



**INSTYTUT CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI
w Łodzi**

mgr Lena Rutkowska

**„Analiza podłoża genetycznego wybranych dyslipidemii pierwotnych
z zastosowaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji”**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Gach, prof. instytutu

Pracę wykonano w Zakładzie Genetyki
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Łódź, 2024 r.

Składam serdeczne podziękowania

Pani Profesor Agnieszce Gach

*Za ogromną życzliwość i wsparcie merytoryczne
na każdym etapie prowadzonych prac.*

Wszystkim Współautorom,

*a w szczególności Zespołowi Poradni i Zakładowi Genetyki,
za okazaną pomoc i przyjazną atmosferę.*

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	4
2. Wykaz publikacji	6
3. Wstęp	8
3.1. Dyslipidemie	8
3.2. Klasyfikacja dyslipidemii pierwotnych	11
3.3. Hipercholesterolemia rodzinna	12
3.4. Rodzinna hiperalfalipoproteinemia/ Niedobór CETP.....	16
3.5. Rodzinna lipodystrofia częściowa (FPLD)	17
3.6. Rola badań genetycznych	17
4. Cel badań	19
5. Metodyka	20
5.1. Grupa badana	20
5.2. Izolacja materiału genetycznego.....	21
5.3. Sekwencjonowanie następnej generacji.....	21
5.4. Analiza danych	21
5.5. Analiza liczby kopii	22
6. Omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji	23
7. Podsumowanie	30
8. Wnioski.....	33
9. Piśmiennictwo.....	34
10. Streszczenie w języku polskim	38
11. Streszczenie w języku angielskim	40
12. Opublikowane prace	42
13. Zgoda Komisji Bioetycznej	83

1. Wykaz stosowanych skrótów

ACMG – Amerykańskie Kolegium Genetyki Medycznej i Genomiki (ang. *American College of Medical Genetics and Genomics*)

APOB – gen apolipoproteiny B (ang. *Apolipoprotein B gene*)

ARH – autosomalnie recesywna hipercholesterolemia (ang. *Autosomal Recessive Hypercholesterolemia*)

CETP – białko transportujące estry cholesterolu (ang. *Cholesteryl Ester Transfer Protein*)

CNV – zmiana liczby kopii (ang. *Copy Number Variation*)

CVD – choroby sercowo-naczyniowe (ang. *Cardiovascular Disease*)

FH – hipercholesterolemia rodzinna (ang. *Familial Hypercholesterolemia*)

FPLD – rodzinna lipodystrofia częściowa (ang. *Familial Partial Lipodystrophy*)

GOF – wzmocnienie funkcji (ang. *Gain-of-function*)

HDL – cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości (ang. *High-density Lipoprotein*)

HGMD – baza wariantów genów człowieka (ang. *Human Gene Mutation Database*)

HMG-CoA – reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A

LDL – cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości (ang. *Low-density Lipoprotein*)

LDLr – białko receptora dla lipoproteiny niskiej gęstości (ang. *Low-density Lipoprotein Receptor*)

LDLR – gen receptora dla lipoproteiny niskiej gęstości (ang. *Low Density Lipoprotein Receptor gene*)

LDLRAP1 – białko 1 adaptera receptora LDL (ang. *LDLR adaptor protein 1*).

LOVD – baza wariantów Uniwersytetu Leiden (ang. *Leiden Open Variation Database*)

MLPA – multipleksowa zależna od ligacji amplifikacja sond (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

NCN – Narodowe Centrum Nauki

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*)

OMIM – elektroniczna baza chorób człowieka uwarunkowanych genetycznie (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*)

PCSK9 – gen proproteinowej konwertazy subtylizyny/keksyny typu 9 (ang. *Proprotein Convertase Subtilisin/kexin type 9 gene*)

PPAR γ – receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów (ang. *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma*)

PTL/KLRWP/PTK/PTDL/PTD/PTNT – Polskie Towarzystwo Lipidologiczne/ Kolegium Lekarzy Rodzinnych w Polsce/ Polskie Towarzystwo Kardiologiczne/ Polskie

Towarzystwo Diabetologiczne/ Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej/
Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego

SCORE – skala oceny indywidualnego 10-letniego ryzyka incydentu sercowo-naczyniowego zakończonego zgonem (ang. *Systematic Coronary Risk Evaluation*)

sd-LDL – małe gęste LDL (ang. *small dense Low-density Lipoprotein*)

SNV – zmiana pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Variant*)

TG – trójglicerydy (ang. *triglycerides*)

VUS – wariant o niepewnym znaczeniu klinicznym (ang. *Variant of Uncertain Significance*)

WES – sekwencjonowanie całoksomowe (ang. *Whole Exome Sequencing*)

WGS – sekwencjonowanie całogenomowe (ang. *Whole Genome Sequencing*)

5'UTR – region 5' niepodlegający translacji (ang. *5' Untranslated Region*)

2. Wykaz publikacji

Poniższy cykl publikacji, będący podstawą postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora, składa się z dwóch oryginalnych artykułów naukowych oraz jednego opisu przypadku. Wszystkie prace opublikowano w czasopismach umieszczonych w wykazie ministerialnym.

Publikacja 1.

Rutkowska L, Sałacińska K, Salachna D, Matusik P, Pinkier I, Kępczyński Ł, Piotrowicz M, Starostecka E, Lewiński A, Gach A. *Identification of New Genetic Determinants in Pediatric Patients with Familial Hypercholesterolemia Using a Custom NGS Panel*, Genes 2022, 13, 999. [https://doi.org/ 10.3390/genes13060999](https://doi.org/10.3390/genes13060999).

(IF= 3.5, MNiSW=100)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów; uczestnictwo w wykonaniu prac związanych z zaprojektowaniem, optymalizacją i wdrożeniem autorskiego panelu do sekwencjonowania metodą NGS; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

Publikacja 2.

Rutkowska L, Pinkier I, Sałacińska K, Kępczyński Ł, Salachna D, Lewek J, Banach M, Matusik P, Starostecka E, Lewiński A, Płoski R, Stawiński P, Gach A. *Identification of New Copy Number Variation and the Evaluation of a CNV Detection Tool for NGS Panel Data in Polish Familial Hypercholesterolemia Patients*, Genes (Basel). 2022 Aug 10;13(8):1424. doi: 10.3390/genes13081424. PMID: 36011335; PMCID: PMC9407502.

(IF= 3.5, MNiSW=100)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

Publikacja 3.

Rutkowska L, Salachna D, Lewandowski K, Lewiński A, Gach, A. *Familial Partial Lipodystrophy—Literature Review and Report of a Novel Variant in PPARG Expanding the Spectrum of Disease-Causing Alterations in FPLD3*, *Diagnostics* 2022, 12, 1122. doi.org/10.3390/diagnostics12051122.

(IF= 3.6, MNiSW=70)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów; analiza literaturowa; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu.

Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy – 75%.

Łączna punktacja MNiSW cyklu publikacji: 270

Łączny Impact Factor cyklu publikacji: 10,600

3. Wstęp

3.1. Dyslipidemie

Dyslipidemie to szeroka grupa zaburzeń charakteryzująca się nieprawidłową gospodarką lipidową. Ze względu na źródło występowania dzielimy je na pierwotne, a więc uwarunkowane genetycznie i wtórne. Szacuje się, że spośród wszystkich dyslipidemii 30-40% stanowią te o podłożu wtórnym [1]. Są one wynikiem zaburzeń metabolicznych w przebiegu innych chorób, następstwem przyjmowanych leków lub efektem oddziaływania czynników środowiskowych. Do chorób indukujących występowanie zaburzeń lipidowych zaliczamy m.in. niedoczynność tarczycy, zespół nerczycowy, przewlekłą chorobę nerek, pierwotne zapalenie dróg żółciowych, żółtaczkę zastoinową, cukrzycę oraz zespół Cushinga. Wśród leków szczególne oddziaływanie na parametry lipidowe wykazują diuretyki, β -blokery, steroidy, estrogen, progesteron, leki immunosupresyjne, neuroleptyki, retinoidy [1]. Ze względu na odmienną etiologię odrębną grupę stanowią dyslipidemie pierwotne, w których to komponenty genetyczne warunkują wystąpienie zaburzeń lipidowych. Przedmiotem prowadzonych badań naukowych, stanowiących podstawę do przedłożonej rozprawy doktorskiej, były dyslipidemie pierwotne.

Niezależnie od pochodzenia dyslipidemii badaniem podstawowym, identyfikującym obecność oraz rodzaj zaburzenia jest profil lipidowy. Na profil lipidowy składają się oznaczenia stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL (ang. *low-density lipoprotein*), cholesterolu frakcji HDL (ang. *high-density lipoprotein*) oraz trójglicerydów. Wszystkie wymienione parametry oznaczane są metodami bezpośrednimi, za wyjątkiem cholesterolu frakcji LDL zazwyczaj wyliczanego na podstawie formuły Friedewalda. Wyjątek stanowią pacjenci z bardzo wysokimi poziomami trójglicerydów (>400 mg/dl), u których to cholesterol LDL również oznaczany jest metodą bezpośrednią [2]. Prawidłowe oznaczenie LDL-c jest niezwykle istotne ze względu na jego kluczowy udział w procesach aterogenezy, a osiągnięcie określonego stężenia stanowi nadrzędny cel terapeutyczny. Oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego służy głównie do stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego przy użyciu skali SCORE [3]. Skala SCORE (ang. *Systematic Coronary Risk Evaluation*) określa 10-letnie ryzyko incydentu sercowo-naczyniowego zakończonych zgonem w zależności od płci, wieku, ciśnienia tętniczego skurczowego, stężenia cholesterolu całkowitego i palenia papierosów. Pomiar stężenia trójglicerydów ma szczególne

zastosowanie w ocenie ryzyka rezydualnego (resztkowego), ponieważ wysokie stężenie TG pomimo prawidłowego stężenia LDL-c, istotnie zwiększa ryzyko sercowo-naczyniowe [3]. Oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji HDL jest niezbędne do wyliczenia stężenia LDL-c, natomiast sam HDL nie jest obecnie rekomendowany jako cel leczenia, czynnik predykcyjny czy indykator w monitorowaniu leczenia zaburzeń lipidowych [3, 4].

Ocena paramentów profilu lipidowego pozwala na określenie konkretnego rodzaju zaburzenia. Nieprawidłowości cechujące zwiększenie stężenia jednej bądź kilku frakcji lipoprotein we krwi określamy mianem hiperlipidemii. W grupie tej możemy wyszczególnić hipercholesterolemię, hipertriglicerydemię oraz hiperlipidemię mieszaną. Analogicznie, zaburzenia cechujące spadek stężenia jednej bądź kilku frakcji lipoprotein, nazywamy hipolipidemią. Hipolipidemie są chorobami rzadkimi, w szczególności zaś te o podłożu genetycznym. Do hipolipidemii pierwotnych zaliczamy m.in. abetalipoproteinemię czy hipobetalipoproteinemię. Za ich wtórne występowanie mogą odpowiadać zakażenia ostre i przewlekłe, niedokrwistość, anemia, długotrwałe stany zapalne, nowotwory złośliwe, nadczynność tarczycy, przewlekła choroba wątroby czy choroba Gauchera [5].

Częstość występowania zaburzeń lipidowych w Polsce jest bardzo wysoka [3], a poziom ich wykrywalności wciąż niewystarczający. Badanie epidemiologiczne WOBASZ II przeprowadzone w latach 2013-2014 wykazało występowanie hipercholesterolemii u 70.3% mężczyzn i 64.3% kobiet powyżej 20 roku życia [6]. Jak pokazują dane światowe zaburzenia lipidowe i wynikające z nich choroby sercowo-naczyniowe to problem globalny. W roku 2019 udokumentowano 523 miliony incydentów sercowo-naczyniowych, z czego aż 18.6 miliona zakończyło się zgonem [7]. Bezpośrednim i najbardziej rozpowszechnionym następstwem klinicznym dyslipidemii, jest zwiększone ryzyko występowania chorób sercowo-naczyniowych (CVD, ang. *cardiovascular disease*) o podłożu miażdżycowym. Są to przewlekłe, postępujące procesy zapalne charakteryzujące się gromadzeniem lipidów, elementów włóknistych i zwapnień w obrębie ścian średnich i dużych tętnic. Jak dowodzą badania, głównym sprawcą rozwoju zmian miażdżycowych są lipoproteiny o małej gęstości LDL, a ich rozmiar, liczebność oraz modyfikacje stanowią główną determinantę. Najbardziej aterogenną frakcją lipoprotein są małe gęste LDL (sd-LDL, ang. *small dense low-density lipoprotein*). Małe gęste LDL są bardziej wrażliwe na oksydację, wykazują wyższą

cytotoksyczność względem śródbłonna oraz posiadają zwiększoną zdolność przechodzenia przez barierę śródbłonkową, niż pozostałe frakcje [8]. Zmodyfikowane cząsteczki LDL, wychwytywane przez receptory zmiatające na makrofagach, generują powstawanie komórek piankowatych. Postępujące naciekanie ścian tętnic prowadzi do sukcesywnego rozwoju zaawansowanych zmian miażdżycowych [9]. Dowiedziono, że grubość kompleksu śródbłonek-błona środkowa tętnicy szyjnej, która stanowi uznany marker choroby miażdżycowej, jest zwiększona nie tylko u dorosłych z FH [10], ale także u dzieci już w wieku 8 lat. Sugeruje to wysoką progresywność zmian naczyniowych w przebiegu FH oraz potrzebę szybkiego wdrożenia leczenia hipolipemizującego, już od najmłodszych lat [11].

Zgodnie z aktualnymi wytycznymi PTL/KLRWP/PTK/PTDL/PTD/PTNT (Polskie Towarzystwo Lipidologiczne/ Kolegium Lekarzy Rodzinnych w Polsce/ Polskie Towarzystwo Kardiologiczne/ Polskie Towarzystwo Diabetologiczne/ Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej/ Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego) w zakresie leczenia hipolipemizującego, nadrzędny cel terapeutyczny stanowi maksymalne, możliwie jak najszybsze oraz długotrwałe obniżenie stężenia LDL we krwi pacjenta [3, 12]. Lekami pierwszego rzutu, wykazującymi najlepiej udokumentowaną skuteczność w prewencji pierwotnej i wtórnej CVD, są statyny (wiodące: atorwastatyna i rosuvastatyna). Mechanizm ich działania polega na hamowaniu reduktazy HMG-CoA, enzymu odpowiedzialnego za syntezę cholesterolu w hepatocytach. W badaniach porównawczych atorwastatyna i rosuvastatyna w dawce 10 mg/d. po 6 tygodniach leczenia zmniejszyły stężenie LDL-C odpowiednio o 36,8% i 45,8%, w dawce 20 mg/d. o 42% i 52,4%, a w dawce 40 mg/d. o 47,8% i 55% [3]. W sytuacji niewystarczającego obniżenia stężenia LDL-c przy maksymalnej tolerowanej dawce statyny, kolejny krok stanowi terapia skojarzona z ezetymibem, a jeszcze następny włączenie inhibitorów PCSK9, takich jak Alirokumab, Ewolokumab czy Inkisiran [12]. Niestety często spotykanym problemem jest pewna zachowawczość wśród klinicystów i wybór niedopasowanego schematu leczenia, który uniemożliwia osiągnięcie wyznaczonego celu terapeutycznego. Badanie przeprowadzone w Centrum Chorób Rzadkich ICZMP na grupie 103 pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną (87 dorosłych i 16 dzieci) wykazało, że jedynie 50% pacjentów dorosłych osiągnęło zamierzony spadek stężenia LDL-c, przy czym żaden z pacjentów pediatrycznych nie osiągnął założonego

efektu terapeutycznego. Było to bezpośrednio związane z niedostatecznymi dawkami statyn oraz niedopilnowanym schematem leczenia [13].

3.2. Klasyfikacja dyslipidemii pierwotnych

W podziale dyslipidemii wrodzonych nastąpiło pewne odejście od pierwotnie opracowanej klasyfikacji Fredricksona, która bazowała jedynie na fenotypach lipidowych [14]. Dynamiczny rozwój genetyki i biologii molekularnej pozwolił na wypracowanie nowych schematów diagnostycznych. Aktualnie rekomendowanym podziałem, ze względu na wysoką przydatność kliniczną, jest ten oparty o zaburzenia kliniczne oraz odpowiadające im komponenty genetyczne [15, 16]. Tabela 1 przedstawia wybrane dyslipidemia pierwotne oraz geny odpowiedzialne za ich występowanie, a także model dziedziczenia oraz numery w bazie OMIM (ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*). Trzy z nich dziedziczone są w sposób autosomalnie dominujący; jest to hipercholesterolemia rodzinna, rodzinna hiperalfalipoproteinemia oraz rodzinna lipodystrofia częściowa.

Tabela 1. Podział wybranych dyslipidemii wrodzonych z uwzględnieniem podłoża genetycznego z przypisaną numeracją bazy OMIM.

Grupa	Zaburzenie	Geny; model dziedziczenia	Numer OMIM
Hipercholesterolemie monogenowe	Rodzinna hipercholesterolemia (FH)	<i>LDLR</i> <i>APOB</i> AD <i>PCSK9</i>	143890 144010 603776
	Autosomalna recesywna hipercholesterolemia	<i>LDLRAP1</i> AR	603813
	Sitosterolemia	<i>ABCG5</i> AR <i>ABCG8</i>	210250 605459
	Niedobór kwaśnej lipazy lizosomalnej (LAL-D)	<i>LIPA</i> AR	278000
	Rodzinna hiperalfalipoproteinemia/ niedobór CETP	<i>CETP</i> AD	143470
Hiperalfalipoproteinemie monogenowe	Niedobór wątrobowej lipazy	<i>LIPC</i> AR	614025
	Rodzinna hipoalfalipoproteinemia	<i>APOA1</i> AR	618463
	Choroba tangierska	<i>ABCA1</i> AR	205400
	Niedobór acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej (LCAT)	<i>LCAT</i> AR	245900

Monogenowe hipertriglicerydemie	Rodzinny zespół chylomikronemii	<i>LPL</i>		238600
		<i>APOC2</i>		207750
		<i>APOA5</i>	AR	145750
		<i>LMF1</i>		246650
		<i>GPIHBP1</i>		612757
Lipodystrofie wrodzone	Dysbetalipoproteinemia	<i>APOE</i>	AR	617347
	Rodzinna lipodystrofia częściowa (FPLD)	<i>LMNA</i>		151660
		<i>PPARG</i>	AD	604367
		<i>PLIN1</i>		613877
	Lipodystrofia uogólniona	<i>AGPAT2</i>		608594
		<i>BSCL2</i>	AR	269700
		<i>CAVI</i>		612526
		<i>CAVIN1</i>		613327

3.3. Hipercholesterolemia rodzinna

Hipercholesterolemia rodzinna (FH, *familial hypercholesterolemia*) jest chorobą monogenową, dziedziczną w sposób autosomalnie dominujący i jest najczęściej występującą dyslipidemią pierwotną. Najnowsze dane wskazują na częstość występowania 1:200-250 dla postaci heterozygotycznej [2] i 1:160,000-300,000 dla postaci homozygotycznej [17]. Specyficzne cechy fenotypowe, będące bezpośrednim następstwem podwyższonego stężenia LDL-c, to tkankowe złogi cholesterolu gromadzące się pod postacią żółtaków ścięgien Achillesa, ścięgien prostowników dłoni i stóp, rzadziej zmian na powiekach czy obwodzie rogówki [18]. Postępująca uogólniona miażdżyca tętnic rozpoczyna się już we wczesnym dzieciństwie mimo, że na tym etapie zazwyczaj nie dochodzi do pełnoobjawowej manifestacji choroby. Wyjątkiem są przypadki homozygot, u których to już w wieku kilku lat stężenia LDL-c osiągają wartości powyżej 500 mg/dl, na skórze pojawiają się żółtaki, a dynamicznie postępujące zmiany w układzie sercowo-naczyniowym mogą dawać pierwsze objawy [19].

Najczęściej stosowane kryteria diagnostyczne ułatwiające rozpoznanie hipercholesterolemii rodzinnej to Dutch Lipid Clinic Network Criteria (Tabela 2) oraz Simon Broome Criteria (Tabela 3). Klasyfikacje te oparte są o parametry lipidowe, cechy fenotypowe oraz potwierdzone warianty sprawcze, a więc badania molekularne.

Tabela 2. Kryteria diagnostyczne Dutch Lipid Clinic Network.

Kryteria	Punkty
Wywiad rodzinny:	1
<ul style="list-style-type: none"> krewny pierwszego stopnia z rozpoznaną przedwczesną (mężczyźni: <55.rz., kobiety: <60. rz.) chorobą wieńcową lub chorobą naczyń bądz 	

krewny pierwszego stopnia, u którego stwierdzono stężenie LDL-C >95. centyla	2
<ul style="list-style-type: none"> krewny pierwszego stopnia, u którego występują kępkki żółte ścięgien i/lub starczy rąbek rogówkowy, lub dzieci <18. rż. ze stężeniem LDL-C >95. centyla 	
<i>Wywiad kliniczny:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> pacjent z przedwczesną (mężczyźni: <55. rż., kobiety: <60. rż.) chorobą wieńcową 	2
<ul style="list-style-type: none"> pacjent z przedwczesną (mężczyźni: <55. rż., kobiety: <60. rż.) chorobą naczyń mózgowych lub obwodowych 	1
<i>Badanie przedmiotowe (maksymalna liczba punktów: 6):</i>	
<ul style="list-style-type: none"> kępkki żółte ścięgien 	6
<ul style="list-style-type: none"> starczy rąbek rogówkowy u osoby <45. rż. 	4
<i>Stężenie LDL-C (przed leczeniem):</i>	
<ul style="list-style-type: none"> ≥8,5 mmol/l (≥325 mg/dl) 	8
<ul style="list-style-type: none"> 6,5–8,4 mmol/l (251–324 mg/dl) 	5
<ul style="list-style-type: none"> 5,0–6,4 mmol/l (191–250 mg/dl) 	3
<ul style="list-style-type: none"> 4,0–4,9 mmol/l (155–190 mg/dl) 	1
<i>Analiza DNA:</i>	
mutacja czynnościowa w genie <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> lub <i>PCSK9</i>	8
	Rozpoznanie FH
	Suma
	pewne >8 pkt.
	prawdopodobne 6–8 pkt.
	możliwe 3–5 pkt.

Tabela 3. Kryteria diagnostyczne Simon Broome Register.

a	Cholesterol całkowity	Dla osób poniżej 16 r.ż. > 6,7 mmol/l (260 mg/dl) Dla osób powyżej 16 r.ż. > 7,5 mmol/l (290 mg/dl)
	lub	
b	LDL-cholesterol	Dla osób poniżej 16 r.ż. > 4,0 mmol/l (155 mg/dl) Dla osób powyżej 16 r.ż. > 4,9 mmol/l (190 mg/dl)
c	Kępkki żółte u probanta lub krewnego I° i II°	
d	Obecność mutacji w genie <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> lub <i>PCSK9</i>	
e	Zawał serca u krewnych I° przed 60 r.ż. lub krewnych II° przed 50 r.ż.	

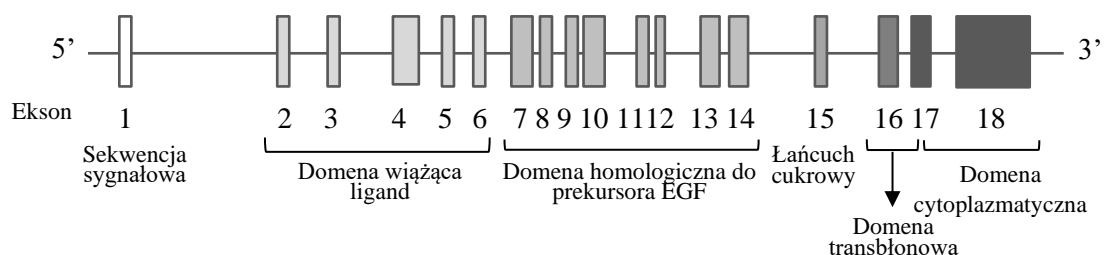
e	Stężenie cholesterolu całkowitej powyżej 7,5 mmol/l (290 mg/dl) u dorosłego krewnego I° lub II° lub stężenie cholesterolu całkowitego powyżej 6,7 mmol/l (260 mg/dl) u rodzeństwa poniżej 16 r.ż.
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Rozpoznanie FH

pewne	Kryteria a i b lub c
prawdopodobne	Kryteria a i d lub a i e

Podłoże genetyczne FH to głównie mutacje genu receptora LDL (86-88% przypadków FH), rzadziej apolipoproteiny B (12%) lub proproteinowej konwertazy subtilizyny/keksyny typu 9 (*PCSK9*, ang. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (<2%).

Gen *LDLR* zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 19 (19p13.1-p13.3), obejmuje ok. 45 kb i składa się z 18 eksonów. Ekson 1 genu *LDLR* zawiera krótki fragment 5'UTR oraz sekwencję sygnałową; eksony 2-6 kodują siedem powtórzeń w domenie wiążącej ligand; eksony 7-14 kodują domenę homologiczną do prekursora EGF; ekson 15 koduje domenę zawierającą cukry związane z białkiem wiązaniem O-glikozydowym; ekson 16 oraz fragment 5' eksonu 17 kodują domenę transbłonową receptora; pozostała część eksonu 17 i fragment 5' ekson 18 kodują domenę cytoplazmatyczną. Te pięć wysoce konserwatywnych domen buduje glikoproteinę transbłonową jaką jest receptor dla LDL (Ryc.1).



Rycina 1. Schemat przedstawia orientacyjne położenie 18 eksonów genu *LDLR* i sześciu odpowiadających im domen funkcjonalnych białka receptorowego LDLr.

Receptory LDL zlokalizowane są głównie w hepatocytach, w dołkach opłaszczonych klatryną, a ich liczba zależna jest od zapotrzebowania komórek na cholesterol. Cząsteczka LDL jako kluczowy transporter cholesterolu, w obecności apolipoproteiny B-100 łączy się z domeną wiążącą receptora LDL. Utworzony kompleks wnika do wnętrza komórki, gdzie enzymy lizosomalne rozkładają LDL. Uwolniony receptor

powraca na powierzchnię hepatocytu. Wysokie stężenie cholesterolu w komórce hamuje aktywność reduktazy HMG-CoA, enzymu biorącego udział w syntezie cholesterolu.

Jeszcze kilka lat temu deklarowano występowanie ponad 2000 wariantów *LDLR* zaburzających prawidłowe funkcjonowanie receptora. Aktualne dane wskazują na ponad 2600 zareportowanych zmian, co najlepiej obrazuje złożone podłoże genetyczne choroby [20]. Zdecydowaną większość zmian stanowią mutacje punktowe, małe insercje i delecje. Duże strukturalne rearanżacje jak zmiany liczby kopii, stanowią ok.10% wariantów.

