

Identificazione e caratterizzazione genetica-molecolare della ipercolesterolemia familiare omozigote in Italia (1989-2019)

Stefano Bertolini¹, Sebastiano Calandra²,
Gruppo di Studio dell'Ipercolesterolemia Familiare Omozigote*

¹Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università di Genova;

²Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena;

*Elenco nominativo dei collaboratori è indicato in calce

■ INTRODUZIONE

L'Ipercolesterolemia Familiare Omozigote (Ho-FH) è un raro disordine genetico a trasmissione autosomica co-dominante, caratterizzato da elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C), responsabili di un notevole accumulo di colesterolo in vari tessuti, in particolare nella parete arteriosa con lo sviluppo precoce di lesioni aterosclerotiche diffuse (1). Nella maggior parte dei casi la Ho-FH (85-95%) è dovuta a varianti patogenetiche (in passato definite mutazioni) in entrambi gli alleli del gene codificante il recettore delle LDL (*LDLR*); più raramente è dovuta a varianti patogenetiche bialleliche del gene *APOB* codificante l'apolipoproteina B (apoB) o a varianti patogenetiche, con guadagno funzione, del gene *PCSK9*, codificante l'enzima PCSK9 (1-4). I geni *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* sono indicati come i geni candidati maggiori della Ho-FH. L'assetto genotipico dei pazienti Ho-FH può essere variabile. Se i pazienti risultano essere portatori di due identiche va-

rianti patogenetiche del gene *LDLR* (ovvero di due identiche varianti patogenetiche di uno degli altri geni candidati *APOB* o *PCSK9*) essi sono definiti "omozigoti veri". Se i pazienti sono portatori di due differenti varianti patogenetiche dello stesso gene candidato (*LDLR*, *APOB* o *PCSK9*) essi sono definiti "eterozigoti-composti". Infine, se i pazienti sono portatori di due varianti patogenetiche singolarmente presenti in due geni candidati (es. una nel gene *LDLR* e l'altra nel gene *APOB* o nel gene *PCSK9*) essi sono definiti "doppi eterozigoti". Questa distinzione è importante per comprendere le relazioni fra genotipo (assetto delle varianti patogenetiche e geni coinvolti) ed il fenotipo (espressione clinica della malattia).

Essendo la Ho-FH classica una malattia genetica a trasmissione co-dominante, ne consegue che i genitori di un individuo affetto siano portatori di almeno una copia della variante responsabile della malattia (eterozigoti) e presentino livelli plasmatici di LDL elevati anche se in misura nettamente inferiore rispetto ai pazienti omozigoti (effetto di dosaggio genico).

Le varianti patogenetiche dei geni candidati che sono causa di Ho-FH determinano un grave difetto nel processo di rimozione delle

Autori corrispondenti

Prof. Stefano Bertolini
E-mail: sefbert42@gmail.com; stefbert@unige.it

Prof. Sebastiano Calandra
E-mail: sebcac@unimore.it

LDL plasmatiche mediato dal recettore LDL, con il conseguente accumulo di LDL nel plasma. Questo difetto di rimozione può coinvolgere direttamente il recettore LDL (nella maggior parte dei casi), ovvero la proteina ApoB responsabile del legame delle LDL al recettore LDL, ovvero la proteina PCSK9 responsabile della degradazione intracellulare del recettore LDL (1-4).

Le ricerche nel settore della Ho-FH hanno portato anche alla identificazione di “fenocopia” della Ho-FH classica, che si sono rivelate essere dovute a varianti patogenetiche di altri geni ed avere una trasmissione autosomica recessiva. In questo gruppo di condizioni rare sono comprese la Ipercolesterolemia Autosomica Recessiva (ARH) e la Sitosterolemia (vedi oltre).

In questa breve rassegna ci siamo proposti di riassumere l’esperienza nostra e di altri gruppi di ricerca italiani, nel campo della caratterizzazione genetico-molecolare di pazienti con diagnosi fenotipica di Ho-FH, identificati in Italia a partire dalla fine degli anni 80 del secolo scorso. Inoltre, grazie alla collaborazione di numerosi ricercatori italiani, abbiamo tentato di aggiornare il database dei pazienti, raccogliendo il maggior numero di informazioni riguardanti sia il fenotipo che il genotipo.

