

Клеточные модели семейной гиперхолестеринемии – новые горизонты борьбы с атеросклерозом

Захарова И.^{1*}, Шевченко А.¹, Слепцов А.³, Назаренко М.³, Тмоян Н.², Зуева А.^{1, 4}, Арссан А.^{1, 4}, Елисафенко Е.¹, Шевченко В.¹, Зарубин А.³, Ежов М.², Кухарчук В.², Парфёнова Е.², Закиян С.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Москва, Россия

³ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* zakharova@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; атеросклероз; клеточные модели; дифференцировка ИПСК; эндотелиоциты

Мотивация и цель: В настоящее время крайне актуальной задачей является создание клеточных моделей семейной гиперхолестеринемии (СГХС) – наследственного моногенного заболевания, приводящего к атеросклерозу и повышенному риску сердечно-сосудистых патологий. Несмотря на высокую частоту встречаемости (1 на 250 человек для гетерозиготной формы, до 1 на 300 тыс. – 1 млн человек – для гомозиготной) и всемирную озабоченность общественного здравоохранения, эффективность помощи пациентам остается крайне низкой. По данным 2022 года, менее 3 % пациентов в мире, проходящих лечение в связи с СГХС, достигают целевых показателей холестерина липопротеинов низкой плотности. Широкая распространенность, отсутствие общедоступного эффективного лечения и удобных релевантных моделей делают актуальным разработку клеточных моделей СГХС, отвечающих требованиям современной трансляционной медицины. Большинство случаев семейной гиперхолестеринемии вызваны патогенными аллельными вариантами в гене рецептора липопротеинов низкой плотности *LDLR*. Основная роль в патогенезе СГХС принадлежит рецепторам ЛПНП в клетках печени, ответственным за интернализацию холестерина и его последующий метаболизм. Повышенный уровень холестерина ЛПНП в крови также влияет на кровеносные сосуды и сосудистые клетки посредством накопления липидов внутри интимы, вызывая окислительный стресс, рекрутирование воспалительных клеток и локальную продукцию цитокинов. Это приводит к эндотелиальной дисфункции и образованию атером в артериях, корне аорты и клапанах с последующим развитием более тяжелых патологий. Несмотря на то что эндотелий участвует в патогенезе СГХС, мало известно о том, как сосудистые эндотелиальные клетки различаются у людей с нормальными и патогенными аллелями *LDLR*. Целью данной работы является получение изогенной системы линий ИПСК пациентов с СГХС, их релевантных дифференцированных производных и васкуляризированных гепатоорганоидов на их основе.

Методы и алгоритмы: ИПСК получены путем репрограммирования мононуклеарных клеток пациентов с использованием неинтегрирующих

эписомных векторов. Полученные линии ИПСК пациентов с СГХС охарактеризованы по требованиям Европейского реестра плюрипотентных стволовых клеток человека <https://hpscereg.eu/>. Плюрипотентность подтверждена с помощью иммунофлуоресцентной окраски антителами к маркерам плюрипотентности, полуколичественной оценки экспрессии генов плюрипотентности методом ПЦР в режиме реального времени, иммунофлуоресцентного анализа способности образовывать производные трех зародышевых листков. Подтверждение наличия аллельных вариантов гена *LDLR* в полученных ИПСК выполнено посредством секвенирования по Сенгеру. Подтверждение генетической идентичности ИПСК и моноклеональных клеток, из которых они получены, проводилось посредством STR-анализа. Фази́рование патологических аллельных вариантов гена *LDLR* выполнено с помощью секвенирования Oxford Nanopore. В ходе работы проведена направленная дифференцировка ИПСК в эндотелиальном, мезенхимальном стромальном и гепатоцитарном направлениях, получены васкуляризированные гепатоорганойды. Характеристика клеток проводилась методами иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитометрии. Для характеристики эндотелиоцитов использовался тест на ангиогенез *in vitro*, анализ способности поглощать меченные липопротеины низкой плотности. Секвенирование РНК проводили на платформе Illumina HiSeq 1500. Получение генетически модифицированных изогенных линий ИПСК проводили методом редактирования оснований (base editing) с использованием редакторов цитозиновых оснований BE4 и адениновых оснований ABE7.10.