W zależności od efektu funkcjonalnego wywieranego na białko receptora, wyróżniono 6 klas mutacji genu *LDLR*. Klasa 1 to mutacje typu *null*, czyli zmiany zaburzające syntezę białka, prowadzące do całkowitego jego braku na powierzchni komórki. Klasę 1 charakteryzuje najcięższy fenotyp, a osiągnięte wartości stężenia LDL-c są bardzo wysokie. Do klasy 2 zaliczamy zmiany, w wyniku których nie obserwuje się obecności dojrzałego receptora LDL, bądź obserwowane białko jest nieprawidłowe np. skrócone lub niepoprawnie złożone. W obrębie klasy 2 wyróżniamy dwa podtypy (2A i 2B), różniące się między sobą ekspozycją receptora na powierzchni komórki. Mutacje klasy 3 zlokalizowane są w obrębie domeny wiążącej, a tym samym zaburzają lub uniemożliwiają przyłączanie ligandów. Mutacje należące do klasy 4 zlokalizowane są w obrębie C-końca białka receptorowego i skutkują zaburzeniami w gromadzeniu się receptorów wokół dołków opłaszczonych (4A), bądź przedwczesnym uwolnieniem receptora tuż po dotarciu na powierzchnię komórki (4B). Klasa 5 to zmiany uniemożliwiające powrót receptora na powierzchnię komórki lub indukujące jego przedwczesną degradację w endosomie [21]. Klasa 6 mutacji została niedawno dołączona i zawiera zmiany zlokalizowane w domenie cytoplazmatycznej białka, w wyniku których receptory nie docierają do błony komórkowej wątroby i prawdopodobnie podlegają szybkiej degradacji [22].

Gen *APOB* znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 2 (2p24.1), zajmuje 43 kb i składa się z 29 eksonów. *APOB* koduje apolipoproteinę B-100 o długości 4536 aminokwasów oraz 27-aminokwasową sekwencję sygnałową, ale także apolipoproteinę B-48. Ekspresja genu w hepatocytach prowadzi do powstania apoB-100, natomiast apoB-48 syntezowane jest w jelicie. Zachodząca deaminacja cytozyny w pozycji 6666 mRNA, skutkuje powstaniem skróconego transkryptu. W procesie translacji, w tym właśnie miejscu, dochodzi do wstawienia kodonu terminacyjnego, a więc zakończenia

syntezy białka, co skutkuje powstaniem skróconej formy apolipoproteiny B [23]. ApoB-100 jest głównym składnikiem białkowym LDL oraz swoistym ligandem dla receptora LDL. Zmiany w obrębie apoB-100 skutkują zmniejszeniem powinowactwa apolipoproteiny do LDLr, tym samym zaburzając prawidłowy wychwyt cząsteczek LDL i ich degradację. Jak wskazuje baza Varsome, dotychczas sumarycznie w bazach takich jak UniProt, ClinVar, LOVD, MitoMap, VarSome & PubMed zaraportowano 143 zmiany o charakterze patogennym oraz 59 zmian o charakterze potencjalnie patogennym. Przeważająca większość to warianty przesuwające ramkę odczytu oraz warianty nonsensowne. Ponadto w bazie znalazło się, aż 2 222 zmian o niepewnym znaczeniu klinicznym (VUS), co najlepiej obrazuje ciągłą potrzebę prowadzenia badań naukowych w tym zakresie i weryfikowania patogenności wykrywanych wariantów.

Gen *PCSK9* znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p32.3), składa się z 12 eksonów i koduje białko o nazwie proproteinowa konwertaza subtylizyny/keksyny typu 9. Podstawowym zadaniem białka PCSK9 jest wiązanie receptora LDL oraz jego degradacja, co prowadzi do redukcji liczby aktywnych receptorów na powierzchni komórek wątrobowych. Konsekwencją tego jest zmniejszenie wychwytu cząsteczek LDL, a więc wzrost ich stężenia we krwi. Warianty związane z wystąpieniem hipercholesterolemii to zmiany wzmocnienia funkcji (GOF, ang. *Gain-of-function*) genu *PCSK9*, a więc wzmożenia degradacji receptorów LDL [24]. W bazie Varsome dotychczas zaraportowano 28 zmian o charakterze patogennym, 19 o charakterze potencjalnie patogennym oraz aż 501 wariantów o niepewnym znaczeniu klinicznym.

Innym typem hipercholesterolemii monogenowej jest ta dziedziczona w sposób autosomalnie recesywny, związana z występowaniem zmian w obrębie genu *ARH*, kodującego białko LDLRAP1 (ang. *LDLR adaptor protein 1*).

3.4. Rodzinna hiperalfalipoproteinemia/ Niedobór CETP

Rodzinna hiperalfalipoproteinemia to choroba dziedziczona w sposób autosomalnie dominujący, związana ze zmianami w obrębie genu *CETP* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 16 (16q21). *CETP* jest genem kluczowym warunkującym metabolizm cząsteczek HDL, a wszelkie zmiany w jego obrębie manifestują się znacznie podwyższonymi stężeniami tej frakcji lipidowej. Kodowane białko CETP jest glikoproteiną występującą w osoczu, która pośredniczy w transferze zestryfikowanego cholesterolu z HDL na apolipoproteinę B [25]. Niedobór CETP jest chorobą bardzo

rzadką, występującą głównie w populacji Japonii, skąd najczęściej raportowane są warianty związane z występowaniem choroby [26].

3.5. Rodzinna lipodystrofia częściowa (FPLD)

Lipodystrofie to bardzo rzadka grupa zaburzeń charakteryzująca się rozległą utratą tkanki tłuszczowej oraz związanych z tym następstw metabolicznych, takich jak insulinooporność, cukrzyca, hipertriglicerydemia czy stłuszczenie wątroby. Istnieje 6 podtypów rodzinnej lipodystrofii częściowej, w tym dwa o przeważającej częstości występowania. Jest to rodzinna lipodystrofia częściowa typu 2 (FPLD2), zwana także lipodystrofią Dunningana oraz rodzinna lipodystrofia częściowa typu 3 (FPLD3). FPLD2 związana jest z mutacjami genu *LMNA* znajdującego się na długim ramieniu chromosomu 1 (1q21-q22), kodującego laminę A i C. Gen ten składa się z 12 eksonów, a najczęściej raportowaną zmianą jest substytucja argininy tryptofanem w pozycji 482 łańcucha białkowego (p.Arg482Trp). Charakterystyczny rozkład tkanki tłuszczowej zazwyczaj zaczyna być widoczny w okresie dojrzewania i obejmuje jej zanik w okolicach ramion, nóg oraz nadmiar w obrębie szyi, twarzy oraz jamy brzusznej. Wraz z postępującymi zmianami fizycznymi, coraz większej manifestacji ulegają również zaburzenia metaboliczne, a więc postępująca insulinooporność, cukrzyca, dyslipidemia, hepatomegalia czy przedwczesna choroba sercowo-naczyniowa.

Kolejny typ wrodzonej lipodystrofii częściowej, FPLD3 związany jest ze zmianami w obrębie genu *PPARG* zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p25.2). PPARy jest steroidowym receptorem jądrowym regulującym adipogenezę i różnicowanie adipocytów [27]. Ze względu na zmienną ekspresję cech fenotypowych obu typów lipodystrofii częściowej oraz nakładanie się objawów z innymi jednostkami chorobowymi np. zespołem metabolicznym, badania genetyczne często stanowią rozstrzygającą determinantę.

3.6. Rola badań genetycznych

Dyslipidemie są aktualnie niezwykle dynamicznie rozwijającym się obszarem badań naukowych. Zrozumienie ich podłoża genetycznego oraz mechanizmów indukujących powstawanie zaburzeń lipidowych, bezpośrednio przekłada się na opracowywane nowatorskie narzędzia farmakologiczne. Dobrym przykładem ścisłej korelacji i zależności obu dziedzin, są szeroko omawiane przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko proproteinowej konwertazie subtylizyny/keksyny typu 9 (PCSK9), stosowane

w leczeniu hipercholesterolemii. Fizjologicznie białko PCSK9 wiąże się z fragmentem EGF-A LDLr, co prowadzi do zatrzymywania receptora w komórce, gdzie następnie ulega on degradacji w lizosomach. Skutkuje to bezpośrednim zmniejszeniem liczby dostępnych receptorów na powierzchni hepatocytów oraz w układzie krążenia, a tym samym niewystarczającym wychwytem krążącego cholesterolu frakcji LDL. U pacjentów cierpiących na hipercholesterolemię spowodowaną zmianą w obrębie genu *PCSK9* skutkującą jego nadekspresją, dochodzi do spotęgowanej degradacji receptorów, co bezpośrednio przekłada się na wysokie stężenia cholesterolu we krwi. Ponadto wykazano, że rozwijający się w organizmie stan zapalny powoduje wzrost ekspresji *PCSK9* w wątrobie, a tym samym indukuje całość procesu prowadzącego do powstawania zmian miażdżycowych [28]. Zastosowanie inhibitorów PCSK9 pozwoliło znacznie zmniejszyć wiązanie LDLr, a dodatkowe skojarzenie ich z klasycznymi statynami może zredukować stężenie cholesterolu frakcji LDL w osoczu nawet o 60% [28]. Ze względu na dobrą tolerancję inhibitorów PCSK9 aktualnie trwają intensywne badania nad małymi peptydami imitującymi domenę EGF-A na LDLR, której zadaniem jest wiązanie PCSK9. Tworzenie kompleksów peptyd-PCSK9 miałyby hamować jego przyłączanie do cząsteczki receptora, tym samym blokując jego degradację [28].

4. Cel badań

Dyslipidemie pierwotne to obszerna grupa zaburzeń o wysoce heterogennym podłożu genetycznym. Precyzyjna identyfikacja przyczyn choroby przekłada się nie tylko na lepsze zrozumienie jej etiologii, ale także możliwość dopasowania schematu leczenia, czy zaawansowane poradnictwo genetyczne z szybką identyfikacją pozostałych chorych w rodzinie pacjenta. Dynamiczny rozwój biologii molekularnej oraz coraz większa dostępność nowych technik opartych o sekwencjonowanie następnej generacji (NGS), otworzyła przed nami nowe możliwości diagnostyczne.

Na tej podstawie postawiono następujące cele badawcze:

1. Analiza podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej w populacji polskiej wśród pacjentów pediatrycznych.
2. Ocena przydatności metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce dyslipidemii pierwotnych.
3. Ocena skuteczności narzędzia bioinformatycznego DECoN do identyfikacji zmian liczby kopii (CNV) z danych uzyskanych po NGS.
4. Charakterystyka porównawcza dwóch najczęstszych typów wrodzonej lipodystrofii częściowej (FPLD2 oraz FPLD3) z uwzględnieniem podłoża genetycznego oraz następstw metabolicznych. Poszukiwanie nowych wariantów patogennych w genach *LMNA* oraz *PPARG*.

5. Metodyka

Przedłożony cykl publikacji jest zwieńczeniem prowadzonego w latach 2016-2022 statutowego zadania badawczego pt. “Genetyczne uwarunkowania dyslipidemii pierwotnych” finansowanego ze środków Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki nr 2016/X/9-SZB (kierownik projektu: Lena Rutkowska) oraz częściowo finansowany z grantu OPUS 2014/13/B/NZ5/03102 ze środków NCN (kierownik projektu: dr hab. n. med. Agnieszka Gach, prof. instytutu).

Projekt badań uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi- opinia nr 15/2016 wydana dnia 12.01.2016.

5.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 139 pacjentów (57 pediatrycznych i 82 dorosłych) z podejrzeniem występowania dyslipidemii pierwotnej, zrekrutowanych przez pięć jednostek medycznych w latach 2016-2022:

- Poradnia Genetyczna, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
- Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
- Klinika Kardiologii i Wad Wrodzonych Dorosłych, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi
- Oddział Kliniczny Pediatrii, Otyłości Dziecięcej i Chorób Metabolicznych Kości, Katedra Pediatrii i Medycyny Rodzinnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
- Zakład Genetyki Klinicznej, Centralny Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Pacjentów pediatrycznych rekrutowano zgodnie z kryteriami Simon Broome, natomiast pacjentów dorosłych w oparciu o wytyczne Dutch Lipid Clinic Network Criteria. W obu grupach rozpoznanie prawdopodobne i pewne stanowiło kryterium włączające do badania. Wszyscy zakwalifikowani pacjenci zostali poinformowani o założeniach badania i podpisali świadome zgody na udział w nim.

5.2. Izolacja materiału genetycznego

Materiał do badań stanowiło genomowe DNA pozyskane z krwi obwodowej pobranej na EDTA. Izolację DNA przeprowadzono na aparacie MagCore (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan) z wykorzystaniem gotowego zestawu do izolacji (nr 101), zapewniającego wysokiej jakości parametry ilościowe i jakościowe izolowanego DNA. Ocenę stężenia i jakości uzyskanego materiału przeprowadzono na aparacie NanoDrop (Thermo Scientific, USA). Wymagane wartości stosunku absorbancji A260/A280 przyjęto na 1,8-2,0, zaś dla A260/230 na 1,8-2,2. Wartość pierwszego parametru świadczy o stopniu czystości wyizolowanego DNA pod kątem białek obecnych w próbce krwi; drugi parametr odnosi się do zanieczyszczenia próbki odczynnikami do izolacji m.in. EDTA czy etanolem. Celem precyzyjnego określenia stężenia DNA, które stanowi element kluczowy dla etapu preparatyki bibliotek, dokonano dodatkowego pomiaru z wykorzystaniem czulszej metody fluorymetrycznej. Pomiar fluorymetryczny wykonano na aparacie Quantus (Promega, USA) z wykorzystaniem zestawu QuantiFluor dsDNA ONE (Promega, USA).

5.3. Sekwencjonowanie następnej generacji

Metodykę badania oparto o sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem autorskiego panelu genów związanych z zaburzeniami lipidowymi. Projekt panelu wykonano przy pomocy narzędzia DesignStudio Illumina i zawarto w nim następujące geny: *ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *APOA5*, *APOB*, *APOC2*, *APOE*, *CYP7A1*, *GPIHBP1*, *LCAT*, *LDLR*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *LMF1*, *LMNA*, *LPL*, *PCSK9*, *PPARG*, *SCAP*, *SREBF2*, *STAP1*. Proces sekwencjonowania przeprowadzono na aparacie MiniSeq Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta. Długość odczytów, w trybie sparowanych końców, zaprojektowano na 2×150 par nukleotydów (bp). Zakładane minimalne pokrycie wynosiło 100x, a zakres sekwencjonowania obejmował regiony kodujące wybranych genów oraz przylegające sekwencje intronowe.

5.4. Analiza danych

Uzyskane w procesie sekwencjonowania dane przetworzono w programie VariantStudio Illumina, korzystając z sekwencji referencyjnej genomu ludzkiego (GenBank GRCh37). Wyselekcjonowane warianty poddano analizie z wykorzystaniem populacyjnych baz danych (gnomAD Exomes, gnomAD Genomes), baz danych wariantów (ClinVar,

HGMD, dbSNP, Varsome, LOVD), programów predykcyjnych (MutationTaster, SIFT, PolyPhen i inne) oraz danych literaturowych. Klasyfikacja wariantów odbyła się zgodnie z najnowszymi wytycznymi American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) za pomocą programu Varsome (<https://varsome.com/>). Metodę służącą do potwierdzenia występowania poszczególnych zmian stanowiło sekwencjonowanie metodą Sangera, przeprowadzane na aparacie 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Analizę otrzymanych wyników wykonano przy użyciu oprogramowania Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, State College, PA, USA). Wykryte, a niezareportowane w dostępnych bazach danych, warianty potencjalnie patogenne zostały zgłoszone do ogólnosiwiatowej bazy ClinVar pod afiliacją Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki.

5.5. Analiza liczby kopii

Analizę liczby kopii genu *LDLR* wykonano metodą MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) z użyciem zestawu komercyjnego SALSA MLPA P062 (MRC Holland, The Netherlands). Analizą MLPA objęto wybranych pacjentów, u których nie wykryto wariantów patogennych w badaniu NGS, a silnie zmanifestowany fenotyp wskazywał jednoznacznie na obecność hipercholesterolemii rodzinnej.

Ponadto przeprowadzono analizę bioinformatyczną danych NGS pod kątem występowania zmian typu CNV przy użyciu programu DECoN, co zostało szczegółowo omówione w publikacji nr 2. Obecność zmian wykrytych przez program potwierdzono techniką MLPA.

6. Omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji

Publikacja 1.

Rutkowska L, Sałacińska K, Salachna D, Matusik P, Pinkier I, Kępczyński Ł, Piotrowicz M, Starostecka E, Lewiński A, Gach A. *Identification of New Genetic Determinants in Pediatric Patients with Familial Hypercholesterolemia Using a Custom NGS Panel*, Genes 2022, 13, 999. [https://doi.org/ 10.3390/genes13060999](https://doi.org/10.3390/genes13060999).

Cykl publikacji otwiera manuskrypt opisujący podłoże genetyczne hipercholesterolemii rodzinnej wśród pacjentów pediatrycznych, w populacji polskiej. Jako metodę diagnostyczną zastosowano sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem specjalnie do tego celu stworzonego, panelu genowego.

Podczas rekrutacji kierowano się kryteriami Simon Broome uwzględniającymi stężenie cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji LDL, badanie fizykalne oraz wywiad rodzinny. Pozwoliło to na zebranie grupy 57 pacjentów pediatrycznych z podejrzeniem hipercholesterolemii rodzinnej. Średnia wieku wynosiła 10 lat, z czego najmłodszy pacjent miał 2 lata, a najstarszy 17 lat. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem autorskiego panelu genów, metodą sekwencjonowania następnej generacji na aparacie MiniSeq Illumina. W panelu uwzględniono 21 genów związanych z występowaniem dyslipidemii pierwotnych (*ABCA1, ABCG5, ABCG8, APOA5, APOB, APOC2, APOE, CYP7A1, GPIHBP1, LCAT, LDLR, LDLRAP1, LIPA, LMF1, LMNA, LPL, PCSK9, PPARG, SCAP, SREBF2, STAP1*). Poszerzenie panelu o geny nie tylko związane z hipercholesterolemią rodzinną, ale także innymi pierwotnymi zaburzeniami lipidowymi było zabiegiem celowym, pozwalającym na wykorzystanie go również w innych grupach badanych. Materiał do badań stanowiło genomowe DNA izolowane z krwi obwodowej.

Badanie wykazało obecność potencjalnie patogennych wariantów u 33 pacjentów. Wśród siedemnastu zareportowanych zmian dwanaście stanowiły warianty zmiany sensu, trzy zmiany skutkujące przesunięciem ramki odczytu oraz dwa warianty splicingowe. Dodatkowo wykryto trzy warianty o niepewnym znaczeniu klinicznym i jeden czynnik ryzyka. Geny w obrębie, których wykryto zmiany to *LDLR, APOB, ABCG5* oraz *LPL*. Najwięcej, bo aż 15 patogennych wariantów zidentyfikowano w genie *LDLR* w eksonach 3–6, 8, 10, 12–14, 17. Najczęściej raportowanym wariantem była zamiana pojedynczego nukleotydu G na A w pozycji c.1775 w eksonie 12, wykryta u 9 pacjentów. Pokryło się

to z doniesieniami z innych badań w obrębie Polski, jak i krajów sąsiadujących, gdzie c.1775G>A również należał do najczęstszych SNV (ang. *Single Nucleotide Variant*). Lokalizacja wariantu w obrębie wysoce konserwatywnej domeny homologicznej do prekursora EGF, warunkuje jego patogenność.

W toku analizy zidentyfikowano również obecność nowego, dotychczas nieraportowanego wariantu c.373_379delCAGTTCG, skutkującego przesunięciem ramki odczytu w eksonie 4 genu *LDLR*. Analiza *in silico* wskazywała jednoznacznie na patogenność wykrytej zmiany. Również jej kosegregacja z fenotypem hipercholesterolemii w rodzinie pacjenta, sugerowała sprawczy charakter wariantu.

Kolejny interesujący przypadek stanowiła 16-letnia Pacjentka z dwiema potencjalnie patogennymi zmianami, w dwóch genach odpowiedzialnych za rozwój FH. Pierwszą z nich była jedno-nukleotydowa insercja skutkująca przesunięciem ramki odczytu c.2416dupG w eksonie 17 genu *LDLR*. Druga to wariant zmiany sensu c.10708C>T w eksonie 26 genu *APOB*. Obie zmiany zostały ocenione przez programy predykcyjne jako potencjalnie patogene. Również dane literaturowe wskazywały na sprawczy charakter obu zmian. Dopiero wykonanie badań pod kątem występowania obu wariantów u pozostałych członków rodziny, pozwoliło zauważyć, że jedynie wariant c.2416dupG koreluje z fenotypem hipercholesterolemii rodzinnej.

W obrębie genu *APOB* zidentyfikowano wariant patogeny c.10580G>A, występujący u 3 pacjentów. Jest to najczęstsza zmiana *APOB* raportowana w populacji kaukaskiej, o potwierdzonym wpływie na wzrost stężenia cholesterolu. Ponadto badanie ujawniło występowanie dwóch potencjalnie patogennych wariantów w obrębie genu *LPL*: c.106G>A i c.953A>G.

Podsumowując, przeprowadzone badanie zidentyfikowało potencjalnie patogene zmiany u 33 z 57 pacjentów pediatrycznych. Zaraportowano 17 różnych wariantów, a ich obecność potwierdzono metodą tradycyjną- sekwencjonowaniem Sangera. Otrzymane dane transparentnie obrazują heterogenność podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej oraz zasadność zastosowania narzędzia wielkoskalowego, jakim jest NGS.

Publikacja 2.

Rutkowska L, Pinkier I, Sałacińska K, Kępczyński Ł, Salachna D, Lewek J, Banach M, Matusik P, Starostecka E, Lewiński A, Płoski R, Stawiński P, Gach A. *Identification of New Copy Number Variation and the Evaluation of a CNV Detection Tool for NGS Panel Data in Polish Familial Hypercholesterolemia Patients*, Genes (Basel). 2022 Aug 10;13(8):1424. doi: 10.3390/genes13081424. PMID: 36011335; PMCID: PMC9407502.

Celem kolejnej publikacji była ocena częstości występowania oraz charakterystyka zmian typu CNV w grupie pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną. Dodatkowo oszacowano przydatność danych po NGS do analiz CNV z wykorzystaniem specyficznego narzędzia bioinformatycznego (DECoN).

Grupę badaną stanowiło 136 pacjentów dorosłych oraz pediatrycznych zrekrutowanych przez Regionalne Centrum Chorób Rzadkich ICZMP. Kryteria jakimi się posługiwano to Simon Broome w odniesieniu do pacjentów pediatrycznych i Dutch Lipid Clinic Network Criteria dla pacjentów dorosłych. Pierwotnie przeprowadzona analiza NGS pozwoliła na identyfikację potencjalnie patogennych wariantów typu SNV u 57 pacjentów. Z pozostałej grupy pacjentów wyselekcjonowano kilkudziesięciu obciążonych najcięższym fenotypem i wykonano u nich badanie techniką MLPA. Analiza wykazała obecność zmiany patogenicznej u 10 z nich. Dane genetyczne osób bez zidentyfikowanego wariantu sprawczego, zostały następnie przeanalizowane bioinformatycznie pod kątem występowania zmian typu CNV. W tym celu pozyskane wcześniej dane NGS poddano reanalizie z wykorzystaniem dedykowanego narzędzia bioinformatycznego (DECoN). Algorytm programu, wykorzystując dane dotyczące głębokości pokrycia obszarów objętych sekwencjonowaniem, wylicza współczynnik liczby kopii dla danego regionu i na tej podstawie szacuje prawdopodobieństwo wystąpienia CNV w jego obszarze. W wyniku tak przeprowadzonej analizy udało się zidentyfikować dwóch nowych pacjentów, z duplikacją eksonów 4-8 genu *LDLR*. Występowanie duplikacji potwierdzono techniką MLPA. Analizy bioinformatycznej dokonano przy współpracy z Zakładem Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Spośród wszystkich 12 zdiagnozowanych pacjentów, u dziewięciu zidentyfikowano heterozygotyczną duplikację eksonów 4-8 genu *LDLR*, u dwóch heterozygotyczną delecję eksonów 6-8 genu *LDLR* i jednego z heterozygotyczną delecją eksonów 9-10 genu *LDLR*. Szczególnie interesujący był przypadek 5-letniej dziewczynki z ekstremalnie

wysokimi stężeniami cholesterolu całkowitego sięgającymi 745 mg/dL (19.27 mmol/L) oraz cholesterolu frakcji LDL na poziomie 693 mg/dL (17.92 mmol/L). Ponadto zaobserwowano u niej występowanie żółtaków powiek, ścięgien Achillesa i zmian w okolicy kolan. Tak zaawansowany obraz hipercholesterolemii potwierdziły badania genetyczne, gdzie oprócz delecji eksonów 9-10 genu *LDLR*, wykryto również heterozygotyczny wariant c.1747C>T w eksonie 12 tego samego genu. Zgodnie z naszą wiedzą, jest to pierwszy taki zareportowany przypadek.

Podsumowując, patogenne zmiany liczby kopii wykryto u 8.8% pacjentów. Najczęstszą zmianą była duplikacja eksonów 4-8 genu *LDLR*, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w innych badaniach w populacji polskiej. Należy jednak zaznaczyć, że dotychczas opublikowano nieliczne badania naukowe raportujące zmiany liczby kopii, co wskazuje na dużą potrzebę rozwoju diagnostyki w tym obszarze. Złotym standardem do identyfikacji tego typu zmian jest technika MLPA, choć jest to metoda czasochłonna i kosztowna. Ogromna potrzeba opracowania metody alternatywnej oraz dynamiczny rozwój sekwencjonowania następnej generacji, zaowocowała powstaniem szeregu skryptów bioinformatycznych, służących do analizy danych po NGS pod kątem zmian typu CNV. Testowany program DECoN spełnił swoje zadanie, jednak nie wszystkie uzyskane odczyty były informatywne, a technika MLPA okazała się być niezbędna do potwierdzenia występowania wykrytych aberracji.

Publikacja 3.

Rutkowska L, Salachna D, Lewandowski K, Lewiński A, Gach, A. *Familial Partial Lipodystrophy—Literature Review and Report of a Novel Variant in PPAR γ Expanding the Spectrum of Disease-Causing Alterations in FPLD3*, *Diagnostics* 2022, 12, 1122. doi.org/10.3390/diagnostics12051122.

Cykl publikacji zamyka praca podsumowującą dotychczasową wiedzę na temat lipodystrofii wrodzonych, ze szczególnym uwzględnieniem rodzinnej lipodystrofii częściowej typu 2 i 3 z prezentacją przypadku klinicznego.

Lipodystrofie to heterogenna grupa ultra-rzadkich zaburzeń (1.3-4.7 przypadków/milion), które charakteryzują się zmianami w obrębie tkanki tłuszczowej. Ze względu na pochodzenie dzielimy je na wrodzone oraz nabyte, biorąc zaś pod uwagę

dystrybucję zmian, na uogólnione i częściowe. Na tej podstawie wyodrębniono cztery główne typy lipodystrofii: wrodzona lipodystrofia uogólniona (CGL), rodzinna lipodystrofia częściowa (FPLD), nabyta lipodystrofia uogólniona (AGL) oraz nabyta lipodystrofia częściowa (APL). Do lipodystrofii pierwotnych należą, wrodzona lipodystrofia uogólniona oraz rodzinna lipodystrofia częściowa. Ich częstość występowania została określona na 1:10 milionów dla CGL oraz 1:1 miliona dla FPLD, choć dane te są zapewne niedoszacowane.