Il nostro interesse per la FH ha preso l’avvio dai risultati degli studi di Joseph Goldstein e Michael Brown a Dallas (Texas, USA), che alla metà degli anni settanta dimostrarono che i fibroblasti cutanei di soggetti normali incubati in coltura in presenza di LDL (isolate da individui normali) legavano con alta affinità le LDL, le internalizzavano e quindi le degradavano incorporando il colesterolo in esse contenuto (5, 6). Questi eventi (legame, internalizzazione e degradazione) non si verificano nei fibroblasti di alcuni pazienti Ho-FH. Questo difetto funzionale si rivelò essere dovuto ad assenza/mancata funzione di uno specifico recettore di membrana (Recettore LDL o *LDLR*) capace di legare le LDL con alta affinità, consentendone la loro internalizzazione e successiva degradazione intracellulare. La base fisiopatologica della Ho-FH consiste quindi in un difetto completo del recettore

LDL (*LDLR*) che determinava, a sua volta, un difetto di rimozione delle LDL del circolo. Parallelemente, un difetto “parziale” del *LDLR* fu dimostrato nei fibroblasti dei pazienti eterozigoti (He-FH), quali i genitori dei pazienti Ho-FH esaminati. A queste prime osservazioni ne sono seguite altre che hanno portato alla caratterizzazione strutturale della proteina recettoriale ed all’isolamento del gene codificante. Questi ulteriori scoperte hanno consentito di identificare, sempre nei fibroblasti in coltura, le alterazioni cellulari alla base del difetto funzionale del *LDLR*. Nello stesso tempo la clonazione del gene *LDLR* ha aperto la strada alla caratterizzazione delle varianti patogenetiche responsabili del difetto recettoriale in una serie di pazienti omo- ed eterozigoti FH identificati nel laboratorio di Dallas (7).

■ DIFETTO FUNZIONALE DEL *LDLR* NEI FIBROBLASTI DI Ho-FH ITALIANI

Le prime osservazioni di Goldstein e Brown sui fibroblasti di pazienti Ho-FH, ci hanno indotto ad applicare la loro metodologia (6) allo studio dei pazienti italiani, con due principali obiettivi:

- 1) avere una conferma diagnostica di supporto alla diagnosi clinica;
- 2) verificare se tutti pazienti Ho-FH italiani avessero effettivamente un difetto del *LDLR* o questo fosse confinato solo ad alcuni di essi.

Agli inizi degli anni 80 ci siamo proposti di valutare l’attività del *LDLR* nei fibroblasti di pazienti italiani con diagnosi clinica altamente probabile di Ho-FH, alcuni di quali erano stati identificati e descritti da alcuni gruppi italiani (in particolare dal gruppo del Prof. Mario Mancini, Università di Napoli) (8-12), che hanno poi inviato ai nostri laboratori i campioni biologici (biopsie cutanee) per la coltura dei fibroblasti e l’allestimento di una banca cellulare dei pazienti Ho-FH. I pazienti da noi esaminati erano stati classificati come Ho-FH, applicando consolidati criteri clinici quali:

- 1) livelli di LDL-C ≥ 500 mg/dl;

- 2) presenza di xanthomi e xanthelasma fino dai primi anni di vita;
- 3) presenza di elevati livelli di LDL-C in entrambi i genitori (He-FH).

Nel corso degli anni lo studio della funzionalità recettoriale nei fibroblasti è stata condotta complessivamente in 32 pazienti. Nel 98% dei casi si è dimostrato un difetto di funzione del *LDLR* di severità variabile. Mentre in alcuni pazienti il difetto risultava essere completo (attività recettoriale residua <5%) in altri era dimostrabile un'attività recettoriale residua variabile dall'8 al 30%. (rispetto a quella riscontrata nei fibroblasti dei soggetti controllo). Da questi risultati è emerso che l'attività recettoriale residua presentava una correlazione negativa con i livelli di LDL-C nel plasma; ad attività recettoriale residua "nulla" (<5%) corrispondevano livelli più elevati di LDL nel plasma (13). Questo suggeriva la presenza di diversi tipi di varianti patogenetiche del gene *LDLR* nei pazienti esaminati (come poi dimostrato dagli studi molecolari) (vedi oltre).

