sexo femenino de 51 y 26 años tienen valores de CT dentro del rango normal, y *c*) la expresividad clínica cardiovascular, si bien temprana y grave en relación con la población general, no es tan grave como la descrita en otros casos de HF homocigota.

Otro polimorfismo analizado fue el de la ApoE, reconocido factor modificador del riesgo cardiovascular y de dislipemias¹³. Si bien la mayoría de los pacientes son E3/E3, el probando, el cual ha tenido la expresión fenotípica más grave e hipertrigliceridemia, es E2/E3. Algunos estudios muestran que los pacientes con HF portadores del alelo E2 muestran un fenotipo dislipémico con más aumento de CT e hipertrigliceridemia y un riesgo mayor de afectación arteriosclerótica¹⁴.

En conclusión, en el marco de un programa sistemático para identificar mutaciones que causan HF en el Uruguay, encontramos una mutación puntual, no descrita previamente, en la región promotora del gen del rLDL. En esta familia, el diagnóstico molecular explica los fenotipos encontrados y permite identificar individuos que portan la mutación y, por lo tanto, tienen riesgo de desarrollar dislipemias graves y enfermedad cardiovascular. Esta información resulta de utilidad para la prevención, sobre todo en pacientes que aún no presentan signos de la enfermedad y que de otro modo podrían

considerarse de forma errónea como de riesgo cardiovascular bajo.

Bibliografía

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolaemia. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D, editores. The metabolic and molecular basis of inherited disease III. New York: McGraw Hill; 2001. p. 2863-914.
- Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial Hypercholesterolemia and Coronary Heart Disease: A HuGE Association Review. *Am J Epidemiol.* 2004;160:421-9.
- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 1990;31:1337-49.
- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-6.
- Alallón W, Ravera J, Gugliucci A, Romero C, Tavella N, Bruno J. Hipercolesterolemia Familiar. A propósito de una familia. Comunicación personal; 2002.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992;1:445-66.
- Hansen PS, Rudiger N, Tybjaerg-Hansen A, Faergeman O, Gregersen N. Detection of the apoB-3500 mutation (glutamine for arginine) by gene amplification and cleavage with MspI. *J Lipid Res.* 1991;32:1229-33.
- Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H, Amit Y, Kornbrot N, Seligsohn U. Improved Method for Genotyping Apolipoprotein E Polymorphisms by a PCR-Based Assay Simultaneously Utilizing Two Distinct Restriction Enzymes. *Clinical Chemistry.* 1997;43:1657-9.
- Li C, Briggs MR, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J. Requirement of Sp1 and Estrogen Receptor -Interaction in 17β-Estradiol-Mediated Transcriptional Activation of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Expression. *Endocrinology.* 2001;142:1546-53.
- Mozas P, Galetto R, Albajar M, Ros E, Pocoví M, Rodríguez-Rey JC. A mutation (-49C>T) in the promoter of the low density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2002;43:13-8.
- Smith AJ, Ahmed F, Nair D, Whittall R, Wang D, Taylor A, et al. A functional mutation in the LDLR promoter (-139C>G) in a patient with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:1186-9.
- Dawson PA, Van der Westhuyzen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-dependent Repression of Low Density Lipoprotein Receptor Promoter Mediated by 16-Base Pair Sequence Adjacent to Binding Site for Transcription Factor Sp1. *J Biol Chem.* 1988;263:3372-9.
- Eichner JE, Dunn S, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stoehla BC. Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. *Am J Epi.* 2002;155:487-95.
- Hopkins PN, Wu LL, Schumacher MC, Emi M, Hegele RM, Hunt SC, et al. Type III dyslipoproteinemia in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E2. Evidence for a gene-gene interaction. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1137-46