Rodzinna lipodystrofia częściowa zazwyczaj charakteryzuje się utratą tkanki tłuszczowej w obrębie kończyn i pośladków, przy zachowaniu prawidłowej dystrybucji w okolicach brzucha. Manifestacja choroby często przypada na okres dojrzewania. Selektywna utrata adipocytów bezpośrednio przekłada się na prezentowane zaburzenia metaboliczne, takie jak insulinooporność, cukrzyca, dyslipidemia z ciężką hipertriglicerydemią, nadciśnienie czy stłuszczenie wątroby. Fenotyp u kobiet często obarczony jest także hiperandrogenizmem, hirsutyzmem, zespołem policystycznych jajników czy niepłodnością. Wyróżniamy siedem podtypów FPLD, a każdy z nich prezentuje odmienne podłoże genetyczne (geny *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *CIDEA*, *LIPE*, *AKT2* oraz *CAVI*). Warianty sprawcze zlokalizowane w genach *LMNA* oraz *PPARG* odpowiedzialne są za ponad 50% wszystkich przypadków FPLD. Najczęstszą formą FPLD jest rodzinna lipodystrofia częściowa typu 2 (Dunnigan type; OMIM #151660) dziedziczona w sposób autosomalnie dominujący. U podłoża genetycznego choroby leżą zmiany w obrębie genu *LMNA* kodującego laminy jądrowe, takie jak laminy A/C. Laminy A/C oddziałują z cytoszkieletem i zapewniają stabilność strukturalną otoczki jądrowej. Podejrzewa się, że u podstaw występowania FPLD2 leży nieprawidłowy podział komórkowy, nasilona apoptoza oraz zaburzona integracja lamin z chromatyną. Około 90% zmian zlokalizowanych jest w obrębie eksonu 8 genu *LMNA*, a najczęściej raportowanym wariantem jest Arg482Gln. Zmiana ta skutkuje zamianą argininy na glutaminę, w regionie wysoce konserwatywnym dla wszystkich gatunków. FPLD2 charakteryzuje się utratą podskórnej tkanki tłuszczowej w obrębie kończyn i tułowia oraz jej nagromadzeniem wokół szyi, w okolicy podczołowej, nadobojczykowej oraz na twarzy. Zmianom fizycznym towarzyszą zaburzenia metaboliczne, takie jak insulinooporność, hipertriglicerydemia, stłuszczenie wątroby, choroby układu sercowo-naczyniowego czy kardiomiopatie. Molekularną podstawą FPLD3 są mutacje utraty funkcji w genie *PPARG*, zlokalizowanym na krótkim ramieniu chromosomu 3

(3p25.2). Gen *PPARG* koduje białko z podrodziny receptorów jądrowych aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR). Receptory jądrowe PPAR występują w trzech izoformach (*PPARα*, *PPARδ* i *PPARγ*) o różnej dystrybucji tkankowej i funkcjach biologicznych. Receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów (*PPARγ*) jest kluczowym regulatorem różnicowania, dystrybucji i funkcji adipocytów, pośredniczy w gliceroneogenezie, lipolizie, wychwycie, syntezie i magazynowaniu lipidów. Zmutowany *PPARγ* najprawdopodobniej hamuje różnicowanie adipocytów zachodzące podczas adipogenezy, co w rezultacie zaburza prawidłowe funkcjonowanie tkanki tłuszczowej. Cechy kliniczne lipodystrofii typu 3 są podobne do typu 2, choć bywają mniej transparentne. Pacjenci z FPLD3 częściej wykazują utratę podskórnej tkanki tłuszczowej w kończynach dolnych i dystalnych kończynach górnych. Ponadto FPLD3 charakteryzuje się nadciśnieniem tętniczym o wczesnym początku, co może odróżniać FPLD3 od FPLD2.

Opisywanym przypadkiem klinicznym była 29-letnia Pacjentka z charakterystycznymi objawami lipodystrofii częściowej. Fenotypowo obecne złogi tłuszczowe na twarzy, szyi i tułowi, zanik tkanki tłuszczowej połączony z przerostem mięśni kończyn dolnych i hirsutyzm. Opisywane cechy ujawniły się w okresie dojrzewania. W wieku 18 lat, gdy Pacjentka była hospitalizowana, stężenie trójglicerydów wynosiło 1700 mg/dl, a cholesterolu całkowitego 400 mg/dl. Wdrożone leczenie preparatami Lipanthyl (nazwa generyczna - fenofibrat) i Roswera (nazwa generyczna - rosuwastatyna) nie przyniosło oczekiwanego obniżenia parametrów lipidowych. W związku z tym pacjentka zaprzestała przyjmowania leków. Późniejsze badania laboratoryjne potwierdziły występowanie hiperlipidemii mieszanej. W wywiadzie rodzinnym zaobserwowano podobne cechy fizyczne u matki, babki oraz ciotki Pacjentki. Wysłano podejrzenie występowania lipodystrofii częściowej, nieznanego typu. Pacjentkę skierowano na badania genetyczne, celem weryfikacji etiologii choroby. Diagnostykę genetyczną rozpoczęto u 26-letniej Pacjentki. Przeprowadzone sekwencjonowanie panelowe wykazało obecność heterozygotycznego wariantu c.443G>A w eksonie 4 genu *PPARG*. Zmiana ta prowadzi do substytucji glicyny kwasem glutaminowym w pozycji 148 łańcucha aminokwasowego. Obecność tego samego wariantu zidentyfikowano również u syna oraz matki Pacjentki. Badania laboratoryjne 3-letniego syna Pacjentki wykazały obecność hipertriglicerydemii (360 mg/dl). Wykryta zmiana nie była wcześniej raportowana w ogólnodostępnych bazach danych, takich jak HGMD (ang. *Human Gene Mutation*

Database), ClinVar czy LOVD (ang. *Leiden Open Variation Database* 3.0), ani w bazach populacyjnych. Zgodnie z wytycznymi ACMG-AMP (ang. *The American College of Medical Genetics and Genomics-Association for Molecular Pathology*) wariant zaklasyfikowano do grupy czwartej, a więc zmian potencjalnie patogennych. Zmiana zlokalizowana jest w wysoce konserwatywnej domenie DBD w obrębie pierwszego motywu palca cynkowego, struktury zaangażowanej w wiązanie DNA. Modelowanie homologiczne białka uwidocznilo substytucję aminokwasową ($G \rightarrow E$), skutkującą dołączeniem dodatkowego łańcucha bocznego w pozycji 148 łańcucha białkowego. Do oceny stabilności zmutowanego produktu wykorzystano oprogramowanie I-Mutant 2.0. Program oszacował, iż zaistniała substytucja aminokwasowa może wpływać na obniżenie stabilności strukturalnej białka. W literaturze odnotowano obecność podobnych zmian zlokalizowanych w obrębie domeny DBD oraz dowiedziono ich patogenności. Zgodnie z posiadaną przez nas wiedzą, zaprezentowany wariant c.443G>A nie był wcześniej raportowany. Tym samym wariant został zgłoszony do bazy ClinVar jako potencjalnie patogenny i opatrzony numerem VCV001098721.1. Opierając się o programy predykcyjne, dane literaturowe oraz kosegregację wariantu w rodzinie, hipoteza o jego sprawczości wydaje się być zasadna. Przeprowadzenie badań funkcjonalnych stanowiłoby ostateczne potwierdzenie.

7. Podsumowanie

Zaburzenia lipidowe to najczęściej występujący czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w Polsce i na świecie. Niska świadomość społeczna oraz brak systemowych badań przesiewowych, bezpośrednio przyczyniają się do wciąż niewystarczającego poziomu wykrywalności choroby. Niezwykle istotnym jest dokładne poznanie podłoża genetycznego choroby, a tym samym lepsze zrozumienie korelacji genotypowo-fenotypowych.

Prowadzone badania obejmowały grupę 139 pacjentów dorosłych i pediatrycznych z podejrzeniem występowania pierwotnych zaburzeń lipidowych. W przeważającej większości byli to pacjenci z hipercholesterolemią rodzinną, jednak trafili do nas również chorzy z innymi zaburzeniami, jak np. opisana w publikacji nr 3 rodzinna lipodystrofia częściowa. Ze względu na heterogenną grupę badaną jako metodę badawczą wybrano sekwencjonowanie następnej generacji, w technologii TruSeq Custom Amplicon. Stworzenie autorskiego panelu genowego pozwoliło na wybór interesujących nas regionów genomu, a więc genów o znanym i domniemanym wpływie na rozwój wybranych zaburzeń lipidowych. Ze względu na przeważającą większość pacjentów z wstępnym rozpoznaniem hipercholesterolemii, większa część panelu obejmowała geny z nią związane. Wybrana technologia okazała się być skutecznym narzędziem diagnostycznym do detekcji zmian typu SNV w prezentowanej grupie badanej. Sekwencjonowanie panelowe jest techniką umożliwiającą analizę niewielkich grup pacjentów oraz manualną preparatykę bibliotek przez 1-2 osoby, co znacznie upraszcza metodykę badania oraz redukuje jej koszty. Wybór regionów podlegających sekwencjonowaniu, a więc ograniczenie zakresu danych uzyskanych po NGS, bezpośrednio przyczynia się do skrócenia czasu analizy oraz umożliwia postawienia szybkiego rozpoznania. Metody oparte o sekwencjonowanie całoksomowe czy całogenomowe dostarczają gigabajty danych wymagających specjalistycznej obróbki bioinformatycznej i zaawansowanych narzędzi analitycznych, co bezpośrednio przekłada się na wydłużony czas oczekiwania na wynik.

W wyniku analizy NGS potencjalnie patogenne zmiany zidentyfikowano u 33 pacjentów pediatrycznych ze wstępnym podejrzeniem FH. Dodatkowo wykryto trzy warianty o niepewnym znaczeniu klinicznym i jeden czynnik ryzyka. Geny w obrębie, których wykryto zmiany to *LDLR*, *APOB*, *ABCG5* oraz *LPL*. Najwięcej wariantów sprawczych zidentyfikowano w genie *LDLR*, a najczęściej raportowaną zmianą była zamiana

pojedynczego nukleotydu c.1775G>A. W toku analizy zidentyfikowano obecność nowego, dotychczas nieraportowanego wariantu c.373_379delCAGTTCG w eksonie 4 genu *LDLR*. Analiza *in silico* oraz kosegregacja z fenotypem hipercholesterolemii w rodzinie Pacjenta, wskazywała na sprawczy charakter wariantu. Istnieją liczne hipotezy badawcze tłumaczące proces powstawania tego typu mikrolekcji, jednak jedna z nich wydaje się być wysoce korespondująca z opisywanym przypadkiem. Jest to ang. *slipped mispairing hypothesis* związany z występowaniem krótkich, 2-8-nukleotydowych powtórzeń, zlokalizowanych blisko siebie na komplementarnych niciach DNA. Nieprawidłowe parowanie skutkuje powstaniem pętli z pojedynczej nici, która w kolejnych etapach ulega degradacji przez enzymy naprawcze, a to prowadzi do powstania mikrolekcji na tym fragmencie nici. Takie trzy-nukleotydowe powtórzenie występuje w miejscu wykrytej w badaniu mikrolekcji, co może sugerować wyżej opisany mechanizm jej powstania. Aspekt ten szczegółowo omówiono w publikacji nr 1. W pracy opisano także interesujący przypadek 16-letniej Pacjentki z dwiema potencjalnie patogennymi zmianami, w dwóch genach odpowiedzialnych za rozwój FH. Pierwszą z nich była jedno-nukleotydowa insercja skutkująca przesunięciem ramki odczytu c.2416dupG w eksonie 17 genu *LDLR*. Druga to wariant zmiany sensu c.10708C>T w eksonie 26 genu *APOB*. Dopiero wykonanie badań pod kątem występowania obu wariantów u pozostałych członków rodziny pozwoliło zauważyć, że jedynie wariant c.2416dupG koreluje z fenotypem hipercholesterolemii rodzinnej. Badania rodzinne w aspekcie chorób genetycznych są niezwykle cennym źródłem informacji zarówno dla pacjentów i ich dalszego poradnictwa genetycznego, jak i lekarzy i diagnostów. Mimo istnienia obszernych baz danych wariantów, niejednokrotnie prześledzenie rodowodu rodziny w połączeniu z diagnostyką molekularną daje pełen obraz etiologii choroby.

Celem poszerzenia zakresu diagnostyki, szczególnie w przypadku pacjentów obciążonych najcięższym fenotypem bez zmian typu SNV, do obszaru badań dołączono analizę bioinformatyczną danych NGS pod kątem występowania zmian liczby kopii. Jednocześnie wykonano badanie techniką MLPA. Pozwoliło to zidentyfikować zmiany patogenne w genie *LDLR* u 10 pacjentów (siedmiu z duplikacją eksonów 4-8, dwóch z delecją eksonów 6-8 oraz jednego z delecją eksonów 9-10). Algorytm programu DECoN, wykorzystując dane dotyczące głębokości pokrycia obszarów objętych sekwencjonowaniem, wykrył dwóch nowych pacjentów z duplikacją eksonów 4-8 genu *LDLR*. Otrzymane wyniki wydają się potwierdzać ogromny potencjał analiz

bioinformatycznych, które zapewne stanowią narzędzie przyszłości w diagnostyce molekularnej. Niestety dane panelowe ze względu na specyficzny format uzyskiwanych odczytów, są szczególnie problematyczne do tego typu analiz. Warunkuje to potrzebę ciągłego testowania i parowania konkretnego oprogramowania z posiadanymi danymi po NGS.

W trakcie prowadzenia projektu naukowego, do analizy NGS włączono także niewielką grupę pacjentów z podejrzeniem występowania bardzo rzadkiej grupy zaburzeń, jakim są lipodystrofie częściowe. Szczególnie ciekawy okazał się przypadek 29-letniej Pacjentki manifestującej charakterystyczny rozkład tkanki tłuszczowej oraz specyficzne zaburzenia metaboliczne. Pozwoliło to na wysunięcie przypuszczenia o obecności rodzinnej lipodystrofii częściowej typu 2 lub 3. Ze względu na odmienne podłoże genetyczne obu typów lipodystrofii, jako metodę diagnostyczną wybrano sekwencjonowanie następnej generacji. Badanie wykazało obecność nowego, heterozygotycznego wariantu c.443G>A w eksonie 4 genu *PPARG*. Wykryta zmiana nie była wcześniej raportowana w ogólnodostępnych bazach danych. Lokalizacja wariantu w wysoce konserwatywnej domenie DBD, jednoznaczne wskazania programów predykcyjnych, dane literaturowe oraz kosegregacja wariantu z fenotypem w rodzinie Pacjentki, wskazywały na patogeny charakter zmiany. Badania funkcjonalne stanowiłyby ostateczne potwierdzenie wysuniętej tezy.

Podsumowując, zakres prowadzonych badań pozwolił poszerzyć wiedzę na temat podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej oraz rodzinnej lipodystrofii częściowej, z identyfikacją kilku nieraportowanych dotychczas wariantów patogennych. Wybrana do tego celu technologia sekwencjonowania następnej generacji okazała się być skutecznym narzędziem diagnostycznym. Można przypuszczać, że poszerzenie grupy badanej pozwoliłoby zidentyfikować zmiany w genach kandydackich zawartych w panelu, co może stanowić przedmiot dalszych badań. Testowane narzędzie bioinformatyczne, do wykrycia zmian liczby kopii z danych uzyskanych w wyniku sekwencjonowania, spełniło założone zadanie i wydaje się być obiecującym narzędziem do przyszłych analiz. Nawiązana współpraca międzyośrodkowa pozwoliła na dotarcie do wielu ciekawych przypadków i poszerzyła wiedzę na temat etiologii zaburzeń lipidowych w populacji polskiej.

8. Wnioski

1. Podłoże genetyczne hipercholesterolemii rodzinnej w grupie pacjentów pediatrycznych wykazuje znaczną heterogenność, przy czym przeważająca większość wariantów patogennych lokalizuje się w genie *LDLR*.
2. Zastosowana metoda sekwencjonowania następnej generacji z wykorzystaniem dedykowanego panelu genowego okazała się dobrze zaprojektowanym narzędziem diagnostycznym, umożliwiającym szybką oraz precyzyjną identyfikację podłoża genetycznego choroby.
3. Wykorzystanie danych uzyskanych z panelowego NGS do oceny zmian liczby kopii z zastosowaniem specjalistycznych narzędzi bioinformatycznych jest możliwe, jednak taka strategia analizy CNV wymaga potwierdzenia inną metodą.
4. Cechy fenotypowe lipodystrofii częściowej nie pozwalają na postawienie jednoznacznego rozpoznania klinicznego z uwzględnieniem podtypu choroby, dlatego molekularne badanie genetyczne jest niezbędnym elementem postępowania diagnostycznego.
5. Identyfikacja nieopisanego wcześniej wariantu w genie *PPARG* poszerza dotychczasową wiedzę na temat podłoża genetycznego rodzinnej lipodystrofii częściowej. Uzasadnia to również wybór sekwencjonowania następnej generacji jako kompleksowego narzędzia diagnostycznego, do identyfikacji zmian typu SNV u pacjentów z lipodystrofią wrodzoną.

9. Piśmiennictwo

1. Yanai, H.; Yoshida, H. Secondary Dyslipidemia: Its Treatments and Association with Atherosclerosis. *Glob. Heal. Med.* **2021**, *3*, 15–23, doi:10.35772/ghm.2020.01078.
2. Szymański, F.M.; Mickiewicz, A.; Dzida, G.; Gorczyca-Głowacka, I.; Kozłowski, D.; Widecka, K.; Kasiński, Z.; Kobayashi, A.; Hering, D.; Mizia-Stec, K.; et al. Management of Dyslipidemia in Poland: Interdisciplinary Expert Position Statement Endorsed by the Polish Cardiac Society Working Group on Cardiovascular Pharmacotherapy. The Fourth Declaration of Sopot. *Cardiol. J.* **2022**, *29*, 1–26, doi:10.5603/CJ.a2021.0147.
3. Banach, M.; Burchardt, P.; Chlebus, K.; Dobrowolski, P.; Dudek, D.; Dyrbuś, K.; Gąsior, M. Diagnostyki I Leczenia Zaburzeń Lipidowych W Polsce 2021. **2021**. <https://nadcisnienietetnicze.pl/sites/scm/files/202201/Wytyczne%20PTLKLWP%20PTKPTDLPTDPTNT%20diagnostyki%20i%20leczenia%20zaburze%C5%84%20lipidowych%20w%20Polsce%202021.pdf>
4. März, W.; Kleber, M.E.; Scharnagl, H.; Speer, T.; Zewinger, S.; Ritsch, A.; Parhofer, K.G.; Eckardstein, A. Von; Landmesser, U.; Laufs, U. HDL Cholesterol : Reappraisal of Its Clinical Relevance. *Clin. Res. Cardiol.* **2017**, *106*, 663–675, doi:10.1007/s00392-017-1106-1.
5. Elmehdawi R. Hypolipidemia: a word of caution. *Libyan J Med.* **2008** Jun 1;3(2):84-90. doi: 10.4176/071221. PMID: 21499464; PMCID: PMC3074286.
6. Pająk, A.; Szafraniec, K.; Polak, M.; Polakowska, M.; Kozela, M.; Piotrowski, W.; Kwaśniewska, M.; Podolecka, E.; Kozakiewicz, K.; Tykarski, A.; et al. Changes in the Prevalence, Treatment, and Control of Hypercholesterolemia and Other Dyslipidemias over 10 Years in Poland: The WOBASZ Study. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **2016**, *126*, 642–652, doi:10.20452/pamw.3464.
7. Roth, G.A.; Mensah, G.A.; Johnson, C.O.; Addolorato, G.; Ammirati, E.; Baddour, L.M.; Barengo, N.C.; Beaton, A.; Benjamin, E.J.; Benziger, C.P.; et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *76*, 2982–3021, doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010.

8. Qiao, Y.N.; Zou, Y.L.; Guo, S.D. Low-Density Lipoprotein Particles in Atherosclerosis. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 1–15, doi:10.3389/fphys.2022.931931.
9. Jarzabek, K.; Sobczyk, A.; Sobczyk, W.; Łabuzek, K.; Belowski, D. Koncepcja Niestabilnej Blaszkii Miażdżycowej i Farmakologiczne Strategie Terapeutyczne (The Concept of Unstable Atherosclerotic Plaque and Pharmacological Therapeutic Strategies) *Chirurgia Pol* **2015**, *17*, 1–2, 49–68 ISSN 1507–5524.
10. Podgórski, M.; Szatko, K.; Stańczyk, M.; Pawlak-Bratkowska, M.; Konopka, A.; Starostecka, E.; Tkaczyk, M.; Góreczny, S.; Rutkowska, L.; Gach, A.; et al. ‘apple Does Not Fall Far from the Tree’ - Subclinical Atherosclerosis in Children with Familial Hypercholesterolemia. *Lipids Health Dis.* **2020**, *19*, 1–9, doi:10.1186/s12944-020-01335-2.
11. Lim, G.B. Lipids: Atherosclerosis Begins ‘Shortly after Birth’ in Children with FH. *Nat. Rev. Cardiol.* **2014**, *11*, 3, doi:10.1038/nrcardio.2013.183.
12. Cybulska, B.; Kłosiewicz-Latoszek, L.; Penson, P.E.; Nabavi, S.M.; Lavie, C.J.; Banach, M. How Much Should LDL Cholesterol Be Lowered in Secondary Prevention? Clinical Efficacy and Safety in the Era of PCSK9 Inhibitors. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2021**, *67*, 65–74, doi:10.1016/j.pcad.2020.12.008.
13. Lewek, J.; Konopka, A.; Starostecka, E.; Penson, P.E.; Maciejewski, M.; Banach, M. Clinical Features of Familial Hypercholesterolemia in Children and Adults in Eas-Fhsc Regional Center for Rare Diseases in Poland. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1–12, doi:10.3390/jcm10194302.
14. Sampson, M.; Ballout, R.A.; Soffer, D.; Wolska, A.; Wilson, S.; Meeusen, J.; Donato, L.J.; Fatica, E.; Otvos, J.D.; Brinton, E.A.; et al. A New Phenotypic Classification System for Dyslipidemias Based on the Standard Lipid Panel. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 1–21, doi:10.1186/s12944-021-01585-8.
15. Berberich, A.J.; Hegele, R.A. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr. Rev.* **2022**, *43*, 611–653, doi:10.1210/endrev/bnab037.
16. Grabiński, M. Hiperlipidemie u Dzieci (Hyperlipidemias in Children). *Advances in Clinical and Experimental Medicine* **2007**, vol. 16, nr 1, 165–171.
17. Sharifi, M.; Futema, M.; Nair, D.; Humphries, S.E. Genetic Architecture of

- Familial Hypercholesterolaemia. *Curr. Cardiol. Rep.* **2017**, *19*, doi:10.1007/s11886-017-0848-8.
18. Medicum, C.; Medicum, C.; Medicum, C.; Medicum, C.; Medicum, C. Autosomalna Dominująca Hipercholesterolemia – Niedoceniony Problem Diagnostyczny i Kliniczny Autosomal Dominant Hypercholesterolemia – Underrecognised Diagnostic and Clinical Problem. **2009**.
 19. Banderali, G.; Capra, M.E.; Biasucci, G.; Stracquadaino, R.; Viggiano, C.; Pederiva, C. Detecting Familial Hypercholesterolemia in Children and Adolescents: Potential and Challenges. *Ital. J. Pediatr.* **2022**, *48*, 1–6, doi:10.1186/s13052-022-01257-y.
 20. Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Uribe, K.B.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Alonso-Estrada, R.; Aguilo-Arce, J.; Ostolaza, H.; Palacios, L.; Martin, C. Mutation Type Classification and Pathogenicity Assignment of Sixteen Missense Variants Located in the EGF-Precursor Homology Domain of the LDLR. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1727, doi:10.1038/s41598-020-58734-9.
 21. Chmara, M.; Wasag, B.; Zuk, M.; Kubalska, J.; Wegrzyn, A.; Bednarska-Makaruk, M.; Pronicka, E.; Wehr, H.; Defesche, J.C.; Rynkiewicz, A.; et al. Molecular Characterization of Polish Patients with Familial Hypercholesterolemia: Novel and Recurrent LDLR Mutations. *J. Appl. Genet.* **2010**, *51*, 95–106.
 22. Gidding, S.S.; Champagne, M.A.; De Ferranti, S.D.; Defesche, J.; Ito, M.K.; Knowles, J.W.; McCrindle, B.; Raal, F.; Rader, D.; Santos, R.D.; et al. The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation* **2015**, *132*, 2167–2192, doi:10.1161/CIR.0000000000000297.
 23. Rodríguez-Jiménez, C.; de la Peña, G.; Sanguino, J.; Poyatos-Peláez, S.; Carazo, A.; Martínez-Hernández, P.L.; Arrieta, F.; Mostaza, J.M.; Gómez-Coronado, D.; Rodríguez-Nóvoa, S. Identification and Functional Analysis of APOB Variants in a Cohort of Hypercholesterolemic Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 86–88, doi:10.3390/ijms24087635.
 24. Guo, Q.; Feng, X.; Zhou, Y. PCSK9 Variants in Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Synopsis. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 1–13,

doi:10.3389/fgene.2020.01020.

25. Czajka, M.; Rachubik, P.; Rzeszutek, J.; Matysiak, M.; Kruszewski, M.; Kapka-Skrzypczak, L. Gene Polymorphism and Dyslipidemias. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes. Metab.* **2015**, *21*, 37–45, doi:10.18544/PEDM-21.01.0023.
26. Oliveira, H.C.F.; De Faria, E.C. Cholesteryl Ester Transfer Protein: The Controversial Relation to Atherosclerosis and Emerging New Biological Roles. *IUBMB Life* **2011**, *63*, 248–257, doi:10.1002/iub.448.
27. Bagias, C.; Xiarchou, A.; Bargiota, A.; Tigas, S. Familial Partial Lipodystrophy (FPLD): Recent Insights. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes.* **2020**, *13*, 1531–1544, doi:10.2147/DMSO.S206053.
28. Pauli, N.; Rac, M. PCSK9 - New Perspectives for Lipid-Lowering Pharmacotherapy in Patients with Coronary Artery Disease. *Farm. Pol.* **2020**, *76*, 312–317, doi:10.32383/farmopol/125671.