Nel corso di questo studio ci siamo imbattuti in alcuni casi nei quali, a fronte di un quadro fenotipico di Ho-FH, non era dimostrabile un difetto del *LDLR* nei fibroblasti in coltura. Si trattava di pazienti nei quali il fenotipo Ho-FH aveva una chiara trasmissione di tipo recessivo, suggerendo una patogenesi differente rispetto a quelle della classica Ho-FH da difetto recettoriale. Gli studi molecolari successivi hanno dimostrato il coinvolgimento di un altro gene (*LDLRAP1*) che codifica per una proteina adattatrice coinvolta nel posizionamento del *LDLR* nelle fossette rivestite della membrana plasmatica degli epatociti, ma non dei fibroblasti (vedi oltre).

■ LO STUDIO DEI GENI CANDIDATI DELL'FH NEI SOGGETTI ITALIANI CON FENOTIPO FH OMOZIGOTE A TRASMISSIONE AUTOSOMICA CO-DOMINANTE

La disponibilità di sonde molecolari per il gene *LDLR*, generosamente inviate dal labo-

ratorio Dallas, ci ha permesso di avviare la caratterizzazione genetica-molecolare dei nostri pazienti Ho-FH. Questo studio ha avuto varie fasi, in larga misura dipendenti dal progressivo affinamento delle metodologie di sequenziamento genico. In una prima fase abbiamo ricercato polimorfismi genici del gene *LDLR* e la loro co-segregazione con la FH (14, 15); poi ci siamo concentrati sulla ricerca di varianti patogenetiche grossolane (larghe delezioni ed inserzioni esoniche), dimostrando che tali varianti erano presenti in un numero ristretto di pazienti Ho-FH (13, 16). Successivamente, con il perfezionamento delle tecniche di sequenziamento abbiamo avuto la possibilità di identificare varianti minute e puntiformi del gene *LDLR* (le varianti patogenetiche prevalenti) (17, 18). Lo studio di tali varianti è stato in molti casi esteso ai familiari dei pazienti Ho-FH, per una ulteriore conferma della modalità di trasmissione co-dominante. L'analisi del gene *LDLR* ha documentato una grande eterogeneità delle varianti patogenetiche e confermato l'esistenza di pazienti "omozigoti veri" così come di pazienti "eterozigoti composti" ed, in misura minore, di pazienti "doppi eterozigoti". Nell'arco temporale di 30 anni (1989-2019) in varie "Lipid Clinics" distribuite su tutto il territorio nazionale sono stati identificati, geneticamente caratterizzati e trattati con procedure aferetiche e presidi farmacologici, di efficacia progressivamente crescente nel corso degli anni, circa 120 pazienti con le caratteristiche cliniche della Ho-FH (in dettaglio 60 "omozigoti veri" e 60 "eterozigoti composti" o "doppi eterozigoti"). In tali pazienti sono state attualmente identificate: 80 differenti varianti patogenetiche del gene *LDLR* (11 delezioni/duplicazioni esoniche, 5 delezioni/duplicazioni nucleotidiche minute, 64 sostituzioni nucleotidiche puntiformi esoniche o introniche); una variante del gene *APOB* e due varianti del gene *PCSK9*. Le varianti del gene *LDLR* sono state classificate in due categorie in base al loro potenziale impatto biologico: i) varianti patogenetiche "recettore negative" che impedivano la formazione del recettore o ne abolivano completamente la funzione;

ii) varianti patogenetiche “recettore difettive” che riducevano ma non abolivano completamente l’attività del recettore (13, 17).