Результаты: В результате работы получены и охарактеризованы 9 линий ИПСК от пациентов-компаундных гетерозигот по патогенным аллельным вариантам гена *LDLR* с тяжелыми клиническими проявлениями СГХС: с.530C>T/с.1054T>C; с.2141-966_2390-330del/с.1327T>C; с.1246C>T/с.940+3_940+6del/с.940+3_940+6del. 3 линии зарегистрированы в Европейском реестре плюрипотентных стволовых клеток hPSCreg [1-3]. С помощью нанопорового секвенирования показано, что патогенные аллельные варианты гена *LDLR* в геномах всех пациентов располагаются в транс-положении [4].

В данной работе впервые получены и исследованы эндотелиальные производные ИПСК пациентов с СГХС. Обнаружено, что эндотелиальные производные, полученные из ИПСК, экспрессируют белок LDLR, который в нормальных клетках выявляется преимущественно в зрелой форме [5]. Эндотелиальные клетки, полученные из ИПСК пациентов с СГХС, демонстрируют пониженный уровень зрелого LDLR и сниженную способность к интернализации липопротеинов низкой плотности. Кроме того, эндотелиальные клетки с мутантным *LDLR* обнаруживают специфический профиль транскриптома с пониженной регуляцией генов транспорта монокарбоновых кислот, экзоцитоза и клеточной адгезии, а также с усиленной регуляцией сигнальных путей клеточной секреции и активации лейкоцитов.

ИПСК пациентов с СГХС дифференцированы также в гепато- и мезенхимальные стромальные производные. На их основе с добавлением эндотелиальных производных получены васкуляризированные гепатоорганойды. В результате секвенирования РНК обнаружено, что в гепатоорганойдах подавлялось большинство генов, связанных с биологическими процессами (регуляция активации клеток/лейкоцитов, позитивная регуляция сигнального пути Wnt,

регуляция роста клеток, клеточный ответ на химический стресс). Среди генов с повышенной экспрессией обнаружены гены, связанные с регуляцией сборки белково-липидного комплекса (GO:0065005, BIN1, SOAT2, MFSD2A).

С использованием CRISPR-Cas9-опосредованного редактирования оснований получены изогенные линии ИПСК пациента-компацдной гетерозиготы с.530C>T/с.1054T>C со скорректированными аллельными вариантами гена *LDLR*. В одной линии произошла коррекция патогенного аллельного варианта с.530C>T до «здорового» с.530C. Таким образом, данная линия после коррекции представляет собой гомозиготу по «здоровой» позиции с.530C и остается гетерозиготой по патогенному аллельному варианту с.1054T>C. В двух других линиях произошла коррекция гетерозиготной позиции с.530C/T до гомозиготы по «больному» с.530C>T варианту. Таким образом, эти две линии представляют собой гомозиготу по «больной» позиции с.530T и остаются гетерозиготами по патогенному аллельному варианту с.1054T>C. Продemonстрировано, что эндотелиальные производные генетически модифицированных ИПСК со скорректированным до «здорового» аллельным вариантом *LDLR* восстанавливают функциональность рецептора и имеют достоверно повышенный уровень интернализации меченной формы липопротеинов низкой плотности.

Выводы: Полученные ИПСК являются первой в России коллекцией ИПСК пациентов с разными формами патологических мутаций гена *LDLR*, представляющей собой доступный практически в неограниченных количествах материал для направленной дифференцировки в релевантные клеточные типы и исследования молекулярно-генетических основ атеросклероза, вызванного СГХС. Полученные результаты указывают на то, что эндотелиальные клетки пациентов с СГХС сами по себе более предрасположены к окислительному стрессу и воспалению, что вместе с повышенным внешним уровнем холестерина может ускорять эндотелиальную дисфункцию, способствуя более быстрому прогрессированию атеросклероза и других сердечно-сосудистых патологий, связанных с СГХС. Генетическая коррекция патогенного аллельного варианта гена *LDLR* восстанавливает функциональность рецептора ЛПНП. Полученные клеточные модели СГХС внесут вклад в исследование заболевания и эффективную разработку таргетных терапевтических препаратов.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ (№ 24-15-00346).