10. Streszczenie w języku polskim

Dyslipidemie pierwotne to szeroka grupa zaburzeń o podłożu genetycznym, charakteryzująca się nieprawidłową gospodarką lipidową. W grupie tej możemy wyróżnić m.in. hipercholesterolemie monogenowe, hiperalfalipoproteinemie monogenowe, hipoalfalipoproteinemie monogenowe, hipertriglicerydemie monogenowe oraz lipodystrofie wrodzone. Najczęstszą z nich jest hipercholesterolemia rodzinna (FH) dziedziczona w sposób autosomalnie dominujący, o częstości występowania 1:200-250 dla postaci heterozygotycznej i 1:160,000-300,000 dla postaci homozygotycznej. Specyficzne cechy fenotypowe, będące bezpośrednim następstwem podwyższonego stężenia LDL-c, to tkankowe złogi cholesterolu gromadzące się pod postacią żółtaków ścięgien Achillesa, ścięgien prostowników dłoni i stóp, rzadziej zmian na powiekach czy obwodzie rogówki. Postępująca uogólniona miażdżycza tętnic leży u podłoża występujących nagłych incydentów sercowo-naczyniowych. Wczesne rozpoznanie choroby, szybka diagnostyka oraz niezwłoczne wdrożenie farmakoterapii stanowią jedyny sposób na efektywne zahamowanie postępujących zmian miażdżycowych. Najczęściej stosowane kryteria diagnostyczne ułatwiające rozpoznanie FH to Dutch Lipid Clinic Network Criteria oraz Simon Broome Criteria. Klasyfikacje te oparte są o parametry lipidowe, cechy fenotypowe oraz potwierdzone warianty sprawcze w genach *LDLR*, *APOB* lub *PCSK9*. Poznane dotąd podłoża genetyczne FH to głównie mutacje genu receptora LDL (86-88% przypadków FH), rzadziej apolipoproteiny B (12%) lub proproteinowej konwertazy subtylizyny/keksyny typu 9 (<2%). Ze względu na heterogenne podłoża FH i wciąż znaczny odsetek pacjentów niezdiagnozowanych, istnieje duża potrzeba badań genetycznych, zarówno w zakresie zmian w obrębie trzech głównych genów, jak i poszukiwania wariantów w genach kandydackich. Jednym z celów prowadzonych badań była analiza podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej u pacjentów pediatrycznych, z poszukiwaniem nowych wariantów patogennych w genach znanych i kandydackich. W tym celu zastosowano sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem autorskiego panelu genowego. Pozwoliło to na zidentyfikowanie wariantów patogennych u 33 spośród 57 zrekrutowanych pacjentów pediatrycznych. Wśród siedemnastu zareportowanych zmian dwanaście stanowiły warianty zmiany sensu, trzy zmiany skutkujące przesunięciem ramki odczytu oraz dwa warianty splicingowe. Wykryto także trzy warianty o niepewnym znaczeniu klinicznym i jeden czynnik ryzyka. Geny w obrębie, których wykryto zmiany

to *LDLR*, *APOB*, *ABCG5* oraz *LPL*. W toku analizy zidentyfikowano również obecność nowego, dotychczas nieraportowanego wariantu c.373_379delCAGTTCG, skutkującego przesunięciem ramki odczytu w eksonie 4 genu *LDLR* (Publikacja nr 1). Kolejnym zakładanym celem badań była ocena częstości występowania oraz charakterystyka zmian typu CNV z wykorzystaniem specyficznego narzędzia bioinformatycznego (DECoN) umożliwiającego analizę danych po NGS. Grupę badaną stanowiło 136 pacjentów dorosłych oraz pediatrycznych. Z grupy tej wyselekcjonowano kilkudziesięciu pacjentów obciążonych najcięższym fenotypem, bez zidentyfikowanych zmian typu SNV w badaniu NGS i niezwłocznie wykonano u nich badanie techniką MLPA. Dane pozostałych pacjentów uzyskane w wyniku sekwencjonowania poddano reanalizie w programie DECoN. Pozwoliło to zidentyfikować dwóch dodatkowych pacjentów obarczonych duplikacją eksonów 4-8 genu *LDLR* (Publikacja nr 2).

W trakcie prowadzenia projektu naukowego, do analizy NGS włączono także niewielką grupę pacjentów z podejrzeniem występowania, bardzo rzadkiej grupy zaburzeń lipidowych, jakim są lipodystrofie częściowe. W toku analizy wykryto nowy, heterozygotyczny wariant c.443G>A w eksonie 4 genu *PPARG* u pacjentki z hipertriglicerydemią i cechami fenotypowymi lipodystrofii częściowej. Zidentyfikowanie zmiany pozwoliło postawić diagnozę rodzinnej lipodystrofii częściowej typu 3 (Publikacja nr 3).

Uzyskane wyniki stanowią zwieńczenie badań prowadzonych w latach 2016-2022 w ramach projektu naukowego, przyczyniając się do lepszego poznania podłoża genetycznego hipercholesterolemii rodzinnej i rodzinnej lipodystrofii częściowej. Ponadto, pozwoliły one ocenić skuteczność panelowego sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce zaburzeń lipidowych oraz możliwości wykorzystania danych po NGS, do analizy CNV z użyciem nowatorskich narzędzi bioinformatycznych.

11. Streszczenie w języku angielskim

Primary dyslipidemias are a group of genetic disorders characterized by abnormal lipid metabolism. This group includes monogenic hypercholesterolemia, monogenic hyperalphalipoproteinemia, monogenic hypoalphalipoproteinemia, monogenic hypertriglyceridemia, and congenital lipodystrophies. Familial hypercholesterolemia (FH) constitutes the most common form of inherited dyslipidemia, inherited in an autosomal dominant manner. The prevalence of the heterozygous form (HeFH) is estimated to be 1:200-250, while the homozygous form (HoFH) is estimated at 1:160,000–300,000. Elevated LDL-c leads to specific phenotypic features, such as tissue cholesterol deposits that accumulate in the form of xanthelasma in the Achilles tendons, extensor tendons of the hands and feet, and less commonly, eyelid or corneal peripheral lesions. Sudden cardiovascular incidents are often caused by progressive generalized arteriosclerosis. Early diagnosis and prompt implementation of pharmacotherapy are crucial in inhibiting progressive atherosclerotic lesions. The Dutch Lipid Clinic Network Criteria and the Simon Broome Criteria are the most commonly used diagnostic criteria for FH. They are based on lipid parameters, phenotypic features, and confirmed causative variants in the *LDLR*, *APOB* or *PCSK9* genes. The genetic basis of familial hypercholesterolemia (FH) is mainly attributed to mutations in the LDL receptor gene, accounting for 86-88% of FH cases. Less frequently, mutations in apolipoprotein B (12%) or proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (<2%) are responsible. To address the heterogeneous nature of FH and the significant proportion of undiagnosed patients, genetic studies are crucial. The aim of the study was to identify potentially pathogenic FH-related variants in known and candidate genes in pediatric patients, using customized next generation sequencing (NGS). Sequencing data analysis revealed possibly pathogenic variants in 33 out of 57 pediatric cases. Among the seventeen presumed pathogenic variants, twelve were missense, three frameshift and two splice site mutations. In addition, three variants of uncertain significance and one risk factor were also detected. The affected genes were *LDLR*, *APOB*, *ABCG5* and *LPL*. NGS analysis revealed the presence of a novel 7bp frameshift deletion c.373_379delCAGTTCG in the exon 4 of the *LDLR* gene (Publication 1). The second aim of the study was to identify novel CNV changes in FH patients using targeted sequencing and evaluation of CNV calling tool (DECoN) working on gene panel NGS data. A group of 136 adult and child patients were recruited for the study. A few patients with the most severe phenotype, who did not have

any SNV alterations identified by NGS, were immediately tested using the MLPA technique. The sequencing data of the remaining patients were reanalyzed using DECoN, which led to the identification of two more patients with duplication of exons 4-8 of the *LDLR* gene (Publication 2).

Additionally, a small group of patients with suspected partial lipodystrophies, a rare group of lipid disorders, were included in the NGS analysis. A novel missense heterozygous variant c.443G>A in exon 4 of the *PPARG* gene was detected in the affected patient. The patient presents phenotypic features of partial lipodystrophy, accompanied by severe hypertriglyceridemia. The identification of the variation enabled the diagnosis of familial partial lipodystrophy type 3 to be made (Publication 3).

The results of this study, conducted between 2016 and 2022, have contributed to a better understanding of the genetic background of familial hypercholesterolemia and familial partial lipodystrophy. Furthermore, this study enabled us to evaluate the efficacy of panel-based next-generation sequencing in diagnosing lipid disorders and the potential for utilizing post-NGS data for CNV analysis with innovative bioinformatics tools.

Article

Identification of New Genetic Determinants in Pediatric Patients with Familial Hypercholesterolemia Using a Custom NGS Panel

Lena Rutkowska ^{1,*}, Kinga Salacińska ¹, Dominik Salachna ¹, Paweł Matusik ², Iwona Pinkier ¹, Łukasz Kępczyński ¹, Małgorzata Piotrowicz ¹, Ewa Starostecka ³, Andrzej Lewiński ^{3,4,*} and Agnieszka Gach ^{1,*}

- ¹ Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, 93-338 Lodz, Poland; kinga.salacinska.lodz@gmail.com (K.S.); dominik.salachna@iczmpl.edu.pl (D.S.); iwona.pin@interia.pl (I.P.); lukasz.kepczynski@iczmpl.edu.pl (Ł.K.); mpmag@wp.pl (M.P.)
- ² Department of Pediatrics, Pediatric Obesity and Metabolic Bone Diseases, Faculty of Medical Sciences in Katowice, Medical University of Silesia, 40-055 Katowice, Poland; endocrin@wp.pl
- ³ Department of Endocrinology and Metabolic Disease, Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, 93-338 Lodz, Poland; ewastarostecka@wp.pl
- ⁴ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland
- * Correspondence: lena.rutkowska@iczmpl.edu.pl (L.R.); andrzej.lewinski@iczmpl.edu.pl (A.L.); a.gach@iczmpl.edu.pl (A.G.)



Citation: Rutkowska, L.; Salacińska, K.; Salachna, D.; Matusik, P.; Pinkier, I.; Kępczyński, Ł.; Piotrowicz, M.; Starostecka, E.; Lewiński, A.; Gach, A. Identification of New Genetic Determinants in Pediatric Patients with Familial Hypercholesterolemia Using a Custom NGS Panel. *Genes* **2022**, *13*, 999. <https://doi.org/10.3390/genes13060999>

Academic Editor: Mariann Harangi

Received: 13 May 2022

Accepted: 30 May 2022

Published: 1 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The most common form of inherited lipid disorders is familial hypercholesterolemia (FH). It is characterized primarily by high concentrations of the clinical triad of low-density lipoprotein cholesterol, tendon xanthomas and premature CVD. The well-known genetic background are mutations in *LDLR*, *APOB* and *PCSK9* gene. Causative mutations can be found in 60–80% of definite FH patients and 20–30% of those with possible FH. Their occurrence could be attributed to the activity of minor candidate genes, whose causal mechanism has not been fully discovered. The aim of the conducted study was to identify disease-causing mutations in FH-related and candidate genes in pediatric patients from Poland using next generation sequencing (NGS). An NGS custom panel was designed to cover 21 causative and candidate genes linked to primary dyslipidemia. Recruitment was performed using Simon Broome diagnostic criteria. Targeted next generation sequencing was performed on a MiniSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) using a 2 × 150 bp paired-end read module. Sequencing data analysis revealed pathogenic and possibly pathogenic variants in 33 out of 57 studied children. The affected genes were *LDLR*, *APOB*, *ABCG5* and *LPL*. A novel pathogenic 7bp frameshift deletion c.373_379delCAGTTTCG in the exon 4 of the *LDLR* gene was found. Our findings are the first to identify the c.373_379delCAGTTTCG mutation in the *LDLR* gene. Furthermore, the double heterozygous carrier of frameshift insertion c.2416dupG in the *LDLR* gene and missense variant c.10708C>T in the *APOB* gene was identified. The c.2416dupG variant was defined as pathogenic, as confirmed by its cosegregation with hypercholesterolemia in the proband's family. Although the *APOB* c.10708C>T variant was previously detected in hypercholesterolemic patients, our data seem to demonstrate no clinical impact. Two missense variants in the *LPL* gene associated with elevated triglyceride plasma level (c.106G>A and c.953A>G) were also identified. The custom NGS panel proved to be an effective research tool for identifying new causative aberrations in a genetically heterogeneous disease as familial hypercholesterolemia (FH). Our findings expand the spectrum of variants associated with the FH loci and will be of value in genetic counseling among patients with the disease.

Keywords: familial hypercholesterolemia; genetics; next generation sequencing; *LDLR* gene; dyslipidemia; novel variant; pediatric patients

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) remain the leading cause of death worldwide, with an estimated 17.9 million deaths attributed to cardiovascular incidents each year [1]. The underlying cause of CVD is the continual deposition of lipoproteins and calcium in the arterial intima, resulting in the development of inflammation and subsequent fibrosis, called arteriosclerosis. Although the clinical complications of atherosclerosis usually present in middle age, it is well known that atherosclerotic plaque may start to build up at a young age; indeed, reports exist of fatty streaks in the aortas and coronary arteries in patients aged only 10 years [2]. Efficient diagnosis of dyslipidemia and the implementation of early treatment in children may reduce their risk of accelerated atherosclerosis and premature CVD. A key role in the development of atherosclerosis in children is played by inherited factors known to cause high blood lipid levels; it is believed that such familial hypercholesterolemia (FH) is present in 1 in 31 individuals with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD), especially those with premature ASCVD (around 1 in 15 individuals). No other single disorder is responsible for so many ASCVD patients [3].

Familial hypercholesterolemia (FH) constitutes the most common form of inherited dyslipidemia. It is mainly characterized by high concentrations of the clinical triad of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, tendon xanthomas and premature CVD. Atherogenic cholesterol-rich LDLs are usually removed from circulation in the liver; however, any hepatic dysfunction results in their accumulation in the artery wall [4]. Their deposition in the artery stimulates an inflammatory response, which in turn results in damage to the wall and the formation of atherosclerotic plaques: coronary calcification is present in about 25% of 11- to 23-year-old children and young adults with heterozygous FH [4].

The prevalence of the heterozygous form (HeFH) is estimated to be 1:500, but recent studies suggest that it could be as high as 1:250 to 1:380 [5]. The most severe form of FH is homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH). Similarly to HeFH, the incidence of HoFH is greater than previously thought, being currently estimated at 1:160,000–300,000 [6], this greater prevalence could be due to a combination of increased awareness of the disease and the rapid development of genetic testing. The genetic background of FH includes mutations in *LDLR* (low-density lipoprotein receptor gene), *APOB* (apolipoprotein B gene) and *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene).

However, in most cases, hypercholesterolemia is caused by a loss-of-function mutation in *LDLR*, and over 2000 functional mutations have been documented so far in this gene [5]. The low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene family consists of cell surface proteins involved in the receptor-mediated endocytosis of specific ligands. *LDLR* plays a critical role in the homeostatic control of blood cholesterol by mediating its removal from circulation. Lipoproteins are bound to the LDL receptor and taken into the lysosomes to be degraded, following which the unoccupied receptor cycles back to the cell surface. Plasma LDL is then eliminated primarily via hepatic *LDLR* [7]. The various stages involved in the posttranslational processing, binding, uptake and subsequent dissociation of the LDL particle-receptor complex are subject to disruption by mutations in the *LDLR* gene, resulting in the development of lipid disorders [8].

The LDL receptor also captures and binds the apolipoprotein B and apolipoprotein E; lipoproteins are responsible for controlling the cellular uptake of lipoproteins by carrying lipids, including cholesterol. The presence of *APOB* or *APOE* mutations results in structural rearrangements within apolipoprotein domains, resulting in improper lipid binding and, thus, high blood lipid levels. The protein that regulates the exposure of the LDL receptor on the hepatocyte surface and thus regulates LDL particle uptake is *PCSK9*. Circulating *PCSK9* binds to *LDLR* and targets it for lysosomal degradation. Both *PCSK9* and *LDLR* gene expression is coregulated at the transcriptional level by *SREBP-2* (sterol regulatory element-binding protein-2) [9]. Gain-of-function mutations in *PCSK9* gene lead to autosomal dominant hypercholesterolemia, while loss-of-function mutations are associated with reduced LDL-C plasma levels [7]. In the last decade, *PCSK9* inhibitors have become a major drug target in cardiovascular medicine. In addition, a broad range of minor

potential FH genes are continually being identified, such as *STAP1* (signal-transducing adaptor family member 1), which has been proposed as a fourth causative gene for familial hypercholesterolemia, even though the molecular mechanisms by which the adapter protein could affect cholesterol metabolism remain unclear [10,11].

Most FH patients are known to carry autosomal dominant mutations in the *LDLR*, *APOB* or *PCSK9* gene. Despite this, some patients also present a rare autosomal recessive form of the disease caused by a homozygous or compound heterozygous mutation in the *LDLRAP1* gene. The *LDLRAP1* protein binds to *LDLR* and allows the internalization of the LDL-*LDLR* complex on the hepatocyte surface. The resulting molecular defects in *LDLRAP1* may impair the LDL-cholesterol metabolism by causing a severe reduction of LDL uptake [12].

The next core component that plays a key role in the lipoprotein metabolism is lipoprotein lipase (LPL), encoded by the *LPL* gene. This enzyme hydrolyses the triglycerides carried in chylomicrons and VLDL to fatty acids, which can be taken up by cells. Alterations in the *LPL* gene contribute to severe hypertriglyceridemia. The activity of the LPL enzyme is regulated by four apolipoproteins: ApoC1, ApoC2, ApoC3 and ApoA5. Apolipoprotein C2 serves as a cofactor, while ApoA5 probably works as an LPL activator. Alterations in the *APOC2* or *APOA5* genes can potentially affect enzyme activity. In addition, proper LPL functioning requires the activity of *GPIHBP1*, expressed on capillary endothelial cells. Its primary function is to bind LPL in the subendothelial spaces and transport it to the capillary lumen. Various *GPIHBP1* mutations have been found to prevent *GPIHBP1* from binding LPL, resulting in invalid processing of TG and severe hypertriglyceridemia [13].

It is estimated that FH-causing mutations can be found in 60–80% of definite FH patients and 20–30% of those with possible FH [14]. However, in other pediatric cases, the diagnosis can be complicated by the presence of a polygenic background or mutations in one of many candidate genes related to primary dyslipidemia. Next-generation sequencing (NGS) has presented an opportunity to identify additional ultra-rare causes of FH, including atypical clinical manifestations resulting from rare mutations in the *APOA5*, *STAP1* or *LIPA* genes. Targeted NGS allows massive parallel sequencing to be performed on regions of interest, providing a wide range of obtained data to better understand the heterogeneity of familial hypercholesterolemia.

Several different types of clinical diagnostic criteria have been established for FH globally, such as Dutch Lipid Clinical Network (DLCN), Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths (MedPed) diagnostic criteria or Simon Broome diagnostic criteria [3]. The Simon Broome diagnostic criteria and DLCN are generally based on similar assumptions, such as elevated cholesterol level, clinical characteristics, family history of CVD and molecular diagnosis. The MedPed classification is based on plasma cholesterol level and is dependent on patient age and family history [15]. As characteristic phenotype indicators are not revealed until a certain age in most pediatric patients, the clinical diagnosis is often based on lipid profile and a family history of CVD. Furthermore, as LDL cholesterol concentrations fluctuate greatly during adolescence, a mild course may go unnoticed. Childhood is the optimal period for FH diagnosis, due to the minimal dietary or hormonal impact, and all suspected individuals should be promptly referred to genetic testing. An accurate confirmatory diagnosis can greatly increase the compliance of long-term preventive therapy, especially in pediatric patients.

The aim of the study was to identify known and new genetic variants in pediatric patients with familial hypercholesterolemia using a custom NGS panel. Our hypothesis assumes that the genetic background of familial hypercholesterolemia in children is highly heterogeneous and NGS is thus a suitable tool for diagnosing it.

2. Materials and Methods

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using a MagCore automatic nucleic acid extractor (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan). The quantitative and qualitative assessment of extracted DNA was performed on a NanoDrop 2000 spec-

trophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In accordance with the Illumina protocol, the samples were measured using a Quantus Fluorometer (Promega, Madison, WI, USA) and diluted to the required concentration (10 ng/μL). The library preparation procedure was conducted in accordance with Illumina TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Reference Guide. Hybridization, ligation and PCR protocol were carried out with a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), as recommended. The indexed samples were pooled, diluted and combined with 1% PhiX control. Targeted next generation sequencing (NGS) was performed on a MiniSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) using a 2 × 150 bp paired-end read module. The minimum reading depth was 100-fold. A custom NGS panel containing 21 causative and candidate genes linked to familial hypercholesterolemia and other primary dyslipidemias was designed using Illumina DesignStudio software. The following genes included: *ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *APOA5*, *APOB*, *APOC2*, *APOE*, *CYP7A1*, *GPIHBP1*, *LCAT*, *LDLR*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *LMF1*, *LMNA*, *LPL*, *PCSK9*, *PPARG*, *SCAP*, *SREBF2*, *STAP1*.

The obtained NGS data were processed and analyzed by VariantStudio Software, compatible with the Illumina platform. The pathogenicity of the variants was determined in silico using web-based software, such as PolyPhen2, SIFT and Mutation Taster. Searches for phenotype–genotype correlations were evaluated using PubMed, LOVD or VARSOME databases. Variants were classified according to current American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines [16].

The presence of selected variants was confirmed by bidirectional Sanger sequencing on a 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). DNA Variant Analysis was performed using Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, State College, PA, USA).

The inclusion criteria for the study were the Simon Broome diagnostic criteria. The most commonly used are the Dutch Lipid Clinical Network Criteria, but those cannot be applied to pediatric patients. According to the Simon Broome diagnostic criteria, definite familial hypercholesterolemia occurs when a child below 16 years of age has a total cholesterol level greater than 260 mg/dL or an LDL-cholesterol above 155 mg/dL. Furthermore, it is necessary to confirm the presence of tendon xanthomas in the proband child or their first/second degree relative or DNA-based evidence of an *LDLR*, *APOB* or *PCSK9* mutation. In a child under 16 years, familial hypercholesterolemia can be suspected in cases characterized by equivalent LDL-C and total cholesterol levels, without tendon xanthomas or a DNA-based test but with a positive family history, i.e., presence of myocardial infarction in relatives or total cholesterol level greater than 290 mg/dL in adult relatives or 260 mg/dL in relatives under 16 years. For children and adults over 16 years old, the lipid cut-offs are TC greater than 290 mg/dL or LDL-cholesterol above 190 mg/dL.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute (opinion number 15/2016, date of approval 12 January 2016). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. The entire study was performed in the Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, Lodz, Poland.

3. Results

A group of 57 children with a clinical suspicion of familial hypercholesterolemia (FH) was recruited for the present study. The children ranged in age from 2 to 17 years (mean age: 10). In the study group, 48 patients fulfilled the Simon Broome criteria for lipids, of which 33 presented pathogenic aberrations. Among the eight participants not meeting the criteria, only one obtained a positive genetic result. Patient age, lipid profile and obtained diagnostic results are shown in Table 1. Sibling cases are labelled with the same number with an 'A' and 'B' designation.

Table 1. Patient data and obtained genetic results.

Patient	Age	Sex	TC [mg/dL]	LDL-C [mg/dL]	HDL-C [mg/dL]	TG [mg/dL]	NGS Result HGVS	Gene
1.	15	M	293	253	42	45	-	
2A.	6	F	228	152	NA	47	-	
2B.	10	F	226	155	51	98	-	
3.	11	M	228	134	55	190	NM_022436.2:c.593G>A	ABCG5
4.	3	F	277	222	47	43	-	
5.	9	F	312	248	37	137	NM_000527.4:c.1846-2A>C	LDLR
6.	16	F	280	200	50	102	NM_000527.4:c.2416dupG	LDLR
7A.	5	F	278	170	61	110	NM_000384.2:c.10708C>T	APOB
7B.	10	M	426	348	56	82	NM_000527.4:c.373_379delCAGTTTCG	LDLR
8.	12	M	318	237	67	73	NM_000527.4:c.373_379delCAGTTTCG	LDLR
9A.	13	M	303	237	49	137	NM_000527.4:c.190+1G>A	LDLR
9B.	17	F	289	218	39	162	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
10.	8	F	265	165	73	138	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
11.	13	M	218	156	48	121	NM_022436.2:c.1285G>A	ABCG5
12A.	13	F	234	171	40	90	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
12B.	14	F	233	191	42	102	-	
13.	10	M	193	135	45	NA	-	
14.	10	M	279	150	44	138	NM_000237.2:c.106G>A	LPL
15.	14	F	336	267	52	106	-	
16.	10	M	239	174	53	125	-	
17.	9	F	252	165	53	47	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
18.	4	F	266	200	44	111	NM_000384.2:c.10580G>A	APOB
19.	9	F	283	201	69	65	-	
20.	9	F	290	188	64	188	-	
21.	6	F	219	137	76	50	-	
22.	2	F	278	216	25	546	-	
23.	5	M	307	240	52	73	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
24.	13	F	NA	NA	NA	NA	NM_000527.4:c.284G>T	LDLR
25.	6	F	348	263	NA	NA	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
26.	16	F	440	367	43	144	-	
27.	17	F	380	303	61	81	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
28.	4	M	265	198	47	100	-	
29.	9	F	233	143	56	178	-	
30.	9	F	402	316	68	84	NM_000527.4:c.530C>T	LDLR
31.	5	F	345	273	55	86	NM_000527.4:c.190+1G>A	LDLR
32.	14	M	320	263	54	92	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
33.	13	M	331	245	74	62	NM_000237.2:c.953A>G	LPL
34.	10	F	350	310	42	78	NM_000527.4:c.1916T>A	LDLR
35.	11	M	459	398	42	83	NM_000527.4:c.324_325delGTinsTC	LDLR
36.	3	M	314	252	44	80	NM_000527.4:c.2063delA	LDLR
37.	15	F	364	294	45	124	NM_000527.4:c.1061A>G	LDLR
38.	5	F	745	693	37	73	NM_000527.4:c.324_325delGTinsTC	LDLR
39.	10	F	331	247	73	54	NM_000527.4:c.1747C>T	LDLR
40.	9	F	288	216	57	74	-	
41.	13	F	387	316	53	86	NM_000527.4:c.798T>A	LDLR
42.	14	F	274	196	66	63	NM_000527.4:c.1433G>A	LDLR
43.	12	F	290	206	59	80	NM_000384.2:c.10580G>A	APOB
44.	17	M	280	262	49	97	-	
45.	9	M	265	144	73	95	NM_000527.4:c.1061A>G	LDLR
46.	2	F	228	170	48	52	NM_000527.4:c.1775G>A	LDLR
47.	6	F	248	177	68	103	NM_000384.2:c.10580G>A	APOB
48.	8	F	230	185	42	106	-	
49.	3	M	209	101	77	74	-	
50.	15	F	229	170	46	109	NM_022436.2:c.1336C>T	ABCG5
51.	10	M	219	177	16	72	-	
52.	10	M	242	170	46	135	-	
53.	6	F	235	154	NA	49	NM_000527.4:c.907C>T	LDLR

NA—not applicable.

Table 2 compares mean total cholesterol (TC), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride (TG) content, as well as the standard deviation, for whole study group with the values for two separate subgroups of children, with or without genetic findings.

Table 2. Mean concentration of each lipid fraction in the following groups of patients.

	TC [mg/dL] Mean \pm SD	LDL [mg/dL] Mean \pm SD	HDL [mg/dL] Mean \pm SD	TG [mg/dL] Mean \pm SD
Study group	296.4 \pm 85.2	224.0 \pm 89.2	52.4 \pm 12.7	104.4 \pm 70.4
Patients with genetic findings	329.1 \pm 92.8	257.4 \pm 98.1	51.6 \pm 9.8	90.6 \pm 30.4
Patients without genetic findings	245.1 \pm 31.6	175.8 \pm 31.4	53.5 \pm 15.9	126.2 \pm 102.5

Sequencing data analysis revealed possibly pathogenic variants in 33 out of 57 pediatric cases. Among the seventeen presumed pathogenic variants, listed in Table 3, twelve were missense, three frameshift and two splice site mutations. In addition, three variants of uncertain significance and one risk factor were also detected. The affected genes were *LDLR*, *APOB*, *ABCG5* and *LPL*. No potential pathogenic variants were found within the *ABCA1*, *ABCG8*, *APOA5*, *APOC2*, *APOE*, *CYP7A1*, *GPIHBP1*, *LCAT*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *LMF1*, *LMNA*, *PCSK9*, *PPARG*, *SCAP*, *SREBF2* of the *STAP1* genes in the pediatric group.

3.1. LDLR Gene

Fifteen of the detected pathogenic mutations were located within the *LDLR* gene (c.190+1G>A, c.284G>T, c.373_379delCAGTTCG, c.324_325delGTinsTC, c.530C>T, c.798T>A, c.907C>T, c.1061A>G, c.1433G>A, c.1775G>A, c.1747C>T, c.1846-2A>C, c.1916T>A, c.2063delA, c.2416dupG). The affected exons of *LDLR* were 3–6, 8, 10, 12–14, 17. The gene structure with the positions of the variants are presented in Figure 1.