I pazienti recettore negativi (*LDLR*-NEG), che rappresentavano circa il 25% dell’intera popolazione Ho-FH, presentano un profilo clinico e biochimico decisamente più severo di quello rilevato nei pazienti recettore difettivi (*LDLR*-DEF): concentrazioni plasmatiche medie di colesterolo LDL di 20 vs 13 mmol/L e di colesterolo HDL di 0,8 vs 1,1 mmol/L; una più precoce diagnosi clinica e genetica, in relazione alle più gravi e premature manifestazioni cliniche (in particolare xantomatosi cutanea nella prima infanzia ed eventi cardiovascolari ad una età media di 22,5 vs 46,5 anni) ed una età al decesso di alcuni pazienti durante il follow-up di 26 vs 44 anni. Tale differenza è stata documentata anche da altri gruppi di ricerca in altri paesi che hanno osservato che anche la risposta alla terapia ipolipemizzante era più efficace nei pazienti “recettore difettivi” rispetto ai pazienti “recettore negativi” (19-22).

L’Ho-FH dovuta a varianti patogenetiche negli altri due geni candidati (*APOB* e *PCSK9*) è stata riscontrata in un numero di pazienti molto ridotto in ragione della frequenza estremamente bassa di varianti patogenetiche di questi due geni nella popolazione Italiana (17). Non abbiamo attualmente riscontrato nessun paziente con varianti patogenetiche bialleliche con guadagno di funzione del gene *PCSK9*. Come atteso abbiamo identificato solo pochi pazienti doppi eterozigoti (4 pazienti *LDLR/APOB*, 3 dei quali non-relati, e 3 pazienti *LDLR/PCSK9*, 2 dei quali non relati) (17, 23).

Viene spontanea la domanda se vi siano pazienti italiani con fenotipo Ho-FH a trasmissione autosomica co-dominante senza mutazioni dei geni candidati (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*). Al momento una condizione di questo genere, che potrebbe derivare dal coinvolgimento di altro gene ancora ignoto, non è stata riscontrata nei pazienti Italiani con fenotipo Ho-FH genotipizzati, e non ci risulta che una simile condizione sia stata descritta da altri autori in altri paesi.

I gruppi di ricerca Italiani che hanno dato un significativo contributo alla caratterizzazione molecolare dei pazienti Ho-FH, hanno anche avviato la costituzione di una rete di centri clinici e di laboratorio (rete LIPIGEN) finalizzata, tra l’altro, alla caratterizzazione fenotipica ed alla genotipizzazione di questi pazienti sull’intero territorio nazionale (24, 25).

■ FENOCOPIE DELLA Ho-FH. LA IPERCOLESTEROLEMIA A TRASMISSIONE RECESSIVA (AUTOSOMAL RECESSIVE HYPERCHOLESTEROLEMIA, ARH)

Nel contesto di questa rassegna, come fenocopia della Ho-FH è intendersi una condizione clinica indistinguibile fenotipicamente dalla Ho-FH classica, ma che:

- 1) non è causata da varianti patogenetiche dei classici geni candidati (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*);
- 2) ha una modalità di trasmissione di tipo recessivo.

La descrizione di alcuni pazienti con fenotipo Ho-FH a trasmissione recessiva identificati originariamente dal gruppo di ricerca diretto dal Prof. Renato Fellin, Università di Padova, e poi da altri gruppi italiani, incluso il nostro, ha posto le basi per una serie di ricerche che hanno portato, nell’ambito di una collaborazione internazionale con il gruppo di Dallas (Prof. Helen H. Hobbs, Prof. Jonathan C. Cohen) all’identificazione del gene coinvolto e delle sue varianti causative. In ragione della modalità di trasmissione questa condizione clinica è stata denominata Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) (26-31). Il gene coinvolto denominato, LDL-Receptor Adaptor Protein 1, *LDLRAP1* codifica per una proteina che interagendo con la coda citoplasmatica del *LDLR* ne facilita la collocazione nelle fossette rivestite di clatrina nella membrana plasmatica. Questa proteina adattatrice è indispensabile per la funzione del *LDLR* negli epatociti, le cellule principalmente coinvolte nella rimozione delle LDL dal compartimento plasmatico. La sua assenza o