Cellular models of familial hypercholesterolaemia: new horizons in the fight against atherosclerosis

Zakharova I.^{1*}, Shevchenko A.¹, Sleptcov A.³, Nazarenko M.³, Tmoyan N.²,
Zueva A.^{1,4}, Arssan A.^{1,4}, Elisaphenko E.¹, Shevchenko V.¹, Zarubin A.³, Ezhov M.²,
Kukharchuk V.², Parfyonova Y.², Zakian S.¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² National Medical Research Centre of Cardiology Named after Academician E.I. Chazov, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Centre, RAS, Tomsk, Russia

⁴ Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia

* zakharova@bionet.nsc.ru

Key words: familial hypercholesterolemia; atherosclerosis; cell models; iPSC differentiation; endothelial cells

Motivation and Aim: Currently, an extremely urgent task is to create cell models of familial hypercholesterolemia (FH), a hereditary monogenic disease that leads to atherosclerosis and an increased risk of cardiovascular pathologies. Despite the high incidence of the disease (1 in 250 people for the heterozygous form, up to 1 in 300 thousand – 1 million people – for the homozygous form) and the worldwide public health concern, the effectiveness of patient care remains extremely low. As of 2022, less than 3 % of patients worldwide being treated for FH achieve LDL cholesterol targets. The pervasive prevalence, lack of publicly available effective treatment, and the absence of convenient relevant models make it imperative to develop cell models of FH that align with the standards of modern translational medicine. The majority of cases of familial hypercholesterolemia are attributable to pathogenic allelic variants in the low-density lipoprotein receptor gene (*LDLR*). The primary role in the pathogenesis of FH is attributed to LDL receptors in liver cells, which are responsible for the internalisation of cholesterol and its subsequent metabolism. Furthermore, elevated levels of LDL cholesterol in the bloodstream also affect blood vessels and vascular cells through the accumulation of intra-intimal lipids, which in turn causes oxidative stress, the recruitment of inflammatory cells, and the local production of cytokines. This results in endothelial dysfunction and the formation of atheromas in the arteries, aortic root and valves, with the subsequent development of more severe pathologies. Although the endothelium has been implicated in the pathogenesis of FH, there is a paucity of knowledge regarding the differences between vascular endothelial cells in individuals with normal and pathogenic *LDLR* alleles. The objective of this study is to establish an isogenic system of induced pluripotent stem cell (iPSC) lines derived from patients with FH, along with their relevant differentiated derivatives and vascularised hepatocyte organoids.

Methods and Algorithms: iPSCs are generated by reprogramming patient-derived mononuclear cells using non-integrating episomal vectors. The resulting iPSC lines from patients with FH were characterised in accordance with the requirements of the European Registry of Human Pluripotent Stem Cells (<https://hpscreg.eu/>). The pluripotency of the cells was confirmed using immunofluorescent staining with antibodies to pluripotency markers, semi-quantitative assessment of the expression of pluripotency genes using real-time PCR, and immunofluorescent analysis of the ability to form derivatives of the three germ layers. The presence of allelic variants of the *LDLR* gene in the obtained iPSCs was confirmed using Sanger sequencing. The genetic identity of the iPSCs and the mononuclear cells from which they were derived was confirmed using STR analysis. The phasing of pathological allelic variants of the *LDLR* gene was conducted using Oxford Nanopore sequencing. During the course of the study, the directed differentiation of iPSCs was conducted in three distinct directions, namely endothelial, mesenchymal stromal and hepatocyte. The resulting vascularised hepatocyte organoids were obtained. Cell characterisation was conducted via immunofluorescence analysis and flow cytometry. To characterise endothelial cells, an in vitro angiogenesis test was employed, whereby the ability to absorb labelled low-density lipoproteins was analysed. RNA sequencing was conducted on the Illumina HiSeq 1500 platform. Genetically modified isogenic iPSC lines were obtained by base editing using the BE4 cytosine base and ABE7.10 adenine base editors.

Results: The work yielded nine iPSC lines obtained and characterised from patients who were compound heterozygotes for pathogenic allelic variants of the LDLR gene with severe clinical manifestations of FH. These variants included c.530C>T/c.1054T>C; c.2141-966_2390-330del/c.1327T>C; and c.1246C>T/c.940+3_940+6del/c.940+3_940+6del. Three lines are registered in the European Pluripotent Stem Cell Registry (hPSCreg) [1-3]. The use of nanopore sequencing revealed that pathogenic allelic variants of the LDLR gene were located in the trans position in the genomes of all patients [4].