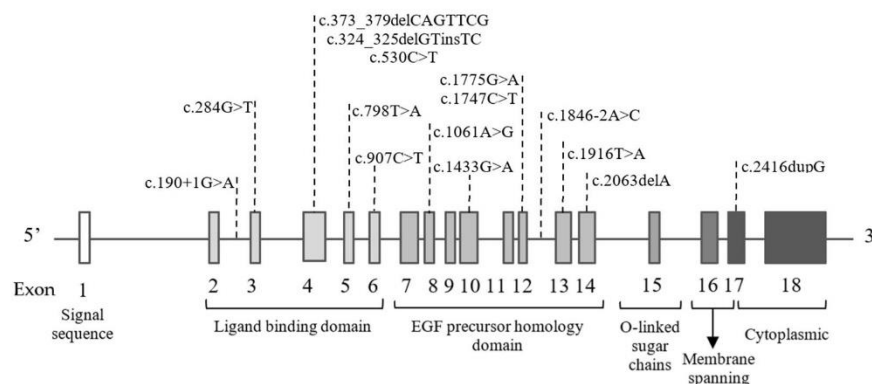


Figure 1. Schematic presentation of eighteen exons and six corresponding functional domains in the *LDLR* gene with the positions of the variants indicated.

Table 3. The variant table for selected aberrations identified by NGS sequencing, including the name of the affected gene with exon (indicated in underline)/intron localization, HGVSc and HGVSp description, genotype, variant type, in silico predictions, initial classification and number of the identified patients.

Gene	Exon /Intron	Hgvsc	Hgvsp	Genotype	Variant Type	In Silico Prediction			Classification	Nr. of Cases
						Polyphen	SIFT	Mutation Taster		
<i>LDLR</i>	<u>12</u>	NM_000527.4:c.1775G>A	NP_000518.1.p. Gly592Glu	het	missense	probably damaging (0.927)	deleterious (0.01)	disease causing	pathogenic	9
<i>LDLR</i>	<u>4</u>	NM_000527.4:c.373_379delCAGTTCG	NP_000518.1.p. Gln125SerfsTer79	het	deletion	NA	NA	disease causing	presumed pathogenic	2
<i>LDLR</i>	<u>2</u>	NM_000527.4:c.190+1G>A	NA	het	splice donor	NA	NA	NA	presumed pathogenic	2
<i>LDLR</i>	<u>4</u>	NM_000527.4:c.324_325delGInsTC	NP_000518.1.p. Cys109Arg	het	missense	NA	NA	NA	presumed pathogenic	2
<i>LDLR</i>	<u>8</u>	NM_000527.4:c.1061A>G	NP_000518.1.p. Asp354Gly	het	missense	probably damaging (1)	deleterious (0)	disease causing	presumed pathogenic	2
<i>LDLR</i>	<u>17</u>	NM_000527.4:c.2416dupG	NP_000518.1.p. Val806GlyfsTer11	het	duplication	NA	NA	NA	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>12</u>	NM_000527.4:c.1846-2A>C	NA	het	splice acceptor	NA	NA	NA	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>3</u>	NM_000527.4:c.284G>T	NP_000518.1.p. Cys95Phe	het	missense	probably damaging (0.999)	deleterious (0)	disease causing	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>4</u>	NM_000527.4:c.530C>T	NP_000518.1.p. Ser177Leu	het	missense	probably damaging (1)	deleterious (0.01)	disease causing	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>13</u>	NM_000527.4:c.1916T>A	NP_000518.1.p. Val639Asp	het	missense	benign (0.245)	deleterious (0)	disease causing	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>14</u>	NM_000527.4:c.2063delA	NP_000518.1.p. Asn688ThrfsTer21	het	deletion	NA	NA	NA	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>12</u>	NM_000527.4:c.1747C>T	NP_000518.1.p. His583Tyr	het	missense	probably damaging (1)	deleterious (0)	disease causing	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>5</u>	NM_000527.4:c.798T>A	NP_000518.1.p. Asp266Glu	het	missense	probably damaging (0.979)	deleterious (0)	disease causing	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>10</u>	NM_000527.4:c.1433G>A	NP_000518.1.p. Gly478Glu	het	missense	probably damaging (0.998)	deleterious (0)	disease causing	presumed pathogenic	1
<i>LDLR</i>	<u>6</u>	NM_000527.4:c.907C>T	NP_000581.1.p. Arg303Trp	het	missense	probably damaging (0.998)	Tolerated (0.37)	disease causing	presumed pathogenic	1

Table 3. Cont.

Gene	Exon /Intron	Hgvsc	Hgvsp	Genotype	Variant Type	In Silico Prediction			Classification	Nr. of Cases
						Polyphen	SIFT	Mutation Taster		
Sum of <i>LDLR</i> -positive patients						27				
<i>APOB</i>	26	NM_000384.2:c.10580G>A	NP_000375.2:p.Arg352>Gln	het	missense	probably damaging (0.93)	NA	disease causing	pathogenic	3
<i>APOB</i>	26	NM_000384.2:c.10708C>T	NP_000375.2:p.His3570>Tyr	het	missense	benign (0.003)	NA	polymorphism	uncertain significance	1
Sum of <i>APOB</i> -positive patients						4				
<i>ABCG5</i>	5	NM_022436.2:c.593G>A	NP_071881.1:p.Arg198>Gln	het	missense	probably damaging (1)	deleterious (0)	disease causing	uncertain significance	1
<i>ABCG5</i>	9	NM_022436.2:c.1285G>A	NP_071881.1:p.Ala429>Thr	het	missense	possibly damaging (0.558)	deleterious (0)	polymorphism	uncertain significance	1
Sum of <i>ABCG5</i> -positive patients						2				
<i>LPL</i>	2	NM_000237.2:c.106G>A	NP_000228.1:p.Asp36>Asn	het	missense	benign (0.066)	tolerated (0.16)	disease causing	risk factor	1
<i>LPL</i>	6	NM_000237.2:c.953A>G	NP_000228.1:p.Asn318>Ser	het	missense	benign (0.019)	tolerated (0.24)	disease causing	presumed pathogenic	1
Sum of <i>LPL</i> -positive patients						2				
Total sum of NGS-positive patients						35				

NA—not applicable.

The most common variant in the *LDLR* gene was the heterozygous c.1775G>A p.(Gly592Glu), detected in nine children. In addition, two splice site variants c.190+1G>A and c.1846-2A>C were detected: the former in two patients and the latter in one. The first case was a 12-year-old boy (patient 8) with a total cholesterol level of 318 mg/dL and LDL cholesterol level of 237 mg/dL. The boy was found to harbor the c.190+1G>A mutation. Sanger sequencing revealed the occurrence of the same mutation in the mother, who was symptomatic, but not in the father, who was normolipemic.

The second case was a five-year-old girl (patient 31) with severe hypercholesterolemia (TC 345 mg/dL and LDL-c 273 mg/dL) at the time of referral to genetic counselling. Her cholesterol level after the first year of life was approximately 500 mg/dL. The girl is being treated with monacolin K. Sanger sequencing confirmed the occurrence of the same mutation in the mother, who also suffered from hypercholesterolemia (TC 320 mg/dL and LDL-c 233 mg/dL). During Ezetimibum treatment, the TC level fell to 251 mg/dL and LDL-c to 167 mg/dL.

In a third case, the splice site variant c.1846-2A>C was identified in a nine-year-old girl (patient 5) with a TC of 312 mg/dL and an LDL-c of 248 mg/dL. Both mutations had previously been reported as disease-causing in a Polish study of familial hypercholesterolemia [17].

NGS analysis revealed the presence of a novel 7bp frameshift deletion c.373_379del CAGTTTCG in the exon 4 of the *LDLR* gene in two siblings. The lipid parameters of the elder, 10-year-old, brother (patient 7b) showed severe hypercholesterolemia with significantly elevated total cholesterol and LDL cholesterol levels, these being 426 mg/dL and 348 mg/dL, respectively. The younger, five-year-old, sister (patient 7a) also demonstrated elevated TC (278 mg/dL) and LDL cholesterol levels (170 mg/dL). The performed in silico analysis classified the c.373_379delCAGTTTCG variant as possibly pathogenic. The predicted consequences of 7bp deletion, with Gln125Ser at the first amino acid change, is the formation of a defective transcript and induction of a nonsense-mediated mRNA decay mechanism (NMD). Looking more closely at the deleted nucleotides and their flanking sequences, 3 bp directed repeats can be observed (Figure 2). The cause of the aberration may be the presence of specific deletion and repeat localizations, as described in the slipped mispairing hypothesis [18].

CATCTCICGG cagttcg TCTGTGACTC

Figure 2. 10 bp sequences bordering the deleted nucleotides (small letters). Underlining indicates the direct repeats.

In the siblings, Sanger sequencing confirmed the presence of the c.373_379delCAGTTTCG variant (Figure 3), which was found to be of paternal origin. The variant cosegregates with elevated TC and LDL in the proband's family (Table 4), which supports the evidence of variant pathogenicity. This is the first report of a c.373_379delCAGTTTCG mutation in the *LDLR* gene. The variant was submitted to ClinVar and was assigned with the accession number VCV001300030.1.

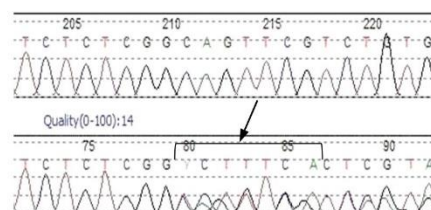


Figure 3. Sanger sequencing chromatogram confirms a heterozygous c.373_379delCAGTTTCG variant in the exon 4 of the *LDLR* gene.

Table 4. Lipid concentration values of described siblings and their parents.

Subject	Age	TC	LDL	HDL	TG	c.373_379delCAGTTTCG Presence
Child 1	10	426	348	56	82	+
Child 2	5	278	170	61	110	+
Mother	41	266	132	97	186	-
Father	43	384	317	51	83	+

The next interesting case was that of a 16-year-old girl (patient 6) who was found to be a carrier of a frameshift insertion c.2416dupG in the exon 17 of the *LDLR* gene and missense variant c.10708C>T in the exon 26 of the *APOB* gene. Firstly, the c.2416dupG mutation causes a shift in the reading frame at codon 806, changing valine into glycine, thus creating a premature stop codon at a new 11 position. This mutation has previously been described as likely pathogenic. The examination of the proband’s family confirmed the cosegregation of c.2416dupG with hypercholesterolemia, which may confirm variant pathogenicity (Figure 4).

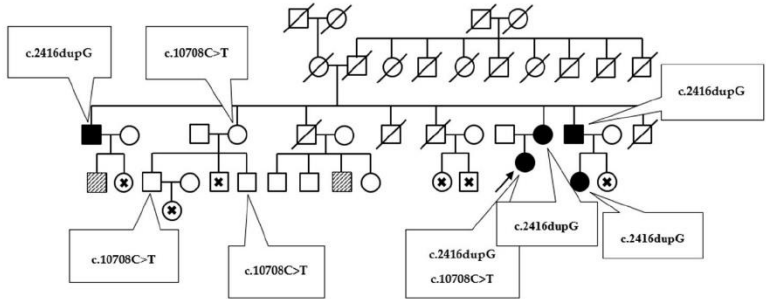


Figure 4. The diagram presents the inheritance of variants c.2416dupG and c.10708C>T in the proband’s family. Phenotypically affected members are marked by black. Patients with slightly elevated total cholesterol level are flagged by a diagonal slash. Examined patients with no clinical symptoms are marked with a cross.

The second detected SNV c.10708C>T in the *APOB* gene results in histidine to tyrosine amino acid substitution, as previously detected in hypercholesterolemic patients [19]. Prediction tools classified the detected aberration as likely pathogenic. Three members of the described family are c.10708C>T heterozygous carriers, yet their lipid levels are within normal ranges or only slightly elevated. The presence of both DNA variants was confirmed by direct Sanger sequencing (Figure 5).

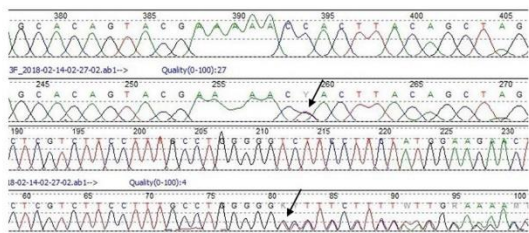


Figure 5. Sanger sequencing chromatograms showing heterozygous c.2416dupG variant in the exon 17 of the *LDLR* gene (upper chromatogram) and heterozygous c.10708C>T variant in the exon 26 of the *APOB* gene (lower chromatogram). The top lane picks refer to wild type sequence. The middle lane picks present described aberrations.

3.2. Other Affected Genes

Searching for possibly pathogenic variants within *APOB* revealed the presence of a c.10580G>A p.(Arg3527Gln) mutation occurring in three pediatric patients. Arg3527Gln is the most frequent alteration within *APOB* in the Caucasian population and is known to have a negative impact on LDL-cholesterol metabolism [20]. The highly conserved receptor binding site is known to be stabilized by the interaction of Arg3527 with Trp4396; as such, the replacement of arginine by a glutamine at position 3527 impairs receptor recognition. The belt conformation of ApoB100 that surrounds the LDL particle is maintained by the interaction of Arg3527 with Trp439615, which stabilizes two clusters of basic amino acids, ensuring the binding of ApoB100 to LDLR [21].

Within the *LPL* gene, two variants were identified: c.106G>A p.(Asp36Asn) and c.953A>G p.(Asn318Ser) (Figure 6). The gene structure with the variant positions are presented in Figure 6.

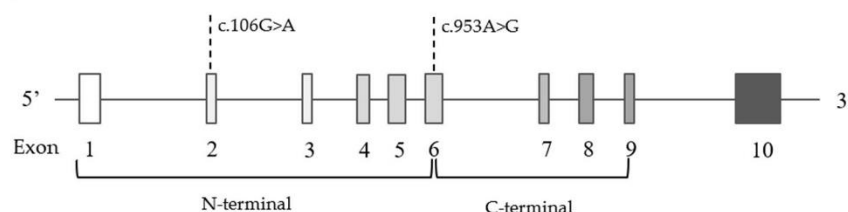


Figure 6. Schematic presentation of ten exons and corresponding two functional domains in the *LPL* gene with indicated variant positions.

Despite the discrepancies in the results of predictive programs, it has been proven that the replacement of Asp36Asn results in decreased lipoprotein lipase activity in about 20% of cases [22]. Asp36Asn carriers typically demonstrate hypertriglyceridemia, low HDL level and increased risk of cardiovascular disease [23]. However, contrary to predictions, one 10-year-old boy in the study (patient 14) carrying the c.106G>A mutation, did not present a high triglyceride level (138 mg/dL) but did demonstrate hypercholesterolemia with a TC concentration of 279 mg/dL and an LDL-cholesterol of 158 mg/dL. Sanger sequencing of the mutated sequence in the proband's parents revealed the presence of c.106G>A in the father (Figure 7). Testing the lipid profile in the father revealed high triglyceride level (314 mg/dL) and total cholesterol level (251 mg/dL), which seems to confirm the expected deleterious effect of Asp36Asn.

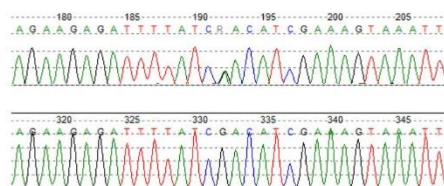


Figure 7. Sanger sequencing chromatogram shows heterozygous c.106G>A variant in the exon 2 of the *LPL* gene.

The second common variant in the *LPL* gene, c.953A>G p.(Asn318Ser), was detected in a double heterozygous form, together with the missense c.1775G>A p.(Gly592Glu) variant in the *LDLR* gene. This was observed in a 14-year-old boy in the study (patient 32), whose lipid parameters were 320 mg/dL TC and 263 mg/dL LDL-C. The patient received treatment with 5 mg Rosuvastatin, which was found to reduce total cholesterol level to 195 mg/dL and LDL-c level to 135 mg/dL. Variant c.953A>G in the *LPL* gene is frequently reported in patients with familial combined hyperlipidemia and is therefore identified as pathogenic [24].

The data analysis also revealed two possibly pathogenic mutations, c.593G>A and c.1285G>A, within the *ABCG5* gene in two unrelated individuals (patients 3 and 10). However, as no other *ABCG5* or *ABCG8* mutations were identified, the presence of sitosterolemia (autosomal recessive inheritance) was rejected.

4. Discussion

The aim of the study was to identify potentially pathogenic FH-related variants in known and candidate genes in pediatric patients, using next generation sequencing (NGS). A group of 57 patients fulfilling the research inclusion criteria was recruited, with a mean age of 10 years. The National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia recommends that the lipid profile should be tested in all children from 9 to 11 years old [25]. However, the only country to fully implement universal screening for early hypercholesterolemia is Slovenia, where testing is carried out in children at the age of five to six years [4]. Their screening algorithm requires direct referral to genetic testing when total cholesterol level is 5–6 mmol/L (193–232 mg/dL) with positive family history, or TC more than 6 mmol/L (232 mg/dL). The Slovenian screening strategy results disease-causing mutations being identified in approximately 45% of tested children [26].

Similar findings were obtained in the present study, with more than half of the examined patients obtaining a positive molecular result. In accordance with Simon Broome threshold lipid values (TC > 260 mg/dL or LDL-cholesterol > 155 mg/dL), 48 recruited patients fulfilled lipid inclusion criteria; of these, 33 obtained a positive genetic result. In the other cases, hypercholesterolemia could be due to the presence of a deep intronic mutation, copy number variation, an aberration in other genes not included in the panel or perhaps the cause may be polygenic. Nevertheless, it seems that the presence of a specific FH phenotype is a more discriminating factor in pediatric patients than in adult patients; another study conducted on a group of adult patients with suspected FH failed to yield such positive genetic findings. In children, the improved recognition of FH could be associated with the lower impact of environmental factors, diet, hormones or comorbidities.

Our approach was based on next generation sequencing (NGS) with the use of a custom designed, 21-gene panel containing well-known FH-related genes (*LDLR*, *APOB* and *PCSK9*) and candidates correlated with lipid disorders, such as *STAP1*, *SCAP*, *LIPA* or *APOC2*. The NGS approach enabled the wide-range analysis of all exons and exon–intron boundaries of the selected genes. The bioinformatic estimation of the obtained results revealed fifteen presumed pathogenic variants in the *LDLR* gene, one in the *APOB* gene and one in the *LPL* gene. The low number of affected genes was probably a consequence of the small study group, particularly since FH is known to demonstrate significant genetic heterogeneity. The predominance of changes within the *LDLR* gene is in line with other FH studies in the Polish population, where pathogenic *LDLR* mutations were reported in 81.4% or 87.1% of all found mutations [14,17].

The most frequent aberration was the missense c.1775G>A (p.Gly592Glu) variant located in the exon 12 of the *LDLR* gene, which was detected in nine pediatric patients. Chmara et al. report that 15% of diagnosed FH cases had the c.1775G>A mutation [20]. It is also one of the most common variants identified in Slovakia and the Czech Republic, with the respective prevalence values of 10.5% and 19.3% [27].

The described aberration is located within a 400-amino acid sequence, formed from three cysteine-rich repeats, in the EGF precursor homology domain [28]. The localization of a highly-conserved glycine residue, within the fifth repeat of “YWTD”, determines its pathogenicity [29]. A Polish FH study found that c.1775G>A, as a LOF mutation, reduces LDL receptor activity to 55–15% of wild type values [20]. A corresponding study from southern Italy identified 89% of LDLR activity in an Italian patient carrying a heterozygous mutation [30]. Other data indicates that the presence of the c.1775G>A mutation results in only 5–15% of LDLR activity [31].

Some discrepancies exist in variant classification. Each *LDLR* mutation can be assigned to one of five functional groups based on the characteristics of the mutant protein [18].

Most studies classified c.1775G>A as Group 5, i.e., a defective recycling of the LDLR protein [29,32,33]. On the other hand, some authors propose Group 2b, i.e., partially disturbed LDLR protein transport from endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus or the plasma membrane [20,34,35]. Aside from differences in determining residual LDLR activity level or the dysregulation mechanism of the LDLR pathway, c.1775G>A p.(Gly592Glu) was declared to be pathogenic.

Our findings also include the novel identification of a c.373_379delCAGTTCG (p.Gln125SerfsTer79) frameshift deletion in the exon 4 of the *LDLR* gene. In silico analysis performed by prediction bioinformatics tools indicated the c.373_379delCAGTTCG variant to be pathogenic, potentially shifting the reading frame and therefore generating a premature termination codon at a new 79 position. However, this aberration is not included in any human genome variant databases (HGMD, ClinVar or LOVD) nor any population databases (ExAC, gnomAD or 1000 Genomes Project). Family data appear to confirm variant cosegregation, with significantly elevated LDL cholesterol levels.

There are many hypothesis addressing the mutagenesis of mechanisms leading to microdeletions (<20 bp), one of them being the model of slipped mispairing during the DNA replication process [36]. This mechanism is based on the assumption that 2–8 bp repeats are found in close proximity on complementary DNA strands [37]. Illegitimate pairing between different located repeats during replication leads to single-strand loop formation, which are then removed by DNA repair enzymes. Consequently, the final replication products comprise one deleted and one wild-type DNA duplex [36]. A closer look at the detected c.373_379delCAGTTCG and its contiguous sequence confirmed the presence of those 3 bp repeats. Furthermore, one of the repeated sequence has been removed, suggesting that the slipped mispairing hypothesis is more likely than homologous recombination between palindromic or symmetric repeated sequences [18].

Krawczak et al. report that in 93% of 60 examples of causal human gene deletion of 20 bp or less, the deleted sequence includes or overlaps a direct repeat and that 3 bp repeats were the most frequent [36]. Other studies suggest that 48% of deletional events occur as a consequence of the presence of a repeated flanking motif, caused by a slipped mispairing mechanism. The same authors note that mean LDL receptor activity is reduced to 19.8% among heterozygous carriers of a protein-changing mutation (nonsense, frameshift and splice site mutation) [18].

Similar intragenic *LDLR* deletion has been identified in a Japanese investigation. The study reports that one 7 bp deletion of nucleotides 578–584 in exon 4 was detected among 13 families demonstrating FH. In this case, a 63-year-old patient, the carrier of the aberration, presented corneal arcus, tuberous and Achilles tendon xanthomas on both legs and ischemic heart disease. His total cholesterol concentration was 336 mg/dL, with an LDL cholesterol level of 285 mg/dL. HDL cholesterol and triglyceride levels were within normal ranges. Even though the functional array analysis did not confirm reduced LDL receptor binding activity, the authors propose the existence of other dysfunctional mechanisms, and indicate the aberration as disease-causing. They also assigned the variant to Group 1 mutation (null alleles) [38]. As Group 1 mutations disrupt *LDLR* synthesis, they generate the most severe phenotypes of the five classes. This group includes mainly nonsense (66.3%) and frameshift mutations (30.4%) [18].

To summarize, the exact pathogenicity mechanisms responsible for the deletion of few bp within the coding region of *LDLR* gene remain generally unclear in most cases. Nevertheless, all authors agree that this type of aberration results in serious disturbances in cholesterol metabolism. Based on family examination, the available literature data and estimation by predictive programs, the detected novel c.373_379delCAGTTCG variant was considered to be pathogenic.

Our findings also reveal the presence of a double-heterozygous carrier, with the frameshift mutation c.2416dupG in the exon 17 of the *LDLR* gene and the missense variant c.10708C>T in the exon 26 of the *APOB* gene. Exon 17 of the *LDLR* gene encodes membrane-anchoring and cytoplasmic tail domains, which are essential for ensuring the cell membrane

attachment of the receptor and correct protein endocytosis [18,39]. The c.2416dupG variant may result in nonsense-mediated mRNA decay (NMD), which is a translation-coupled mechanism that eliminates mRNAs containing premature translation-termination codons or protein truncation. In each case, the function is severely disturbed. Previous studies have reported this aberration in FH patients in the US, southern Sweden, the Czech Republic, the Netherlands and Japan [39]. Our identified family histories (Figure 4) indicate that the c.2416dupG variant cosegregates with a prominent FH-phenotype, which supports its pathogenicity. The second c.10708C>T, p.(His3570Tyr) variant in the *APOB* gene has previously been described as a potentially FH-related mutation, even though its pathogenicity is still unproven [19,40,41]. Recent studies suggest that the p.His3570Tyr variant has a minor effect on LDL-C levels and would be better classified as a polymorphism in the *APOB* gene. Other authors propose that the rare c.10708C>T variant alone is not pathogenic but that its co-occurrence with *LDLR* mutation can lead to a more severe phenotype in terms of atherosclerotic vascular disease [42]. Our data demonstrate that there is no evidence that *APOB* c.10708C>T has a causative effect; the variant also occurs in unaffected adult family members.

The second double-heterozygous patient was a 14-year-old boy carrying the common c.953A>G variant in *LPL* gene and the c.1775G>A variant in the *LDLR* gene. His lipid profile showed isolated hypercholesterolemia, which clearly demonstrates the pathogenic effect of the *LDLR* variant. However, the negative influence of the second variant within the *LPL* gene is not so apparent. Population-based studies indicate that the frequency of the heterozygous c.953A>G (p.Asn318Ser) variant ranges from 1% to 7% among control individuals, and that heterozygous carriers demonstrated a 31% mean increase in plasma triglyceride level [43]. The impact of c.953A>G in our case is questionable due to a lack of any visible effect in the patient lipidogram. Perhaps functional testing would be conclusive in this case.

The next-generation sequencing proved to be an appropriate tool for identifying changes in FH pediatric patients. Of course, while the choice of NGS over WES may be considered as a main study limitation, the substantially lower cost of NGS, with WES being three times as expensive, makes the NGS technology more achievable for Polish research institutions. Reducing the scope of sequencing to exons of selected genes narrows the diagnostic possibilities, but the resulting reduction in costs allows more patients to be tested. Moreover, panel sequencing platforms are a more preferred choice in Poland, due to reduced equipment and service costs and the greater availability of service facilities and specialists.

5. Conclusions

Our findings provide a greater insight into the genetic complexity of primary dyslipidemias. Despite the relatively limited size of the study group, a wide variety of changes were noted within the *LDLR* gene. This best illustrates the pressing need for the development of new diagnostic approaches in the field of genetic testing. More powerful tools, such as next generation sequencing, increase the chance of accurate diagnosis and thus the implementation of early preventive treatment.

Author Contributions: Conceptualization, A.G. and L.R.; methodology, A.G., L.R., K.S. and I.P.; software, D.S.; validation, L.R., K.S., D.S. and I.P.; formal analysis, L.R. and D.S.; investigation, A.G. and L.R.; resources, P.M., L.K., M.P., E.S., A.L. and A.G.; data curation, L.R. and D.S.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, A.G. and L.R.; visualization, L.R. and D.S.; supervision, A.G.; project administration, A.G. and L.R.; funding acquisition, A.G. and L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, grant number 2016/X/9-SZB.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Polish Mother’s Memorial Hospital—Research Institute (opinion number 15/2016, date of approval 12 January 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patients in order to publish this paper.