mancata funzione non consente l'internalizzazione delle LDL da parte degli epatociti (29). La ARH è una condizione estremamente rara nelle popolazioni Europee, fatta eccezione per la popolazione Sarda nella quale la sua frequenza stimata è intorno ad 1: 40.000. Diversi laboratori italiani hanno caratterizzato le mutazioni del gene *LDLRAP1*. Le mutazioni riscontrate nella popolazione Sarda sono soltanto due (c.65G>A, p.(Trp22*) e c.432_433insA, p.(Ala145Serfs*26)). Esse sono presenti in omozigosi (44 pazienti) o in eterozigosi composta (16 pazienti), suggerendo la presenza di un effetto fondatore in una popolazione geograficamente isolata (30). Dal punto di vista fenotipico i pazienti ARH presentano un quadro clinico comparabile con quello dei pazienti con la forma meno grave di Ho-FH autosomica co-dominante, ovvero quella dovuta a varianti patogenetiche del gene *LDLR* definite "recettore difettive" (ARH vs *LDLR*-DEF: colesterolo LDL 14 vs 13 mmol/L; colesterolo HDL 1.13 vs 1.06 mmol/L; età media al primo evento coronarico di 49,5 vs 46,5 anni; età media al decesso di alcuni pazienti durante il follow-up di 46 vs 44 anni) (31, 32). Unica differenza statisticamente significativa è risultata la maggiore prevalenza della xantomatosi cutanea nei pazienti ARH (ARH vs *LDLR*-DEF: 58% vs 33%).

■ LA SITOSTEROLEMIA

La sitosterolemia è un raro disordine a trasmissione autosomica recessiva, descritto per la prima volta nel 1974 da Bhattacharyya e Connor (33). Il termine sitosterolemia deriva dall'accumulo nel plasma di steroli vegetali (in prevalenza Sitosterolo e Campesterolo). Il quadro clinico, particolarmente nella prima infanzia, presenta forti analogie con la Ho-FH quali la presenza di xanthomi, xanthelasmi e livelli di LDL estremamente elevati. Uno degli aspetti caratteristici di questa condizione, che consente la diagnosi differenziale con la Ho-FH, è dato dalla notevole riduzione dei livelli di LDL in risposta alla restrizione del contenuto di colesterolo nella dieta, così come dalla

tangibile e rapida riduzione dei livelli plasmatici di LDL a seguito di trattamento con ezetimibe (eventi che non si verificano nella Ho-FH classica o nella ARH) (33-35). La sitosterolemia è dovuta a varianti patogenetiche bialleliche in uno dei due geni (*ABCG5* ed *ABCG8*) che nell'enterocita codificano per due trasportatori (*ABCG5* ed *ABCG8* rispettivamente) coinvolti nella ri-escrezione di colesterolo e degli steroli vegetali dagli enterociti al lume intestinale (36, 37). Molteplici sono le mutazioni dell'uno o dell'altro gene riscontrate nei pazienti con sitosterolemia (36-38). A nostra conoscenza solo pochi pazienti Italiani con sitosterolemia sono stati caratterizzati a livello molecolare (38). Riteniamo tuttavia che uno studio molecolare sistematico delle ipercolesterolemie gravi in età pediatrica potrebbe portare all'identificazioni di alcuni pazienti con sitosterolemia, una condizione la cui frequenza è probabilmente sottostimata, che risponde molto bene a trattamenti dietetici e farmacologici (33-35, 38).