In this study, endothelial derivatives of iPSCs derived from patients with FH were obtained and studied for the first time. It was demonstrated that endothelial derivatives derived from iPSCs express the LDLR protein, which is predominantly expressed in the mature form in normal cells [5]. Endothelial cells derived from iPSCs from patients with FH exhibited reduced levels of mature LDLR and a reduced ability to internalise low-density lipoproteins. Furthermore, endothelial cells with a mutated LDLR exhibit a specific transcriptome profile, characterised by the downregulation of monocarboxylic acid transport, exocytosis, and cell adhesion genes, as well as the upregulation of cellular secretion and leukocyte activation signalling pathways.

Additionally, iPSCs derived from patients with FH can be differentiated into hepatocyte and mesenchymal stromal cell derivatives. Based on these findings, vascularised hepato-organoids were generated by the addition of endothelial derivatives. RNA sequencing revealed that the majority of genes associated with biological processes were suppressed in hepatoorganoids, including those involved in regulating cell/leukocyte activation, positive regulation of the Wnt signalling pathway, regulation of cell growth, and cellular response to chemical stress. Among the genes with increased expression, those associated with the regulation of protein-lipid complex assembly were identified (GO:0065005, BIN1, SOAT2, MFSD2A).

Isogenic iPSC lines from a patient with a heterozygous c.530C>T/c.1054T>C mutation in the LDLR gene were obtained using CRISPR-Cas9-mediated base editing. Allelic variants of the LDLR gene were corrected in these lines. In one line, the pathogenic allelic variant c.530C>T was corrected to the “healthy” c.530C. Consequently, the aforementioned line, following correction, is homozygous for the “healthy” position c.530C and remains heterozygous for the pathogenic allelic variant c.1054T>C. In two additional lines, the heterozygous position c.530C/T was corrected to homozygote for the “sick” c.530C>T variant. Consequently, these two lines are homozygous for the diseased position c.530T and remain heterozygous for the pathogenic allelic variant c.1054T>C. It has been demonstrated that endothelial derivatives of genetically modified iPSCs with the allelic variant of LDLR corrected to a “healthy” one restore the functionality of the receptor and have a significantly increased level of internalisation of the labelled form of low-density lipoprotein.

Conclusion: The obtained iPSCs represent the inaugural collection of iPSCs from patients with various forms of pathological mutations of the LDLR gene in Russia. This material is available in almost unlimited quantities, offering a valuable resource for targeted differentiation into relevant cell types and research into the molecular genetic basis of atherosclerosis caused by FH. The findings indicate that endothelial cells from patients with FH are themselves more susceptible to oxidative stress and inflammation. This, in conjunction with elevated extrinsic cholesterol levels, may accelerate endothelial dysfunction, contributing to a more rapid progression of atherosclerosis and other cardiovascular pathologies associated with FH. The findings indicate that

endothelial cells from patients with FH are themselves more susceptible to oxidative stress and inflammation. This, together with elevated extrinsic cholesterol levels, may accelerate endothelial dysfunction, contributing to more rapid progression of atherosclerosis and other cardiovascular pathologies associated with FH. The correction of a pathogenic allelic variant of the LDLR gene restores the functionality of the LDL receptor. The resulting cell models of FH will contribute to the study of the disease and the development of targeted therapeutic drugs, which will be effective in treating the disease.

Funding: The study is supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 24-15-00346).

Список литературы/References

1. Zakharova I.S. et al. Induced pluripotent stem cell line ICGi037-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to heterozygous p.Trp443Arg mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022;60:102703. doi 10.1016/j.scr.2022.102703
2. Zakharova I.S. et al. Induced pluripotent stem cell line ICGi038-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to compound heterozygous c.1246C > T/c.940 + 3_940 + 6del mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022;60:102702. doi 10.1016/j.scr.2022.102702
3. Zakharova I.S. et al. Induced pluripotent stem cell line ICGi036-A generated by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia caused due to compound heterozygous p.Ser177Leu/p.Cys352Arg mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022;59:102653. doi 10.1016/j.scr.2022.102653
4. Nazarenko M.S. et al. Calling and phasing of single-nucleotide and structural variants of the *Ldlr* gene using oxford nanopore MinION. *Int J Mol Sci.* 2023;24:4471. doi 10.3390/ijms24054471
5. Zakharova I.S. et al. iPSC-Derived Endothelial Cells Reveal LDLR Dysfunction and dysregulated gene expression profiles in familial hypercholesterolemia. *Int J Mol Sci.* 2024;25:689. doi 10.3390/ijms25020689