Data Availability Statement: The data of novel variant described in the manuscript were submitted to the ClinVar database with the accession number VCV001300030.1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ABCA1: ATP-binding cassette transporter, subfamily ABCA, member 1 gene; *ABCG5*: ATP-binding cassette transporter, subfamily G, member 5 gene; *ABCG8*: ATP-binding cassette transporter, subfamily G, member 8 gene; *APOA5*: Apolipoprotein A-V gene; *APOB*: Apolipoprotein B gene; *APOC2*: Apolipoprotein C2 gene; *APOE*: Apolipoprotein gene; *ASCVD*: Atherosclerotic cardiovascular disease; *cIMT*: carotid intima-media thickness; *CVD*: Cardiovascular disease; *CYP7A1*: Cholesterol 7 α -hydroxylase gene; *FH*: familial hypercholesterolemia; *GPIHBP1*: Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1 gene; *HDL*: High-density lipoprotein; *LCAT*: Lecithin-cholesterol acyltransferase gene; *LDL*: Low-density lipoprotein; *LDLR*: Low-density lipoprotein (LDL) Receptor gene; *LDLR*: Low-density lipoprotein receptor; *LDLRAP1*: Low-density lipoprotein receptor adapter protein 1 gene; *LIPA*: Lysosomal acid lipase gene; *LMF1*: Lipase maturation factor 1 gene; *LMNA*: Lamin A/C gene; *LOVD*: Leiden open variation database; *LPL*: Lipoprotein Lipase gene; *NGS*: Next generation sequencing; *PCR*: Polymerase chain reaction; *PCSK9*: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene; *PolyPhen2*: Polymorphism phenotyping version 2; *PPARG*: Peroxisome proliferator activated receptor γ gene; *SCAP*: Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein gene; *SIFT*: Sorting intolerant from tolerant; *SNV*: Single-nucleotide variant; *SREBF2*: Sterol regulatory element binding transcription factor 2 gene; *STAP1*: Signal transducing adaptor family member 1 gene; *TC*: Total cholesterol; *TG*: Triglycerides.

References

1. Ruan, Y.; Guo, Y.; Zheng, Y.; Huang, Z.; Sun, S.; Kowal, P.; Shi, Y.; Wu, F. Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: Results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health* **2018**, *18*, 778. [\[CrossRef\]](#)
2. Stewart, J.; McCallin, T.; Martinez, J.; Chacko, S.; Yusuf, S. Hyperlipidemia. *Pediatr. Rev.* **2020**, *41*, 393–402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Tada, H.; Takamura, M.; Kawashiri, M.-A. Familial hypercholesterolemia: A narrative review on diagnosis and management strategies for children and adolescents. *Vasc. Health Risk Manag.* **2021**, *17*, 59–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Wiegman, A.; Gidding, S.S.; Watts, G.F.; Chapman, M.J.; Ginsberg, H.N.; Cuchel, M.; Ose, L.; Averna, M.; Boileau, C.; Borén, J.; et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: Gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 2425–2437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Reijman, M.D.; Kusters, D.M.; Wiegman, A. Advances in familial hypercholesterolaemia in children. *Lancet Child Adolesc. Health* **2021**, *5*, 652–661. [\[CrossRef\]](#)
6. Sharifi, M.; Futema, M.; Nair, D.; Humphries, S.E. Genetic Architecture of Familial Hypercholesterolaemia. *Curr. Cardiol. Rep.* **2017**, *19*, 44. [\[CrossRef\]](#)
7. Xia, X.-D.; Peng, Z.-S.; Gu, H.-M.; Wang, M.; Wang, G.-Q.; Zhang, D.-W. Regulation of PCSK9 Expression and Function: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 1325. [\[CrossRef\]](#)
8. Defesche, J.C. Low-Density Lipoprotein Receptor-Its Structure, Function, and Mutations. *Semin. Vasc. Med.* **2004**, *4*, 5–11. [\[CrossRef\]](#)
9. Lagace, T.A. PCSK9 and LDLR degradation: Regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, *25*, 387–393. [\[CrossRef\]](#)
10. Danyel, M.; Ott, C.-E.; Grenkowitz, T.; Salewsky, B.; Hicks, A.A.; Fuchsberger, C.; Steinhagen-Thiessen, E.; Bobbert, T.; Kassner, U.; DeMuth, I. Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11995. [\[CrossRef\]](#)
11. Hegele, R.A.; Knowles, J.W.; Horton, J.D. Delisting STAP1: The rise and fall of a putative hypercholesterolemia gene. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 847–849. [\[CrossRef\]](#)

12. Shaik, N.A.; Al-Qahtani, F.; Nasser, K.; Jamil, K.; Alrayes, N.; Elango, R.; Awan, Z.; Banaganapalli, B. Molecular insights into the coding region mutations of low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1 (LDLRAP1) linked to familial hypercholesterolemia. *J. Gene Med.* **2020**, *22*, e3176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Beigneux, A.P.; Miyashita, K.; Ploug, M.; Blom, D.J.; Ai, M.; Linton, M.F.; Khovidhunkit, W.; Dufour, R.; Garg, A.; McMahon, M.A.; et al. Autoantibodies against GPIHBP1 as a Cause of Hypertriglyceridemia. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1647–1658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sharifi, M.; Walus-Miarka, M.; Idzior-Waluś, B.; Malecki, M.T.; Sanak, M.; Whittall, R.; Li, K.W.; Futema, M.; Humphries, S.E. The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in south-eastern Poland. *Metabolism* **2015**, *65*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cohen, H.; Stefanutti, C. Current Approach to the Diagnosis and Treatment of Heterozygote and Homozygous FH Children and Adolescents. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2021**, *23*, 30. [[CrossRef](#)]
16. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–423. [[CrossRef](#)]
17. Chmara, M.; Wasag, B.; Żuk, M.; Kubalska, J.; Węgrzyn, A.; Bednarska-Makaruk, M.; Pronicka, E.; Wehr, H.; Defesche, J.C.; Rynkiewicz, A.; et al. Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: Novel and recurrent LDLR mutations. *J. Appl. Genet.* **2010**, *51*, 95–106. [[CrossRef](#)]
18. Varret, M.; Rabès, J.-P. Missense Mutation in the LDLR Gene: A Wide Spectrum in the Severity of Familial Hypercholesterolemia. In *Mutations in Human Genetic Disease*; IntechOpen: London, UK, 2012. [[CrossRef](#)]
19. Garg, A. *Dyslipidemias: Pathophysiology, Evaluation and Management*; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2015.
20. Chmara, M. Mutacje Genów LDLR i APOB w Hipercholesterolemii Rodzinnej. Ph.D. Thesis, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland, 2005.
21. Fernández-Higuero, J.A.; Etxebarria, A.; Benito-Vicente, A.; Alves, A.C.; Arrondo, J.L.R.; Ostolaza, H.; Bourbon, M.; Martin, C. Structural analysis of APOB variants, p.(Arg3527Gln), p.(Arg1164Thr) and p.(Gln4494del), causing Familial Hypercholesterolaemia provides novel insights into variant pathogenicity. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18184. [[CrossRef](#)]
22. Wright, W.T.; Young, I.S.; Nicholls, D.P.; Graham, C.A. Genetic screening of the LPL gene in hypertriglyceridaemic patients. *Atherosclerosis* **2008**, *199*, 187–192. [[CrossRef](#)]
23. Merkel, M.; Eckel, R.H.; Goldberg, I.J. Lipoprotein lipase: Genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 1997–2006. [[CrossRef](#)]
24. Surendran, R.P.; Visser, M.E.; Heemelaar, S.; Wang, J.; Peter, J.; Defesche, J.C.; Kuivenhoven, J.A.; Hosseini, M.; Péterfy, M.; Kastelein, J.J.P.; et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J. Intern. Med.* **2012**, *272*, 185–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Daniels, S.R.; Gidding, S.; de Ferranti, S.D. Pediatric aspects of Familial Hypercholesterolemias: Recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* **2011**, *5*, S30–S37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Groselj, U.; Kovac, J.; Sustar, U.; Mlinaric, M.; Fras, Z.; Podkrajsek, K.T.; Battelino, T. Universal screening for familial hypercholesterolemia in children: The Slovenian model and literature review. *Atherosclerosis* **2018**, *277*, 383–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Gabcova-Balaziová, D.; Stanikova, D.; Vohnout, B.; Huckova, M.; Stanik, J.; Klimes, I.; Raslova, K.; Gasperikova, D. Molecular-genetic aspects of familial hypercholesterolemia. *Endocr. Regul.* **2015**, *49*, 164–181. [[CrossRef](#)]
28. Südhof, T.C.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S.; Russell, D.W. The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **1985**, *228*, 815–822. [[CrossRef](#)]
29. Wong, K.H.; Levy-Sakin, M.; Ma, W.; Gonzaludo, N.; Mak, A.C.; Vaka, D.; Poon, A.; Chu, C.; Lao, R.; Balamir, M.; et al. Three patients with homozygous familial hypercholesterolemia: Genomic sequencing and kindred analysis. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2019**, *7*, e1007. [[CrossRef](#)]
30. Romano, M.; Di Taranto, M.D.; D’Agostino, M.N.; Marotta, G.; Gentile, M.; Abate, G.; Mirabelli, P.; Di Noto, R.; Del Vecchio, L.; Rubba, P.; et al. Identification and functional characterization of LDLR mutations in familial hypercholesterolemia patients from Southern Italy. *Atherosclerosis* **2010**, *210*, 493–496. [[CrossRef](#)]
31. Hobbs, H.H.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **1992**, *1*, 445–466. [[CrossRef](#)]
32. Kubalska, J.; Chmara, M.; Limon, J.; Wierzbicka-Rucinska, A.; Prokurat, S.; Szaplyko, J.; Kowalik, A.; Mierzevska, H.; Defesche, J.C.; Pronicka, E. Clinical course of homozygous familial hypercholesterolemia during childhood: Report on 4 unrelated patients with homozygous or compound heterozygous mutations in the LDLR gene. *J. Appl. Genet.* **2008**, *49*, 109–113. [[CrossRef](#)]
33. Miltiadows, G.; Elisaf, M.; Bairaktari, H.; Xenophontos, S.L.; Manoli, P.; Cariolou, M.A. Characterization and geographic distribution of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in northwestern Greece. *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 432–433. [[CrossRef](#)]
34. Susan-Resiga, D.; Girard, E.; Kiss, R.S.; Essalmani, R.; Hamelin, J.; Asselin, M.-C.; Awan, Z.; Butkinaree, C.; Fleury, A.; Soldera, A.; et al. The proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-resistant R410S low density lipoprotein receptor mutation: A novel mechanism causing familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 1573–1590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Benito-Vicente, A.; Uribe, K.B.; Jebari, S.; Galicia-Garcia, U.; Ostolaza, H.; Martin, C. Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Krawczak, M.; Cooper, D.N. Gene deletions causing human genetic disease: Mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Qual. Life Res.* **1991**, *86*, 425–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ball, E.V.; Stenson, P.D.; Abeyasinghe, S.S.; Krawczak, M.; Cooper, D.N.; Chuzhanova, N.A. Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: Common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum. Mutat.* **2005**, *26*, 205–213. [[CrossRef](#)]
38. Hattori, H.; Hirayama, T.; Nobe, Y.; Nagano, M.; Kujiraoka, T.; Egashira, T.; Ishii, J.; Tsuji, M.; Emi, M. Eight novel mutations and functional impairments of the LDL receptor in familial hypercholesterolemia in the north of Japan. *J. Hum. Genet.* **2002**, *47*, 80–87. [[CrossRef](#)]
39. Fairwozy, R.H. Genetic Functional Studies of Low Density Lipoprotein-Cholesterol (LDL-C) Associated Variants and the Genetic Spectrum of Familial Hypercholesterolemia in Different Ethnic Groups. 2018. Available online: <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?did=1&uin=uk.bl.ethos.747249> (accessed on 9 May 2022).
40. Müllertz, K.M.; Christiansen, M.K.; Broendberg, A.K.; Pedersen, L.N.; Jensen, H.K. Outcome of clinical management in relatives of sudden cardiac death victims. *Int. J. Cardiol.* **2018**, *262*, 45–50. [[CrossRef](#)]
41. Bamimore, M.A.; Zaid, A.; Banerjee, Y.; Al-Sarraf, A.; Abifadel, M.; Seidah, N.G.; Al-Waili, K.; Al-Rasadi, K.; Awan, Z. Familial hypercholesterolemia mutations in the Middle Eastern and North African region: A need for a national registry. *J. Clin. Lipidol.* **2015**, *9*, 187–194. [[CrossRef](#)]
42. Juhász, L.; Balogh, I.; Madar, L.; Kovács, B.; Harangi, M. A Rare Double Heterozygous Mutation in Low-Density Lipoprotein Receptor and Apolipoprotein B-100 Genes in a Severely Affected Familial Hypercholesterolaemia Patient. *Cureus* **2020**, *12*, e12184. [[CrossRef](#)]
43. Wittrup, H.H.; Tybjaerg-Hansen, A.; Nordestgaard, B.G. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease: A meta-analysis. *Circulation* **1999**, *99*, 2901–2907. [[CrossRef](#)]

Article

Identification of New Copy Number Variation and the Evaluation of a CNV Detection Tool for NGS Panel Data in Polish Familial Hypercholesterolemia Patients

Lena Rutkowska ¹, Iwona Pinkier ¹, Kinga Sałacińska ¹, Łukasz Kępczyński ¹, Dominik Salachna ¹, Joanna Lewek ^{2,3}, Maciej Banach ^{2,3,4}, Paweł Matusik ⁵, Ewa Starostecka ⁶, Andrzej Lewiński ^{6,7}, Rafał Płoski ⁸, Piotr Stawiński ⁸ and Agnieszka Gach ^{1,*}

- ¹ Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, 93-338 Lodz, Poland
 - ² Department of Preventive Cardiology and Lipidology, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland
 - ³ Department of Cardiology and Congenital Diseases of Adults, Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, 93-338 Lodz, Poland
 - ⁴ Cardiovascular Research Centre, University of Zielona Gora, 65-417 Zielona Gora, Poland
 - ⁵ Department of Pediatrics, Pediatric Obesity and Metabolic Bone Diseases, Faculty of Medical Sciences in Katowice, Medical University of Silesia, 40-055 Katowice, Poland
 - ⁶ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, 93-338 Lodz, Poland
 - ⁷ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland
 - ⁸ Department of Medical Genetics, Medical University of Warsaw, 02-106 Warsaw, Poland
- * Correspondence: agagach@o2.pl



Citation: Rutkowska, L.; Pinkier, I.; Sałacińska, K.; Kępczyński, L.; Salachna, D.; Lewek, J.; Banach, M.; Matusik, P.; Starostecka, E.; Lewiński, A.; et al. Identification of New Copy Number Variation and the Evaluation of a CNV Detection Tool for NGS Panel Data in Polish Familial Hypercholesterolemia Patients. *Genes* **2022**, *13*, 1424. <https://doi.org/10.3390/genes13081424>

Academic Editor: Katarina Trebušak Podkrajšek

Received: 18 July 2022

Accepted: 8 August 2022

Published: 10 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited, autosomal dominant metabolic disorder mostly associated with disease-causing variant in *LDLR*, *APOB* or *PCSK9*. Although the dominant changes are small-scale missense, frameshift and splicing variants, approximately 10% of molecularly defined FH cases are due to copy number variations (CNVs). The first-line strategy is to identify possible pathogenic SNVs (single nucleotide variants) using multiple PCR, Sanger sequencing, or with more comprehensive approaches, such as NGS (next-generation sequencing), WES (whole-exome sequencing) or WGS (whole-genome sequencing). The gold standard for CNV detection in genetic diagnostics are MLPA (multiplex ligation-dependent amplification) or aCGH (array-based comparative genome hybridization). However, faster and simpler analyses are needed. Therefore, it has been proposed that NGS data can be searched to analyze CNV variants. The aim of the study was to identify novel CNV changes in FH patients without detected pathogenic SNVs using targeted sequencing and evaluation of CNV calling tool (DECoN) working on gene panel NGS data; the study also assesses its suitability as a screening step in genetic diagnostics. A group of 136 adult and child patients were recruited for the present study. The inclusion criteria comprised at least “possible FH” according to the Simon Broome diagnostic criteria in children and the DLCN (Dutch Lipid Clinical Network) criteria in adults. NGS analysis revealed potentially pathogenic SNVs in 57 patients. Thirty selected patients without a positive finding from NGS were subjected to MLPA analysis; ten of these revealed possibly pathogenic CNVs. Nine patients were found to harbor exons 4–8 duplication, two harbored exons 6–8 deletion and one demonstrated exon 9–10 deletion in *LDLR*. To test the DECoN program, the whole study group was referred for bioinformatic analysis. The DECoN program detected duplication of exons 4–8 in the *LDLR* gene in two patients, whose genetic analysis was stopped after the NGS step. The integration of the two methods proved to be particularly valuable in a five-year-old girl presenting with extreme hypercholesterolemia, with both a pathogenic missense variant (c.1747C>T) and exons 9–10 deletion in *LDLR*. This is the first report of a heterozygous deletion of exons 9 and 10 co-occurring with SNV. Our results suggest that the NGS-based approach has the potential to identify large-scale variation in the *LDLR* gene and could be further applied to extend CNV screening in other FH-related genes. Nevertheless, the outcomes from the bioinformatic approach still need to be confirmed by MLPA; hence, the latter remains the reference method for assessing CNV in FH patients.

Keywords: inherited disorder; familial hypercholesterolemia; copy number variation (CNV); *LDLR* gene; genetic basis; bioinformatic tool; DECoN; phenotype-genotype correlation; panel next generation sequencing (NGS); multiplex ligation-dependent amplification (MLPA)

1. Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is an inherited, autosomal dominant metabolic disorder mostly caused by disease-causing variant in *LDLR* (low-density lipoprotein receptor gene), *APOB* (apolipoprotein B gene) or *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene). The respective prevalence of heterozygous FH (HeFH) and homozygous FH (HoFH) was initially thought to be 1:500 and 1:1,000,000, but these figures have been revised following the rapid development of genetics and increased awareness of the disease. Nowadays, it has been estimated that HeFH affects 1:313 individuals worldwide, and HoFH is still being ultrarare condition with prevalence of 1:160–400,000 [1,2]. The clinical hallmarks of FH are high total and LDL cholesterol levels; these are directly associated with increased cardiovascular risk, with the main clinical manifestation being ischemic heart disease (IHD). Early detection and initiation of lipid-lowering treatment is crucial for ASCVD (Atherosclerotic Cardiovascular Disease) prevention, with an objective of LDL cholesterol <55 (1.42 mmol/L) or 70 mg/dL (1.81 mmol/L) depending on the risk and a decrease of at least 50% [3,4].

The most widely adopted diagnostic algorithms are Dutch Lipid Clinical Network Criteria (DLCN), Simon Broome (SB) and Making Early Diagnosis Prevents Early Death (MEDPED). However, regardless of the criteria, genetic testing is unequivocal, and forms a central part of any diagnosis [5].

The FH phenotype is caused by loss of function variants in the *LDLR* gene in 60–80% patients, followed by those in *APOB* (5–10%) or by gain-of-function variants in *PCSK9* (<1%) [6]. Rarely, the patient harbors an ultra-rare variant in the *APOE* gene or one of a wide group of candidate genes (*LDLRAP1*, *LIPA*, *SCAP*, *GPIHBP1* or *STAP1*). The dominant changes are small-in-scale missense, frameshift and splicing variants but approximately 10% of molecular defined FH are due to copy number variations (CNVs). CNVs are genomic structural variants that include deletions and duplications larger than 50 bp in size [7]. CNV regions are found ubiquitously throughout the human genome, and encompass about 4.8–9.7% of its total sequence [8]. Depending on the size and genomic localization, CNVs can have a range of functional consequences ranging from neutral to adaptive to maladaptive traits [9]. In the last decade, maladaptive CNVs have been found to play a role in many human diseases such as autism, schizophrenia or Crohn's disease. Their possible role in dyslipidemias is still being investigated; research to date has focused primarily on causal changes for FH, but this may broaden as techniques evolve. A 2018 review found about 56 unique deletions and 27 unique duplications had been detected in the *LDLR* gene [9]. Such a high number is probably related to the fact that there are 98 *Alu* repeats within the gene [10]; it was also found that *Alu* repeats represent 65% of *LDLR* intronic sequences, and 85% of genomic sequence outside exon–intron junctions [11]. *LDLR* is hence especially susceptible to CNV rearrangements with breakpoints mostly located within the introns, leading to whole-exon events [10].

The development of new, cost-effective, rapid and efficient molecular techniques is now extremely important. The first-line strategy is to identify possibly pathogenic SNVs (single nucleotide variants) using multiple PCR, Sanger sequencing or more comprehensive approaches, such as panel next-generation sequencing (NGS), whole-exome sequencing (WES) or whole-genome sequencing (WGS). Conventional Sanger sequencing significantly limits the scope of the study, while techniques such as WES or WGS provide enormous amounts of data which are often challenging to interpret. Hence, the optimal technique within the reach of most research laboratories is targeted NGS. NGS technology allows the detection of single-nucleotide variants and small deletion/insertion variants for Mendelian

conditions. However, when diagnosing FH, it should be noted that large CNV variants make up about 10% of the genetic background, and their detection is a necessary step in a comprehensive genetic diagnostics strategy.

The gold standard for CNV detection in genetic diagnostics are multiplex ligation-dependent amplification (MLPA) or array-based comparative genome hybridization (aCGH) [12]. However, to provide simpler and quicker analysis, new approaches based on using NGS data to analyze CNV variants have been proposed. A number of bioinformatic tools have been developed to analyze post-NGS data, but not all of them show adequate sensitivity or specificity, or acceptable false discovery rates. The detection of large rearrangements from targeted NGS data is still complicated by issues intrinsic to the technology, such as short read lengths [12].

The aim of the study was to search novel CNV changes in FH patients without detected pathogenic SNVs in targeted sequencing and evaluation of CNV calling tool (DECoN) working on NGS data; it also assesses the suitability of the method as a screening step in genetic diagnostics.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

A total of 136 adult and children patients from the EAS-FHSC Regional Center for Rare Diseases at the Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute (PMMHRI) in Poland were recruited for the present study [13]. The inclusion criteria were the status of at least “possible FH” according to the Simon Broome diagnostic criteria in children and the Dutch Lipid Clinical Network Criteria in adults. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the PMMHRI Ethics Committee (opinion number 15/2016, date of approval 12 January 2016). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

2.2. NGS Analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using a MagCore automatic nucleic acid extractor (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan). The entire procedure of preparing the libraries for NGS sequencing was conducted in accordance with the manufacturer's protocol and was described in detail in the cited resource [14]. A custom NGS panel containing 21 causative and candidate genes linked to familial hypercholesterolemia and other primary dyslipidemias (*ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *APOA5*, *APOB*, *APOC2*, *APOE*, *CYP7A1*, *GPIHBP1*, *LCAT*, *LDLR*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *LMF1*, *LMNA*, *LPL*, *PCSK9*, *PPARG*, *SCAP*, *SREBF2*, *STAP1*). The obtained NGS data were processed and analyzed by VariantStudio Software. The pathogenicity of the variants was determined in silico using web-based software, such as PolyPhen2, SIFT and Mutation Taster. Searches for phenotype–genotype correlations were evaluated using PubMed, LOVD or VARSOME databases. Variants were classified according to current American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines [15]. The presence of selected variants was confirmed by bidirectional Sanger sequencing on a 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). DNA Variant Analysis was performed using Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, State College, PA, USA).

2.3. MLPA Analysis

The MLPA analysis was conducted in accordance with the manufacturer's protocol (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) using the SALSA MLPA Probemix P062 *LDLR*. The PCR products were combined with labelled size standard (GeneScan 500 LIZ Size Standard; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and separated by capillary electrophoresis on a 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The P062 kit contains 20 probes for *LDLR*, one flanking probe for upstream of *LDLR* and 12 reference probes for gene loci on alternative autosomal chromosomes. The GeneMarker v1.95 (SoftGenetics, State College, PA, USA) was used to perform pattern comparison of

peak height between patient samples and control samples. Each amplification yields a pattern composed of fluorescent FAM-labeled peaks, with each peak corresponding to a specific genomic DNA locus.

2.4. CNV Calling

CNV screening of NGS data was performed using the DECoN bioinformatic tool. To generate a coverage metrics of exons the bam files and bed files obtained from targeted NGS were uploaded. Then, quality checks were performed to flag any samples or exons where exon CNV calling may be suboptimal. Both exons and samples were evaluated based on their median coverage level and their mutual correlation. Samples without a high correlation with others in the set are likely to have suboptimal detection across the entire target. The default value was 0.98. After rejecting non-compliant samples, the exon CNV calling was performed. All generated calls were collected in a summary table containing CNV ID, sample ID, correlation score (the maximum correlation between the test sample and any other sample in the full set of bam files), N.comp (the number of samples used as the reference set), Start.b (the number of the first exon in the call from the analyzed bed file), End.b (the number of the last exon in the call from the analyzed bed file), CNV type, N.exons (number of exons encompassed by the call), Start (the start position of the call from the analyzed bed file), End (the end position of the call from the analyzed bed file), Chromosome, Genomic ID, the Bayes Factor, Reads.expected, Reads.observed, Reads.ratio and name of the affected gene. The bioinformatics content was carried out in cooperation with research team from Medical University of Warsaw, Poland.

3. Results

A group of 136 pediatric and adult patients with a clinical suspicion of familial hypercholesterolemia (FH) was recruited for the present study. Potentially pathogenic SNVs were identified in 57 patients, who were referred to Sanger sequencing confirmation. Thirty selected patients without a positive NGS finding were referred for MLPA analysis; the selective referral to MLPA analysis was dictated by economic considerations and only patients with highest LDL cholesterol were selected. The MLPA analysis revealed possibly pathogenic CNVs in 10 patients. To test the DECoN program, the whole study group was referred for bioinformatic analysis. DECoN detected duplication of exons 4–8 in *LDLR* gene in two patients whose genetic analysis was stopped after the NGS step. Both cases were validated with MLPA. The research process is presented in Figure 1.

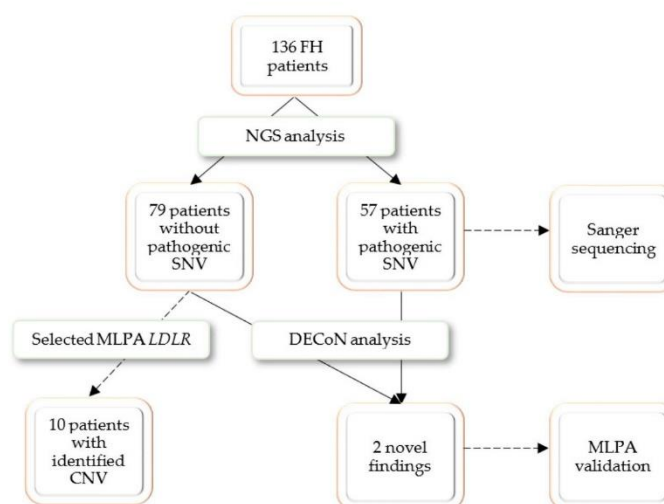


Figure 1. The schematic presentation of the conducted research.

Among twelve CNV-positive patients, six were children and six adults. Patient age, sex, lipid profile and obtained genetic results are shown in Table 1.

Table 1. Patients with identified FH-related CNV (copy number variation) and obtained genetic results.

No.	Sex	Age	TC [mg/dL]	LDL [mg/dL]	HDL [mg/dL]	TG [mg/dL]	NGS Result	MLPA Result
1.	Male	15	293	253	42	45	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
2.	Female	50	287	203	41	NA	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
3.	Female	3	277	222	47	43	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
4.	Female	28	380	265	NA	NA	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
5.	Female	64	424	344	32	344	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
6.	Female	14	336	263	52	106	negative	Deletion of exons 6–8 of <i>LDLR</i>
7.	Female	35	368	282	59	134	negative	Deletion of exons 6–8 of <i>LDLR</i>
8.	Female	16	440	367	43	144	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
9.	Female	5	745	693	NA	NA	positive	Deletion of exons 9–10 of <i>LDLR</i>
10.	Female	68	* 196	* 140	* 37	* 104	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
11.	Male	28	333	290	39	93	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>
12.	Female	10	371	274	83	70	negative	Duplication of exons 4–8 of <i>LDLR</i>

* Lipid parameters obtained during the hypolipidemic treatment. The patient was excluded from a statistical summaries.