■ CARATTERIZZAZIONE GENETICO-MOLECOLARE DEI PAZIENTI Ho-FH NEL QUADRO DEL PROGETTO LIPIGEN

Come è noto uno degli obiettivi del consorzio LIPIGEN è caratterizzazione genetico-molecolare di pazienti italiani con fenotipo clinico suggestivo di ipercolesterolemia familiare. Grazie al coinvolgimento di molti centri clinici, numerosi pazienti con diagnosi clinica di probabile FH sono stati genotipizzati. Alcuni di essi sono risultati essere portatori di due varianti patogenetiche in uno o più dei geni candidati per la FH a trasmissione co-dominante, quindi da considerarsi, a prima vista, FH omozigoti. Tuttavia la presenza di due mutazioni non necessariamente implica che il paziente sia omozigote. Nel caso di due identiche varianti patogenetiche nello stesso gene (es. nel gene *LDLR*) si può affermare, in modo definitivo la presenza di una condizione di omozigosi (nella fattispecie di "omozigosi vera"). Diverso è il caso di due differenti va-

rianti patogenetiche nello stesso gene, che suggerisce, ma non dimostra, una condizione di “eterozigosi composta”. Quest’ultima, per essere confermata in via definitiva, richiede la ricerca delle varianti patogenetiche nei familiari, al fine di stabilire se esse sono sullo stesso allele o su due alleli diversi. Infine il riscontro di due varianti patogenetiche in due diversi geni candidati, indica in via definitiva, una condizione di “doppia eterozigosi”. Tutto ciò per riaffermare che i risultati dell’analisi molecolare devono essere correttamente interpretati prima di arrivare a conclusioni diagnostiche definitive (39).

È molto verosimile che l’analisi genotipica di numerosi individui FH prevista nel progetto LIPIGEN porti all’identificazioni di pazienti genotipicamente “omozigoti veri”, “eterozigoti composti” o “doppi eterozigoti”, che presentano un fenotipo molto meno grave rispetto a quello “classico” della HoFH atteso sulla base dei documenti di consenso (19). Le ragioni per la presenza di un fenotipo “attenuato” possono essere legate sia al tipo di variante del gene coinvolto (presenza di varianti patogenetiche ad impatto biologico lieve o moderato), ovvero alla presenza nel genoma di altre varianti geniche che possono controbilanciare gli effetti patogenetici delle varianti presenti nei geni candidati dell’FH (40, 41).

■ CONCLUSIONI

In questa breve rassegna abbiamo cercato di riassumere le fasi principali della caratterizzazione cellulare e genetico molecolare dei pazienti Italiani con ipercolesterolemia familiare omozigote. Il ragguardevole numero di pazienti studiati fino ad ora consente di avere un quadro sufficientemente informativo dell’assetto genotipico e fenotipico di questi pazienti nel nostro paese. La sfida futura in questo campo sarà quella di identificare, con l’impiego delle nuove tecnologie di indagine genetica ora disponibili, l’assetto di altri geni che possono influenzare l’espressione fenotipica della malattia ed eventualmente la diversa risposta agli interventi terapeutici oggi disponibili.

Collaboratori

L’aggiornamento dei database dei pazienti con fenotipo omozigote per Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH) o recessiva (ARH) è stato effettuato grazie alla collaborazione dei seguenti ricercatori:

ANGELO BALDASSARE CEFALÙ
*Dipartimento PROMISE, Scuola di Medicina,
Università di Palermo*

Patrizia Suppressa
*Medicina Interna e Centro sovraziendale malattie rare “C. Frugoni”
Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Bari*

GABRIELLA IANNUZZO
*Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia,
Università Federico II, Napoli*

PAOLO CALABRÒ
*Divisione di Cardiologia Clinica, A.O.R.N. Sant’Anna
e San Sebastiano, Caserta*

MARCO BUCCI
*Dipartimento di Medicina e Scienze dell’Invecchiamento,
Università G. d’Annunzio, Chieti*

LAURA D’ERASMO
*Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche,
Università di Roma “Sapienza”, Roma*

PAOLA SABRINA BUONUOMO
UOC Malattie Rare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

TIZIANA SAMPIETRO
*Centro per le Dislipidemie Ereditarie, Fondazione Toscana
Gabriele Monasterio, Pisa*

LIVIA PISCIOTTA
*Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche,
Università di Genova, Genova*

SERGIO D’ADDATO
*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche,
Policlinico di S. Orsola, Bologna*

ARRIGO CICERO
*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche,
Policlinico di S. Orsola, Bologna*

CLAUDIO RABACCHI
*Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena
e Reggio Emilia, Modena*

TOMMASO FASANO, CHIARA TRENTI,
EMANUELE NEGRI
*Azienda Ospedaliera IRCCS Santa Maria Nuova,
Reggio Emilia*

CHIARA PAVANELLO
*Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze
Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano*

MANUELA CASULA
*Centro di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva SEFAP),
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari,
Università di Milano, Milano*

FULVIO SILEO
Divisione Endocrinologica, Ospedali Riuniti, Bergamo

MARIA GRAZIA ZENTI
*Endocrinologia, Diabetologia e Metabolismo, AOUIVR,
Verona*

■ BIBLIOGRAFIA

- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In Scriver C.R., Beaudet A.L. The metabolic basis of inherited disease, McGraw-Hill New York. 2001; 2863-2013,
- Defesche JC, Gidding SS, Harada-Shiba M, Hegele RA, Santos RD, Wierzbicki AS. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17093.
- Mabuchi H, Nohara A, Noguchi T, Kobayashi J, Kawashiri MA, Inoue T, et al. Hokuriku FH Study Group. Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. *Atherosclerosis*. 2014; 2360: 54-61.
- Alves AC, Etxebarria A, Medeiros AM, Benito-Vicente A, Thedrez A, Passard M et al. Characterization of the first PCSK9 gain of function homozygote. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 66: 2152-2154.
- Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*. 1974; 249: 5153-5162.
- Goldstein JL, Basu SK, Brown MS: Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells, in Colowick SP, Kaplan NO (eds): *Methods in Enzymology*, Volume 98. Orlando, Fla, Academic Press, Inc. 1983; 241-260.
- Goldstein JL. Brown M.S. The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 29: 431-438, 2009.
- Cassi E, Massarotti G, Bernieri A, Cova L, Colombo A, Beretta R, Pagani C. Familial hypercholesterolemia. Clinico-diagnostic and therapeutic aspects. *Minerva Med*. 1978; 69: 3399-3340.
- Postiglione A, Rubba P, Scarpato N, Iannuzzi A, Mancini M. Increased blood flow to lower limbs after plasma exchange in two patients with familial hypercholesterolemia *Atherosclerosis*. 1982; 41: 421-425.
- Rubba P, Postiglione A, Scarpato N, Iannuzzi A, Mancini M. Improved reactive hyperemia test after plasma exchange in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1985; 56: 237-242.
- Faccenda F, Rubba P, Gnasso A, Pauciullo P, Postiglione A, Cortese C, Mancini M. Noninvasive ultrasound evaluation of pressure gradients in aortic root of homozygotes for familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1990; 10: 710-713.
- Postiglione A, Nappi A, Brunetti A, Soricelli A, Rubba P, Gnasso A, Cammisa M, et al. Relative protection from cerebral atherosclerosis of young patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1991; 90: 23-30.
- Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rollerli M, et al. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 408-418.
- Daga A, Mattioni T, Balestreri R, Coviello DA, Corte G, Bertolini S. Use of three DNA polymorphisms of the LDL receptor gene in the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet*. 1990; 84: 412-416.
- Bertolini S, Coviello DA, Masturzo P, Zucchetto E, Elicio N, Balestreri R, et al. RFLPs of the LDL-receptor gene: their use in the diagnosis of FH and in evaluation of different levels of gene expression on normal subjects. *Eur J Epidemiol*. 1992 (Suppl. 1): 18-25.
- Lelli N, Ghisellini M, Gualdi R, Tiozzo R, Calandra S, Gaddi A, et al. Characterization of three mutations of the low density lipoprotein receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11: 234-243.
- Bertolini S, Pisciotta L, Rabacchi C, Cefalù AB, Noto D, Fasano T, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*. 2013; 227: 342-348.
- Bertolini S, Pisciotta L, Fasano T, Rabacchi C, Calandra S. The study of familial hypercholesterolemia in Italy: A narrative review- *Atheroscler*. 2017; (Suppl. 29): 1-10.
- Sjouke B, Kusters DM, Kindt I, Besseling J, Defesche JC, Sijbrands EJ, et al. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: prevalence, genotype phenotype relationship, and clinical outcome *Eur Heart J*. 2015; 36: 560-565.
- Raal FJ, Sjouke B, Hovingh GK, Isaac BF. Phenotype diversity among patients with homozygous familial hypercholesterolemia: A cohort study. *Atherosclerosis*. 2016; 248: 238-244.
- Sánchez-Hernández RM, Civeira F, Stef M, Perez-Calahorra S, Almagro F, Plana N, et al. Homozygous Familial Hypercholesterolemia in Spain: Prevalence and Phenotype-Genotype Relationship. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016; 9: 504-510.
- Luirink IK, Braamskamp MJAM, Wiegman A, Hartgers ML, Sjouke B, Defesche JC, Hovingh GK The clinical and molecular diversity of homozygous familial hypercholesterolemia in children: Results from the GeneTics of clinical homozygous hypercholesterolemia (GoTCHA) study. *J Clin Lipidol*. 2019; 13: 272-278.