Nine patients demonstrated exons 4–8 heterozygous duplication, two showed exons 6–8 heterozygous deletion and one patient exons 9–10 heterozygous deletion. Examples of the MLPA images are presented in Figure 2.

3.1. Duplication of Exons 4–8 of *LDLR*

Patients 1 and 2 represent a family case (son and mother); the 15-year-old boy (weight: 44.5 kg; high: 156 cm) was admitted to hospital with a TC level of 293 mg/dL (3.31 mmol/L) and LDL-c of 253 mg/dL (6.54 mmol/L). Implemented statin therapy resulted in a reduction in the TC level to 224 mg/dL (5.79 mmol/L) and LDL-c to 165 mg/dL (4.27 mmol/L). Lipid testing of close family members reveals a history of hypercholesterolemia in the mother [TC 287 mg/dL (3.24 mmol/L) and LDL-c 203 mg/dL (5.25 mmol/L)] and siblings (18-year-old brother and 23-year-old sister). A physical examination revealed no abnormalities.

Patients 3 and 4 are mother and daughter; a 3-year-old girl demonstrated hypercholesterolemia with a TC level of 277 mg/dL (7.16 mmol/L) and LDL-c of 222 mg/dL (5.74 mmol/L). NGS analysis revealed the presence of a heterozygous missense variant c.56C > G (rs3135506) in *APOA5* gene. This variant has previously been associated with an increased risk of hypertriglyceridemia [16,17], but current reports are more likely to indicate this as functional polymorphism [18,19]. As our patient did not demonstrate high TG concentration and the c.56C > G variant still did not explain the cause of hypercholesterolemia, further genetic diagnostics was required.

Case number 5 is a 64-year-old woman suffering from hypertension, generalized atherosclerosis and dizziness. Her lipid profile presented combined hyperlipidemia with a TC level of 424 mg/dL (10.96 mmol/L), LDL-c of 344 mg/dL (8.90 mmol/L) and TG of 344 mg/dL (3.88 mmol/L). At that time, the patient began pharmacological lipid-lowering treatment with rosuvastatin and ezetimibe (each 10 mg daily doses). After more than a year of treatment, the cholesterol parameters dropped to 271 mg/dL (7.01 mmol/L) for TC and 145 mg/dL (3.75 mmol/L) for LDL-c. The patient's daughter, with LDL-c level over 190 mg/dL, was referred for genetic testing.

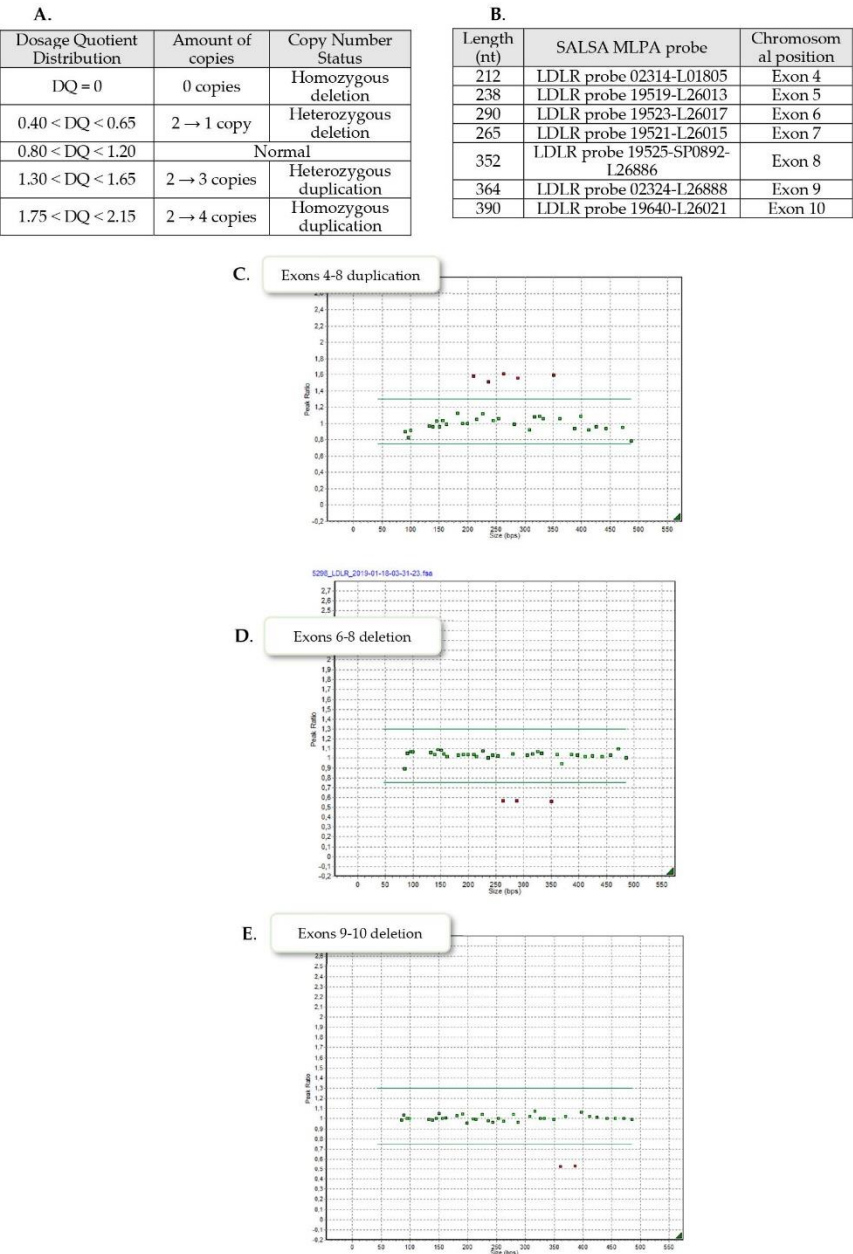


Figure 2. (A). Cut-off values for dosage quotient distribution, the equivalent number of copies and homo/heterozygosity state. (B). MLPA (multiplex ligation-dependent amplification) fragment length, SALSA MLPA probe numbers and their chromosomal position. (C). MLPA plots presenting exons 4–8 duplication of *LDLR*. The peak ratios of five probes oscillate in the range of 1.5–1.6 which corresponds to heterozygous duplication. (D). MLPA plots presenting exons 6–8 deletion of *LDLR*. The peak ratios of three probes oscillate in the range of 0.5–0.6 which corresponds to heterozygous deletion. (E). MLPA plots presenting exons 9–10 deletion of *LDLR*. The peak ratios of two probes oscillate in the range of 0.5–0.6 which corresponds to heterozygous deletion.

Patient 8, a 16-year-old girl, presented severe hypercholesterolemia with a TC level of 440 mg/dL (11.38 mmol/L) and LDL-c of 267 mg/dL (6.90 mmol/L). The girl was started on atorvastatin. The patient's mother was also symptomatic with TC 290 mg/dL (7.50 mmol/L) and LDL-c 288 mg/dL (7.45 mmol/L), during statin therapy.

Patient 10 is 68-year-old women with chronic coronary syndrome after coronary artery bypass graft surgery. Her family history indicates the presence of severe lipid abnormalities—two brothers experienced sudden heart attacks at the ages of 25 and 39. The patient was treated with fenofibrate; lipid parameters during the drug treatment: TC 196 mg/dL (5.07 mmol/L), LDL-c 140 mg/dL (3.62 mmol/L), HDL 37 mg/dL (0.96 mmol/L), TG 104 mg/dL (1.17 mmol/L).

Case number 11 is a 28-year-old boy with severe hypercholesterolemia identified at age 8, with a TC level of 329 mg/dL (8.51 mmol/L), LDL-c of 270 mg/dL (6.98 mmol/L), HDL of 50 mg/dL (1.29 mmol/L) and TG of 43 mg/dL (0.49 mmol/L), at that time. Since the age of 18, treatment with atorvastatin, rosuvastatin, simvastatin and ezetimibe has been implemented. Due to muscle pains in the lower limbs and increased creatinine kinase level (452 IU/l), the hypolipidemic treatment was discontinued. A year later, the patient was referred for genetic testing, and his lipid parameters again showed severe lipid abnormalities [TC 333 mg/dL (8.61 mmol/L), LDL-c 290 mg/dL (7.50 mmol/L), HDL 39 mg/dL (1.01 mmol/L), TG 93 mg/dL (1.05 mmol/L)]. Currently, the patient reports a healthy lifestyle, diet, physical activity, and refuses drug treatment. The patient's mother is also affected with a LDL-c level of 307 mg/dL (7.94 mmol/L).

Patient 12 is an untreated 10-year-old girl with a TC level of 371 mg/dL (9.59 mmol/L), LDL-c 274 mg/dL (7.09 mmol/L), HDL 83 mg/dL (2.15 mmol/L) and TG 70 mg/dL (0.79 mmol/L). The lipid parameters of the parents do not indicate inheritance of duplication [Father: TC 194 mg/dL (5.02 mmol/L), LDL-c 110 mg/dL (2.84 mmol/L), HDL 67 mg/dL (1.73 mmol/L), TG 87 mg/dL (0.98 mmol/L); Mother: TC 147 mg/dL (3.80 mmol/L), LDL-c 87 mg/dL (2.25 mmol/L), HDL 37 mg/dL (0.96 mmol/L), TG 173 mg/dL (1.95 mmol/L)]. No abnormalities were noted on physical examination.

3.2. Deletion of Exons 9–10 of LDLR

Case number 9 is a 5-year-old girl of normal weight (19 kg, 116 cm) showing extreme hypercholesterolemia with TC level of 745 mg/dL (19.27 mmol/L) and LDL-c of 693 mg/dL (17.92 mmol/L). The patient manifested characteristic phenotypic feature of hypercholesterolemia as xanthomas found on eyelid, Achilles tendon and knee area (Figure 3). The patient received treatment with 10 mg rosuvastatin, which resulted in a significant reduction in lipid parameters [TC 243 mg/dL (6.28 mmol/L), LDL-c 210 mg/dL (5.43 mmol/L)]. In addition to extensive exon 9–10 deletion, NGS analysis revealed the presence of heterozygous missense variant c.1747C>T, p.(His583Tyr) in exon 12 of *LDLR* gene. The detected variant is reported in ClinVar (RCV000771547.7) and LOVD database (#0000093188) as likely pathogenic, corresponding to familial hypercholesterolemia. The performed MLPA analysis excluded the presence of exon 9–10 deletion in the girl's parents, suggesting de novo origin.



Figure 3. Xanthoma found on right knee. A similar-size xanthoma on the right Achilles tendon was removed.

3.3. Deletion of Exons 6–8 of LDLR

Patients 6 and 7 are mother and daughter; the 14-year-old girl was admitted to hospital with a TC level of 336 mg/dL (8.69 mmol/L), LDL-c 263 mg/dL (6.80 mmol/L), HDL 52 mg/dL (1.34 mmol/L) and TG 106 mg/dL (1.20 mmol/L). Her 35-year-old mother also has an abnormal lipid profile, with TC level of 368 mg/dL (9.52 mmol/L) and LDL-c 282 mg/dL (7.29 mmol/L); simvastatin treatment was implemented. Neither presented xanthomas or corneal arcus.

3.4. Bioinformatic Analysis

To confirm the changes detected in the MLPA and to search for new CNVs we processed post-NGS data by DECoN. The computational pipeline utilizes coverage depth of the captured regions and calculates a copy number ratio for each region. Based on variations in mean coverages between samples, the program identified two additional patients with suspected exon 4–8 duplication in the *LDLR* gene (Table 2). The presence of changes was confirmed by MLPA.

Table 2. Results obtained with the DECoN program. The following columns indicate: Correlation—the maximum correlation between the test sample and any other sample in the full set of BAM files, N.comp—the number of samples used as the reference set, Start.b—the number of the first exon in the call from the analyzed BED file, End.b—the number of the last exon in the call from the analyzed BED file, CNV type—type of copy number variation change, Genomic ID—genomic coordinates of detected variant according to GRCh38, BF—the Bayes factor associated with the call, Reads.expected—the number of expected reads under the probabilistic model, Reads.observed—the number of observed reads, Reads.ratio—the ratio of observed to expected reads and Gene name.

No.	Correlation	N.Comp	Start.b	End.b	CNV Type	Genomic ID	BF	Reads. Expected	Reads. Observed	Reads. Ratio	Gene
11.	0.997068559377578	2	250193	250214	duplication	chr19:11105220-11111639	58.5	8354	10869	1.3	<i>LDLR</i>
12.	0.998912665575895	12	250193	250214	duplication	chr19:11105220-11111639	115	5100	7114	1.39	<i>LDLR</i>

4. Discussion

Changes in copy number variation constitute the genetic background of many human diseases. It is known that familial hypercholesterolemia (FH) is mainly caused by point changes in *LDLR*, *APOB*, *PCKS9* or of a wide range of candidate genes. However, it should not be forgotten that about 10% of causal variation constitutes *LDLR* CNVs, so there is a high need to detect large-scale CNVs in addition to single nucleotide variants [9].

The first stage of the analysis examined all patients using an NGS custom panel, which identified disease-causing variants in 57 patients. A second-stage MLPA analysis, performed in 30 selected symptomatic patients, confirmed *LDLR* changes in 10 patients. Finally, the DECoN analysis detected CNV changes in two additional patients who had not been previously checked by the MLPA technique. Hence, 42% of the study group were found to have pathogenic SNV and 8.8% with causal CNV. The lowered percentage of CNV occurrence relative to the commonly reported 10%, can be considered as a study limitation. The most frequent alteration was heterozygous duplication of exons 4–8, found in nine individuals with an average concentration of TC and LDL-c of 348 mg/dL (9.00 mmol/L) and 275 mg/dL (7.11 mmol/L), respectively. These frequencies are in line with data from other study on Polish population, where this CNV change was found to be the most common. Chmara et al. also report that major *LDLR* rearrangements, as well as two-point variants in *LDLR* and *APOB* genes, are frequent causes of FH in Poland [20]; as such, CNVs are an important component of the genetic background of FH and should not be overlooked in the diagnostic process. Few studies have addressed CNV analyses in Polish populations, which may indicate a weak diagnostics rate in this area. The entire study group was characterized by very high levels of TC and LDL-c with mean concentrations of

388 mg/dL (10.03 mmol/L) and 318 mg/dL (8.22 mmol/L), respectively. These findings correlate with previous reports that heterozygous *LDLR* CNVs are associated with a more severe biochemical phenotype than other types of alteration [21].

The integration of the two methods proved to be particularly valuable in patient number 9, a five-year-old girl who presented a pathogenic missense variant and a two-exon deletion in *LDLR* gene, corresponding to a compound heterozygote state. Homozygous FH is a rare and life-threatening disease originally characterized by plasma cholesterol levels >500 mg/dL (>12.93 mmol/L), extensive xanthomas, and marked premature and progressive atherosclerotic cardiovascular disease (ACVD) [22]. The co-occurrence of high levels of TC and LDL-c with xanthomas in the patient corresponded to a homozygote state; this was suspected before the genetic testing and highly indicated a diagnosis of FH.

The missense c.1747C>T variant leads to histidine to tyrosine substitution at amino acid position 583, (p.His583Tyr). The variant has “conflicting interpretations of pathogenicity” with a significant preponderance of “pathogenic” ratings in ClinVar database. Combined computational analysis based on 10 predictor tools (BayesDel_addAF, DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, LIST-S2, M-CAP, MVP, MutationTaster and SIFT) on Varsome (<https://varsome.com>, accessed on 6 June 2022) classified the above variant as pathogenic. This variant was previously reported to be one of the most common in FH patients in Singapore, Hong Kong, Taiwan and China [23]. In vitro research data, based on radioactive method, indicated that LDL receptor activity decreased by 60% due to c.1747C>T variant [23]. Based on the available reports, the detected variant should be considered as potentially pathogenic, disrupting the normal function of the LDL receptor.

Various single or multi-exon deletions in the *LDLR* gene have been reported so far (exons 2–3, exon 5, exon 7, exon 9–14) [21]; however, this is the first report of a heterozygous deletion of exons 9 and 10 co-occurring with SNV. Exons 7–14 of the *LDLR* gene encode the EGF-precursor homology domain, that plays a pivotal role in lipoprotein release during receptor recycling. The amino acid sequence in this domain is highly conserved, with 70–85% sequence homology shared across different species: human, cow, rabbit, hamster, rat, and the toad *Xenopus laevis* [21]. Any change within the domain may result in impaired release of LDL from the *LDLR* and potentially prevent the return of the receptor to the hepatocyte surface. The heterozygous deletion of two exons (9 and 10) likely resulted in no *LDLR* production (null allele) thus contributing to a massive reduction in *LDLR*-mediated endocytosis of LDL protein. The presented case is an interesting example of phenotypic-genotypic correlation in severe FH, illustrating the heterogeneity of the disease, and hence the need for comprehensive genetic diagnostics and early detection.

The MLPA technique is considered as the gold standard for CNV detection but for FH diagnostics, it is only well suited for *LDLR* gene analysis. The emerging reports of the presence of CNVs in *inter alia* the *PCSK9* gene [7], prompts the analysis of other FH-related genes not covered by commercially available MLPA kits. It is also a rather time-consuming and expensive method, and as such could not be applied for all patients in the present study. In addition, being a semiquantitative method, it also requires well-set standards and controls for correct peak analysis.

It has always been a goal to find a unique method to detect both SNVs and CNVs from a single source of data. Many tools for CNV detection from NGS data have been developed but most show poor performance when dealing with small CNVs and were designed to work with whole-genome or whole-exome data [12]. Four different types of approach are currently used for detecting CNVs from NGS data: paired-end mapping-based detection (PE), split read based detection (SR), de novo assembly based detection (DA) and read depth based detection (RD) [24]. A large number of synthesized overlapping fragments is required to maximize DOC in panel NGS; this offers an opportunity to determine qualitative but also quantitative aspects of the selected genomic regions. This additional information from NGS data can be quantified using RD approaches, thus allowing for CNV detection [9]. Using the DECoN program, which is based exactly on RD, we were able to detect CNV changes in two new patients who had not been previously checked by the MLPA technique. Filtering

all other patients, no changes were found in genes other than *LDLR*; nevertheless, our subsequent analysis of the data after panel NGS proved to be a useful tool. The increasing availability of clinical NGS panels and growing affordability of bioinformatic applications present a cost-effective opportunity to simultaneously identify the in-depth backgrounds of dyslipidemias.

5. Conclusions

To better understand the genetic background of inherited disorders, it is necessary to obtain increasingly advanced diagnostic tools to analyze the human genome. Our findings indicate that the compound genetic background of FH requires the implementation of several diagnostic tools, or preferably a single one that covers all possible types of genetic changes. Our results suggest that the NGS-based approach has the potential to identify large-scale variants in *LDLR* and could be further applied to extend CNV screening to other FH-related genes. Nevertheless, the outcomes from the bioinformatic approach still need to be confirmed by the MLPA method, and this remains the reference method for assessing CNV.

Author Contributions: Conceptualization, A.G. and L.R.; methodology, A.G., I.P., K.S., D.S., R.P., P.S. and L.R.; software, D.S., R.P. and P.S.; validation, D.S., R.P. and P.S.; formal analysis, L.R. and I.P.; investigation, A.G., Ł.K. and L.R.; resources, A.G., Ł.K., J.L., M.B., P.M., E.S. and A.L.; data curation, R.P., P.S., D.S. and L.R.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, A.G., M.B. and L.R.; visualization, L.R.; supervision, A.G.; project administration, A.G. and L.R.; funding acquisition, A.G., M.B. and L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute, grant number 2016/X/9-SZB.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Polish Mother's Memorial Hospital—Research Institute (opinion number 15/2016, date of approval 12 January 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patients in order to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/, accessed on 6 June 2022), DECIPHER (www.deciphergenomics.org, accessed on 6 June 2022) and Varsome (<https://varsome.com>, accessed on 6 June 2022) database.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Beheshti, S.O.; Madsen, C.M.; Varbo, A.; Nordestgaard, B.G. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *75*, 2553–2566. [CrossRef] [PubMed]
- Vallejo-Vaz, A.J.; Stevens, C.A.T.; Lyons, A.R.M.; Dharmayat, K.I.; Freiburger, T.; Hovingh, G.K.; Mata, P.; Raal, F.J.; Santos, R.D.; Soran, H.; et al. Global Perspective of Familial Hypercholesterolaemia: A Cross-Sectional Study from the EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). *Lancet* **2021**, *398*, 1713–1725. [CrossRef]
- Banach, M.; Burchardt, P.; Chlebus, K.; Dobrowolski, P.; Dudek, D.; Dyrbus, K.; Gasior, M. Diagnostyka i Leczenie Zaburzeń Lipidowych W Polsce 2021. 2021. Available online: <https://nadcisnienietnietnicze.pl/sites/scm/files/2022-01/Wytyczne%20PTLKLWPPTKPTDLPTDPTNT%20diagnostyki%20i%20leczenia%20zaburze%C5%84%20lipidowych%20w%20Polsce%202021.pdf> (accessed on 6 June 2022).
- Mach, F.; Baigent, C.; Catapano, A.L.; Koskinas, K.C.; Casula, M.; Badimon, L.; Chapman, M.J.; de Backer, G.G.; Delgado, V.; Ference, B.A.; et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: Lipid Modification to Reduce Cardiovascular Risk. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 111–188. [CrossRef] [PubMed]
- Iacocca, M. Improving the Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 2019. Available online: <https://ir.lib.uwo.ca/etd/6017/> (accessed on 6 June 2022).
- Santos, R.D. Advancing Prediction of Pathogenicity of Familial Hypercholesterolemia LDL Receptor Commonest Variants with Machine Learning Models. *JACC Basic Transl. Sci.* **2021**, *6*, 828–830. [CrossRef]

7. Iacocca, M.A.; Wang, J.; Sarkar, S.; Dron, J.S.; Lagace, T.; McIntyre, A.D.; Lau, P.; Robinson, J.F.; Yang, P.; Knoll, J.H.; et al. Whole-Genome Duplication of PCSK9 as a Novel Genetic Mechanism for Severe Familial Hypercholesterolemia. *Can. J. Cardiol.* **2018**, *34*, 1316–1324. [\[CrossRef\]](#)
8. Zarrei, M.; MacDonald, J.R.; Merico, D.; Scherer, S.W. A Copy Number Variation Map of the Human Genome. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 172–183. [\[CrossRef\]](#)
9. Iacocca, M.A.; Hegele, R.A. Role of DNA Copy Number Variation in Dyslipidemias. *Curr. Opin. Lipidol.* **2018**, *29*, 125–132. [\[CrossRef\]](#)
10. Goldmann, R.; Tichý, L.; Freiburger, T.; Zapletalová, P.; Letocha, O.; Soška, V.; Fajkus, J.; Fajkusová, L. Genomic Characterization of Large Rearrangements of the LDLR Gene in Czech Patients with Familial Hypercholesterolemia. *BMC Med. Genet.* **2010**, *11*. [\[CrossRef\]](#)
11. Amsellem, S.; Briffaut, D.; Carrié, A.; Rabés, J.P.; Girardet, J.P.; Fredenrich, A.; Moulin, P.; Krempf, M.; Reznik, Y.; Vialettes, B.; et al. Intronic Mutations Outside of Alu-Repeat-Rich Domains of the LDL Receptor Gene Are a Cause of Familial Hypercholesterolemia. *Hum. Genet.* **2002**, *111*, 501–510. [\[CrossRef\]](#)
12. Moreno-Cabrera, J.M.; del Valle, J.; Castellanos, E.; Feliubadaló, L.; Pineda, M.; Brunet, J.; Serra, E.; Capellà, G.; Lázaro, C.; Gel, B. Evaluation of CNV Detection Tools for NGS Panel Data in Genetic Diagnostics. *Eur. J. Hum. Genet.* **2020**, *28*, 1645–1655. [\[CrossRef\]](#)
13. Lewek, J.; Konopka, A.; Starostecka, E.; Penson, P.E.; Maciejewski, M.; Banach, M. Clinical Features of Familial Hypercholesterolemia in Children and Adults in Eas-Fhsc Regional Center for Rare Diseases in Poland. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4302. [\[CrossRef\]](#)
14. Rutkowska, L.; Sałacińska, K.; Salachna, D.; Matusik, P.; Pinkier, I.; Kepczyński, Ł.; Piotrowicz, M.; Starostecka, E.; Lewiński, A.; Gach, A. Identification of New Genetic Determinants in Pediatric Patients with Familial Hypercholesterolemia Using a Custom NGS Panel. *Genes* **2022**, *13*, 999. [\[CrossRef\]](#)
15. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [\[CrossRef\]](#)
16. Talmud, P.J.; Palmen, J.; Putt, W.; Lins, L.; Humphries, S.E. Determination of the Functionality of Common APOA5 Polymorphisms. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28215–28220. [\[CrossRef\]](#)
17. Talmud, P.J.; Martin, S.; Taskinen, M.R.; Frick, M.H.; Nieminen, M.S.; Kesäniemi, Y.A.; Pasternack, A.; Humphries, S.E.; Syväne, M. APOA5 Gene Variants, Lipoprotein Particle Distribution, and Progression of Coronary Heart Disease: Results from the LOCAT Study. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 750–756. [\[CrossRef\]](#)
18. Niculescu, L.S.; Vlădică, M.; Sima, A.V. Association of APOA5 and APOC3 Gene Polymorphisms with Plasma Apolipoprotein A5 Level in Patients with Metabolic Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 587–591. [\[CrossRef\]](#)
19. Srivastava, R.K.; Singh, P.; Verma, P.; Sethi, R.; Verma, A.; Ali, W.; Tiwari, S. Influence of APOA5 (Rs662799 and Rs3135506) Gene Polymorphism in Acute Myocardial Infarction Patients and Its Association with Basic Coronary Artery Disease Risk Factors. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2015**, *5*, 008–014. [\[CrossRef\]](#)
20. Chmara, M.; Wasag, B.; Zuk, M.; Kubalska, J.; Wegrzyn, A.; Bednarska-Makaruk, M.; Pronicka, E.; Wehr, H.; Defesche, J.C.; Rynkiewicz, A.; et al. Molecular Characterization of Polish Patients with Familial Hypercholesterolemia: Novel and Recurrent LDLR Mutations. *J. Appl. Genet.* **2010**, *51*, 95–106. [\[CrossRef\]](#)
21. Melinkeri, R.P.; Agarwal, M.; Anand, S.; Sawant, V.A.; Singla, R. A Case of Familial Hypercholesterolemia Caused by Homozygous Deletion in the LDLR Gene Diagnosed by Targeted Next-Generation Sequencing. *Clin. Lipidol. Metab. Disord.* **2019**, *14*, 11–16. [\[CrossRef\]](#)
22. Cuchel, M.; Bruckert, E.; Ginsberg, H.N.; Raal, F.J.; Santos, R.D.; Hegele, R.A.; Kuivenhoven, J.A.; Nordestgaard, B.G.; Descamps, O.S.; Steinhausen-Thiessen, E.; et al. Homozygous Familial Hypercholesterolemia: New Insights and Guidance for Clinicians to Improve Detection and Clinical Management. A Position Paper From the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 2146–2157. [\[CrossRef\]](#)
23. Sreedharan, A.V.; Pek, S.L.T.; Tan, T.H.; Tavintharan, S.; Yap, F. Successful Pharmacological Management of a Child with Compound Heterozygous Familial Hypercholesterolemia and Review of the Recent Literature. *J. Clin. Lipidol.* **2020**, *14*, 639–645. [\[CrossRef\]](#)
24. Singh, A.K.; Olsen, M.F.; Lavik, L.A.S.; Vold, T.; Drablos, F.; Sjørusen, W. Detecting Copy Number Variation in next Generation Sequencing Data from Diagnostic Gene Panels. *BMC Med. Genom.* **2021**, *14*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)

Case Report

Familial Partial Lipodystrophy—Literature Review and Report of a Novel Variant in *PPARG* Expanding the Spectrum of Disease-Causing Alterations in FPLD3

Lena Rutkowska ^{1,*} , Dominik Salachna ¹, Krzysztof Lewandowski ^{2,3,*}, Andrzej Lewiński ^{2,3,*}  and Agnieszka Gach ^{1,*}

¹ Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital-Research Institute, 93-338 Lodz, Poland; dominik.salachna@iczm.edu.pl

² Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland

³ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Polish Mother's Memorial Hospital-Research Institute, 93-338 Lodz, Poland

* Correspondence: lena.rutkowska@iczm.edu.pl (L.R.); krzysztof.lewandowski@iczm.edu.pl (K.L.); andrzej.lewinski@iczm.edu.pl (A.L.); agnieszka.gach@iczm.edu.pl (A.G.)