23. Pisciotta L, Priore Oliva C, Cefalù AB, Noto D, Bellocchio A, Fresa R, et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2006; 186: 433-440.
24. Averna M, Cefalù AB, Casula M, Noto D, Arca M, Bertolini S, et al. LIPIGEN Group Familial hypercholesterolemia: The Italian Atherosclerosis Society Network (LIPIGEN). *Atheroscler*. 2017; 29: 11-16.
25. Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, Averna M, Bertolini S, Calandra S, et al. LIPIGEN Group. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler*. 2017; 29 (Suppl.): 17-24.
26. Zuliani G, Vigna GB, Corsini A, Maioli M, Romagnoni F, Fellin R. Severe hypercholesterolaemia: unusual inheritance in an Italian pedigree. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25: 322-331.
27. Zuliani G, Arca M, Signore A, Bader G, Fazio S, Chianelli M, et al. Characterization of a new form of inherited hypercholesterolemia. *Familial Recessive Hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 802-809.
28. Calandra S, Bertolini S. Unusual inheritance of severe primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1999; 144: 464-466.
29. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*. 2001; 292: 1394-1398.
30. Arca M, Zuliani G, Wilund K, Campagna F, Fellin R, Bertolini S, et al. Autosomal recessive hypercholesterolaemia in Sardinia, Italy, and mutations in ARH: a clinical and molecular genetic analysis. *Lancet*. 2002; 359: 841-847.
31. Fellin R, Arca M, Zuliani G, Calandra S, Bertolini S. The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene*. 2015; 555: 23-32.
32. Pisciotta L, Priore Oliva C, Pes GM, Di Scala L, Bellocchio A, Fresa R, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) and homozygous familial hypercholesterolemia (FH): a phenotypic comparison. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 398-405.
33. Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest*. 1974; 53: 1033-1043.
34. Yoo E-G. Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2016; 21: 7-14.
35. Ajagbe BO, Othman RA, Myrie SB. Plant sterols, stanols, and sitosterolemia. *J AOAC Int*. 2015, 98: 716-723
36. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000; 290: 1771-1775.
37. Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, et al. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 278-290.
38. Buonuono PS, Iughetti L, Pisciotta L, Rabacchi C, Papadia F, Bruzzi P, et al. Timely diagnosis of sitosterolemia by next generation sequencing in two children with severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2017; 262: 71-77.
39. Sjouke B, Defesche JC, Hartgers ML, Wiegman A, Roeters van Lennep JE, et al. Double-heterozygous autosomal dominant hypercholesterolemia: Clinical characterization of an underreported disease. *J Clin Lipidol*. 2016; 10: 1462-1469.
40. Huijgen R, Sjouke B, Vis K, de Randamie JS, Defesche JC, et al. Genetic variation in APOB, PCSK9, and ANGPTL3 in carriers of pathogenic autosomal dominant hypercholesterolemic mutations with unexpected low LDL-C levels. *Hum Mutat*. 2012; 33: 448-455.
41. Berberich AJ, Hegele RA. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol*. 2019; 16: 9-20.