Citation: Rutkowska, L.; Salachna, D.; Lewandowski, K.; Lewiński, A.; Gach, A. Familial Partial Lipodystrophy—Literature Review and Report of a Novel Variant in *PPARG* Expanding the Spectrum of Disease-Causing Alterations in FPLD3. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1122. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051122>

Academic Editor: Christina E. Kostara

Received: 16 March 2022

Accepted: 28 April 2022

Published: 30 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Familial partial lipodystrophy (FPLD) is a rare genetic disorder characterized by the selective loss of adipose tissue. Its estimated prevalence is as low as 1 in 1 million. The deficiency of metabolically active adipose tissue is closely linked with a wide range of metabolic complications, such as insulin resistance, lipotrophic diabetes, dyslipidemia with severe hypertriglyceridemia, hypertension or hepatic steatosis. Moreover, female patients often develop hyperandrogenism, hirsutism, polycystic ovaries and infertility. The two most common types are FPLD type 2 and 3. Variants within *LMNA* and *PPARG* genes account for more than 50% of all reported FPLD cases. Because of its high heterogeneity and rarity, lipodystrophy can be easily unrecognized or misdiagnosed. To determine the genetic background of FPLD in a symptomatic woman and her close family, an NGS custom panel was used to sequence *LMNA* and *PPARG* genes. The affected patient presented fat deposits in the face, neck and trunk, with fat loss combined with muscular hypertrophy in the lower extremities and hirsutism, all features first manifesting at puberty. Her clinical presentation included metabolic disturbances, including hypercholesterolemia with severe hypertriglyceridemia, diabetes mellitus and hepatic steatosis. This together with her typical fat distribution and physical features raised a suspicion of FPLD. NGS analysis revealed the presence of missense heterozygous variant c.443G>A in exon 4 of *PPARG* gene, causing glycine to glutamic acid substitution at amino acid position 148, p.(Gly148Glu). The variant was also found in the patient's mother and son. The variant was not previously reported in any public database. Based on computational analysis, crucial variant localization within DNA-binding domain of PPAR γ , available literature data and the variant cosegregation in the patient's family, novel c.443G>A variant was suspected to be causative. Functional testing is needed to confirm the pathogenicity of the novel variant. Inherited lipodystrophy syndromes represent a heterogeneous group of metabolic disorders, whose background often remains unclear. A better understating of the genetic basis would allow earlier diagnosis and targeted treatment implementation.

Keywords: inherited lipodystrophy; familial partial lipodystrophy type 3; metabolic disorder; lipids; *PPARG* gene; genetic background; genotype-phenotype correlation

1. Introduction

Lipodystrophy syndromes are a heterogeneous group of genetically inherited or acquired conditions, characterized by dysfunctional white adipose tissue. They are considered ultra-rare syndromes with an estimated prevalence of 1.3–4.7 cases per million [1]. Based on the degree of fat loss we distinguish partial and generalized lipodystrophy [2]. There

are four major categories of lipodystrophy syndromes: Congenital Generalized Lipodystrophy (CGL), Familial Partial Lipodystrophy (FPLD), Acquired Generalized Lipodystrophy (AGL) and Acquired Partial Lipodystrophy (APL). The two most prevalent subtypes of genetic lipodystrophies are Congenital Generalized Lipodystrophies and Familial Partial Lipodystrophies. The main differentiating criteria are molecular etiology and pattern of adipose tissue distribution [3]. Generally, there are four types of CGL, seven types of FPLD and a few other unclassified forms [1]. The described prevalence of CGL is approximately 1 in 10 million and for FPLD about 1 in 1 million but it may be underestimated [3].

This paper reports a novel c.443G>A variant probably affecting the DNA-binding domain of the PPAR γ receptor in a symptomatic 29-year-old index patient and family. The presented literature review is focused mainly on FPLD type 2 and 3, as this was the scope of clinical consideration in our case.

2. Familial Partial Lipodystrophy (FPLD)

Familial Partial Lipodystrophy is a rare genetic disorder usually characterized by selective loss of adipose tissue in the extremities and gluteal region, without any change in abdominal and visceral fat. In most cases, abnormal fat distribution becomes apparent at puberty [4]. This selective deficiency of metabolically active adipose tissue is tightly linked with a wide range of metabolic complications, such as insulin resistance, lipoatrophic diabetes, dyslipidemia with severe hypertriglyceridemia, hypertension or hepatic steatosis. Moreover, female patients often develop hyperandrogenism, hirsutism, polycystic ovaries and infertility [5]. The extent of fat loss often determines the severity of metabolic consequences. For example, patients with generalized lipodystrophies have more severe diabetes, hypertriglyceridemia, or hepatic steatosis than those with partial lipodystrophies.

There are seven subtypes of FPLD (characterised in Table 1)—six caused by mutations in various genes (*LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *CIDEA*, *LIPE*, *AKT2* or *CAVI*); the condition can be inherited in either a dominant (mostly) or recessive manner.

Table 1. Subdivisions of Familial Partial Lipodystrophy.

Type	Major Genetic Background	Manner of Inheritance	OMIM Number	Observed Phenotype
FPLD type 1, Kobblerling	unknown/polygenetic origin	-	%608600	Loss of subcutaneous fat from the limbs with truncal obesity Reduction of gluteal AT Normal or increased facial and neck AT
FPLD type 2, Dunnigan	<i>LMNA</i>	dominant	#151660	Loss of subcutaneous fat from the limbs and trunk Reduction of gluteal AT Excess fat accumulation in the face and neck Increased muscularity
FPLD type 3	<i>PPARG</i>	dominant	#604367	Loss of subcutaneous fat from the lower limbs Normal or increased abdominal, facial and neck AT Increased muscularity
FPLD type 4	<i>PLIN1</i>	dominant	#613877	Loss of subcutaneous fat primarily in gluteal and lower limb regions Muscular appearance
FPLD type 5	<i>CIDEA</i>	recessive	#615238	Lack of AT on limbs and gluteal region Presence of visceral, neck and axillary fat pads Increased muscularity
FPLD type 6	<i>LIPE</i>	recessive	#615980	Reduced lower limbs subcutaneous fat In some patients abnormal fat accumulation in the back and axillae
FPLD type 7	<i>CAVI</i>	dominant	#606721	Absence of AT over entire body except buttocks, hips and thighs

AT—adipose tissue.

Variants within the *LMNA* and *PPARG* genes account for more than 50% of all reported FPLD cases [3]. Both genes play a crucial role in the differentiation and proper functioning of adipose tissue [6]. The most common form of FPLD is type 2 (Dunnigan type; OMIM #151660), which is inherited in an autosomal dominant manner [1].

2.1. Familial Partial Lipodystrophy Type 2 (Dunnigan Type)

The Dunnigan-type familial partial lipodystrophy is caused by mutations in the *LMNA* gene, located on the long arm of chromosome 1 (1q21–q22). As the *LMNA* gene is ubiquitously expressed, different mutations throughout the gene can lead to at least 14 diseases from various forms of muscular dystrophy to dilated cardiomyopathy [6,7]. Disorders associated with *LMNA* aberrations are collectively described as laminopathies.

The *LMNA* gene encodes A-type nuclear lamins produced via alternative splicing. The two major isoforms, sharing the first 566 amino acids, are lamin A and C (Lamin A/C) [8]. They are primarily localized below the inner nuclear membrane and form part of the nuclear lamina [8]. Lamin A/C interacts with the cytoskeleton and provides structural stability for the nuclear envelope [6].

At present, it is unclear how unique *LMNA* mutations can cause an adipose tissue-specific disease like FPLD2 [8], as well as its late manifestation [7]. It is suspected that the underlying cause of disease is altered cell division, increased apoptosis and cell death, due to disrupted lamin-chromatin interactions [6]. *LMNA* mutations are thought to induce structural modifications of nuclear lamina, resulting in cytotoxic accumulation of immature proteins and therefore probably weakness of nuclear lamina bonds [9]. Approximately 90% of *LMNA* mutations seen in FPLD2 are localized to exon 8 [8], which encodes the C-terminal domain of lamin A/C. The most frequent mutation is Arg482Gln [4], resulting in arginine to glutamine replacement within a highly-conserved region across the species [10]. A recent study from 2020 reported that variants Arg482Trp/Gln are responsible for 80% of FPLD2 cases [11].

FPLD2 is characterized by the loss of subcutaneous fat in the extremities and trunk and its accumulation on the neck, submental regions, supraclavicular area and face (“Cushingoid appearance”) [12,13]. The distribution of adipose tissue appears normal at birth and during childhood and becomes apparent at the onset of puberty [12]. The loss of almost all subcutaneous adipose tissue results in a characteristic phenotype of “increased muscularity” in the arms and legs. The specific pattern of phenotypic features is more recognizable in women than in men [12]. Patients with FPLD2 develop a multitude of metabolic complications such as insulin resistance, hypertriglyceridemia, hepatic steatosis and others, as described in Section 3. A less aggressive metabolic profile is reported in affected males [13]. FPLD2 patients commonly develop cardiovascular diseases and myopathies to varying degrees [13]. Cardiomyopathies induced by *LMNA* gene mutations are characterized by a sudden and aggressive clinical course. They can lead to unexpected cardiac death at earlier ages than in other familial cardiomyopathies [14].

2.2. Familial Partial Lipodystrophy Type 3

The molecular basis of FPLD3 is loss-of-function mutations in the *PPARG* gene, which is located on the short arm of chromosome 3 (3p25.2). The *PPARG* gene encodes a member of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subfamily of nuclear receptors. PPAR nuclear receptors have three isoforms (PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ) with different tissue distribution and biological functions. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is a key regulator of adipocyte differentiation, distribution and function [13], mediating in glyceroneogenesis, lipolysis, lipid uptake, synthesis and storage [15]. It is highly expressed in white (WAT) and brown adipose tissue (BAT) [16]. It is suspected that mutated PPAR γ inhibits the adipocyte differentiation taking place during adipogenesis. As a result, the fatty tissue loses its ability to correctly synthesise and store triglycerides to free fatty acids and glycerol from stored triglycerides in postresorptive and starvation states, and biosynthesise and secrete adipokines.

PPARs form heterodimers with retinoid X receptors (RXRs), which regulate transcription of various PPAR-responsive genes. There are no other promoters that can activate autonomously adipogenesis in the absence of *PPARG* [9].

The *PPARG* gene contains nine exons (A1, A2, B, 1, 2, 3, 4, 5 and 6), that may create four PPAR γ mRNA isoforms, as a result of various promoter sites and alternative splicing. Transcripts PPAR γ 1, γ 3 and γ 4 lead to PPAR γ 1 protein synthesis, while transcript PPAR γ 2 encodes the PPAR γ 2 protein. PPAR γ 1 protein is found in most human tissues, while PPAR γ 2 predominantly occurs in adipose tissue [17].

The PPAR γ protein is composed of four functional domains, of which the most essential are DBD (DNA-binding domain) and LBD (ligand-binding domain). The description of each PPAR γ domain is presented in Table 2. The centrally-located DBD domain is highly conserved among species and between nuclear receptors [15], hence DBD mutants demonstrate less efficient DNA binding and can significantly reduce *PPARG* transcriptional activity. Next, LBD is the largest and second most conserved domain among nuclear receptors, after the DNA-binding domain [18]. It enables the binding of large hydrophobic particles, such as polyunsaturated fatty acids (arachidonic acid, linoleic acid, linolenic acid) and their metabolic products [17]. Aberrations within LBD binding pocket can lead to incorrect ligand attachment and therefore inhibit the activation of PPAR γ receptor.

Table 2. The characterisation of *PPARG* domains and their functions.

Structural Domains	Functional Domains	Role	Degree of Conservation
N-terminus A/B	AF-1 Ligand-independent transactivation function 1	Regulates the ligand-independent transcriptional <i>PPARG</i> activity	Poorly conserved
C	DBD DNA-binding domain	Binding PPAR γ to the promoter region of the targeted genes	Highly conserved
D	HINGE flexible hinge region	Involved in interaction with coactivators and corepressors	Poorly conserved
C-terminus E/F	LBD Ligand binding domain AF-2 Ligand-dependent transactivation function 2	Regulates the ligand-dependent transcriptional <i>PPARG</i> activity; Responsible for dimerization with RXR	Highly conserved

The clinical features of type 3 lipodystrophy are similar or sometimes less prominent than those of FPLD2. As noted by Vasandani et al. higher total fat occurs in FPLD2 than FPLD3 patients (26.1% vs. 21.6%) with higher triceps skinfold thickness (11.3 mm vs. 5.8 mm) [19]. FPLD3 patients are more likely to demonstrate loss of subcutaneous fat in the lower limbs and distal upper limbs [13]. Moreover, FPLD3 is characterised by early-onset hypertension, that can discriminate FPLD3 from FPLD2 [7].

3. Metabolic Abnormalities in Lipodystrophy

3.1. Insulin Resistance (IR) and Diabetes Mellitus

The core metabolic feature characterizing basically all lipodystrophy syndromes, is insulin resistance [2]. The presence of insulin resistance induces the development of diabetes, hypertriglyceridemia, polycystic ovary syndrome (PCOS) and non-alcoholic fatty liver disease [20].

The inability to maintain proper fat storage in adipose tissue leads to failure of buffering postprandial lipids. Secreted adipokines induce excessive levels of triglycerides and lipid intermediates in the circulation [21]. Excess triglycerides cannot be stored in adipose tissue, which results in their deposition in ectopic sites, such as liver or skeletal muscles [12]. The lipotoxicity of this mechanism probably induces development of insulin resistance. The severity of IR is broadly proportional to the extent of alteration within adipose tissue [2].

Diabetes mellitus and/or insulin resistance was identified in 51.8% of partial lipodystrophy patients in one study [13]. It has also been found that diabetes mellitus is more likely in FPLD3 than FPLD2 (72% vs. 44%) [19]. Interestingly, women are more likely to be affected than men (above 50% vs. 20%) [6].

One of the cardinal features marking severe IR is **acanthosis nigricans** (AN). The condition is characterized by hyperkeratosis, sometimes with hyperpigmentation, typically most prominent in body flexures [22]. A high insulin level in the bloodstream stimulates keratinocytes and fibroblasts to more potent growth and proliferation, which underlies the process of AN formation [23].

3.2. Hyperlipidemia with Hypertriglyceridemia

Dyslipidemia, which is found in most types of lipodystrophy is characterized by marked hypertriglyceridemia and reduced HDL cholesterol levels. The severity of lipid abnormalities reflects the degree of body fat reduction [24] and is strictly associated with prevalent forms of insulin resistance [22].

Marked hypertriglyceridemia is thought to be the first lipid indicator of ongoing lipodystrophy [25]. It is clear that absence of normal fat distribution disrupts correct lipid homeostasis. The underlying cause of a very high triglyceride level is probably increased VLDL synthesis from the fatty liver and reduced clearance of TG-rich lipoproteins [24]. Therefore, the presence of severe hypertriglyceridemia (>500 mg/dL) nonresponsive to medical therapy, should raise a suspicion of lipodystrophy. Extreme hypertriglyceridemia occurs also in uncontrolled diabetes; however, restoring glycemic control results in regaining body fat [19], which can be part of the differential diagnosis.

The exact pathogenesis of insulin resistance and hyperlipidemia occurring in congenital lipodystrophies is largely unknown [6]. It is estimated that 77.2% of FPLD and 70% of CGL patients display severe hypertriglyceridemia [13,24]. FPLD3 patients are more likely to demonstrate high triglyceride levels than those with FPLD2 (84% vs. 66%) [19]; the condition may be accompanied by a history of pancreatitis directly correlated with moderate to extreme TG levels [26]. The more frequent hypertriglyceridemia observed in FPLD3 patients is accompanied by a higher risk of acute pancreatitis compared to FPLD2 patients (52% vs. 13%) [19]. Interestingly, triglyceride levels are about 2–3 times higher in females than in males among FPLD patients [24]. It has been demonstrated that administration of recombinant human methionyl leptin (meterleptin) results in 60% decrease in triglycerides, with no influence on HDL concentration [25].

The presence of metabolic dyslipidemia (high triglycerides and low HDL cholesterol), as a consequence of ectopic adipose tissue storage, can lead to **non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)**. NAFLD encompasses non-alcoholic simple steatosis (SS), which may progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), then fibrosis and NASH-related cirrhosis [27]. The main components of dyslipidemia and its possible health consequences are presented in Figure 1. The severity of NAFLD may depend on the type of lipodystrophy, but also on the specific mutation in the relevant gene. For example, patients with *PPARG* mutation (FPLD3) present more severe hepatic steatosis than those with *LMNA* mutations (FPLD2) [27].

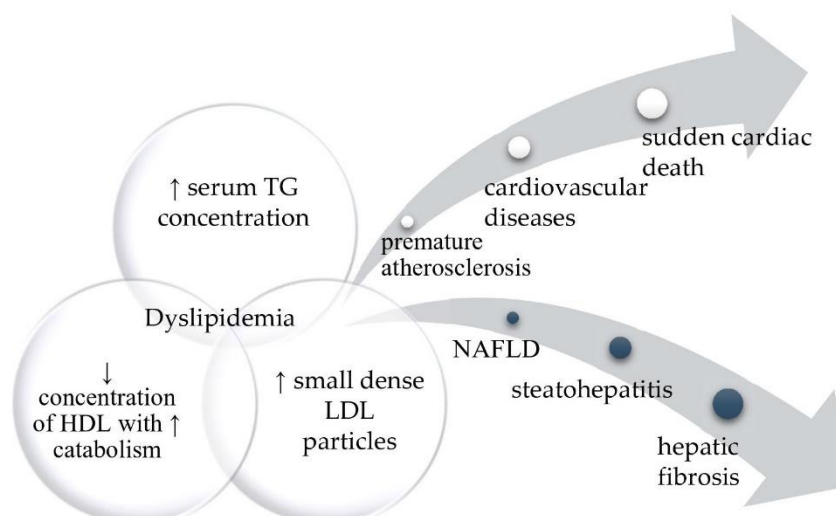


Figure 1. The diagram represents the main components of dyslipidemia and its possible health consequences. If left untreated, it can affect different organs leading to severe cardiovascular disease or various degrees of fatty liver disease.

4. Results

4.1. Clinical Characteristics of Index Patient

The index patient was a 29-year-old woman with characteristic signs of partial lipodystrophy, including fat deposits in the face, neck and trunk, fat loss combined with muscular hypertrophy in the lower extremities and hirsutism. All described features became visible at puberty. At the age of 18, the patient was admitted to hospital with a triglyceride level of 1700 mg/dL and total cholesterol 400 mg/dL. The patient has also provided test results documenting high lipid parameters in her early teenage years. Implemented treatment with Lipanthyl (generic name-fenofibrate) and Roswera (generic name-rosuvastatin) did not bring the expected decrease of lipid levels. Therefore, the patient stopped taking her medication at the age of 20. The oral glucose tolerance test (OGTT; 0'—105 mg/dL, 60'—232 mg/dL, 120'—217 mg/dL) performed during pregnancy revealed diabetes, so high-dose insulin therapy was administered.

At the age of 25, the patient started treatment with 75 µg of L-thyroxine. Further laboratory tests showed persistent mixed dyslipidemia with total cholesterol 299 mg/dL, LDL cholesterol 111 mg/dL, HDL cholesterol 25 mg/dL and TG 870 mg/dL. After discontinuation of the metformin treatment, the OGTT test (0'—93 mg/dL, 60'—222 mg/dL, 120'—181 mg/dL) demonstrated impaired glucose tolerance with biochemical features of high cellular insulin resistance. The Insulin Resistance Index (IRI) was 1.85. The HOMA-IR parameter was 6.43. The Hemoglobin A1c was 36 mmol/mol and 5.43%. A therapy of metformin, pioglitazone and fenofibrate was implemented. Abdominal ultrasonography imaged features of hepatic steatosis.

The family history revealed the same pattern of subcutaneous fat loss and muscular hypertrophy with diabetes and hypertriglyceridemia in the patient's mother. Marked hypertriglyceridemia was identified in the patient's son at the age of three years. His physical appearance is not marked by lipodystrophy so far. The boy is also not receiving any pharmacological treatment. The appropriate treatment will be implemented in accordance with latest recommendation described in detail in the attached citation [28]. The mother's sister died of a heart attack aged 40. She had presented a characteristic lipodystrophy phenotype including fat deposits in the face, neck and trunk and fat loss combined with muscular hypertrophy in the lower extremities. Grandfather died at the age

of 71 with a diagnosis of cancer. No data was available on dyslipidemia or other metabolic abnormalities. Great-grandmother had a distinctive physical appearance suggestive of partial lipodystrophy with muscular legs and arms and an accumulation of subcutaneous fat on her face, trunk and abdomen. She died at the age of ninety.

The index patient, her affected mother and 3-year-old son were referred for genetic testing. Their lipid profiles are presented in Table 3.

Table 3. Serum lipid concentration values of described family members.

	TC [mg/dL]	LDL [mg/dL]	HDL [mg/dL]	TG [mg/dL]
Index case	299	111	25	870
Mother	232 (* 573)	102	54	382 (* 1989)
Son	141	88	28	360

* highest reported value.

4.2. PPARG Mutation

We identified a novel missense heterozygous variant c.443G>A in exon 4 of *PPARG* gene, causing glycine to glutamic acid substitution at amino acid position 148, p.(Gly148Glu). The variant was found in the index patient, her affected mother and son. The variant was not previously reported in the HGMD (Human Gene Mutation Database), ClinVar and LOVD (Leiden Open Variation Database 3.0) with no record in known population genetic databases such as ExAC, gnomAD or 1000 Genomes Project. Based on ACMG–AMP criteria it was assigned to class 4, likely pathogenic.

The mutation is located in the highly conserved DBD domain (Figure 2a) within the first zinc finger motif, a structure involved in DNA binding (Figure 2d). The homology modelling visualised an amino acid substitution (G → E) resulting in the presence of an additional side chain of a substituting amino acid (Figure 2e). The affected region is highly conserved among different species (Figure 2b). To assess mutant protein stability, I-Mutant 2.0 software was used. Predicted protein stability change upon mutation was estimated as decrease with RI = 3 (reliability index).

(a)

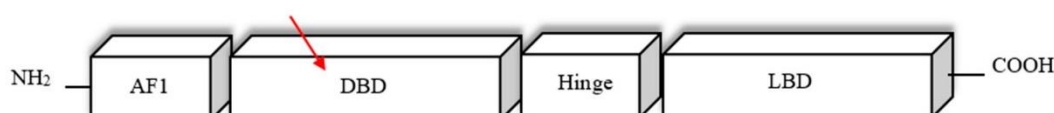


Figure 2. Cont.

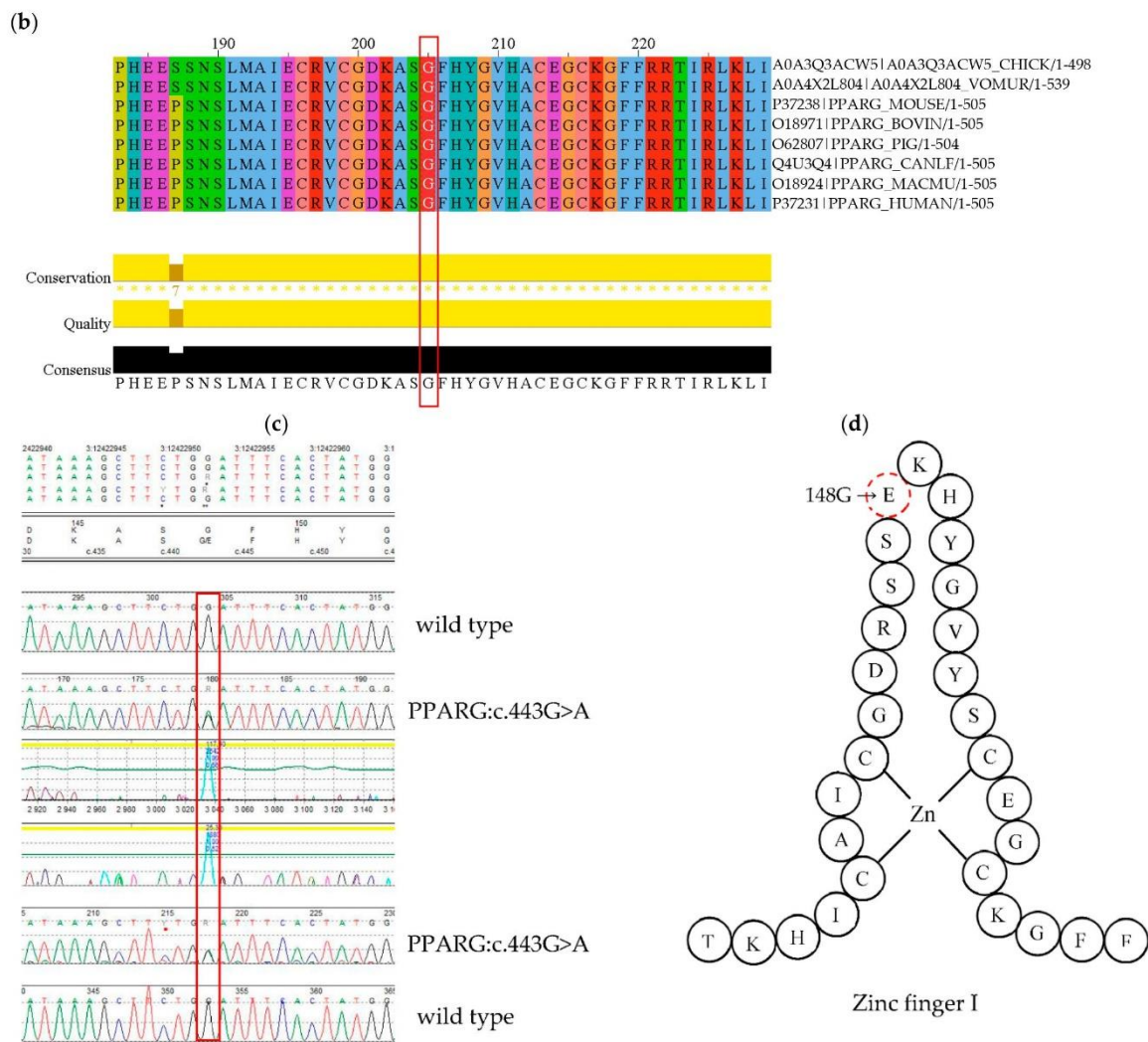


Figure 2. Cont.

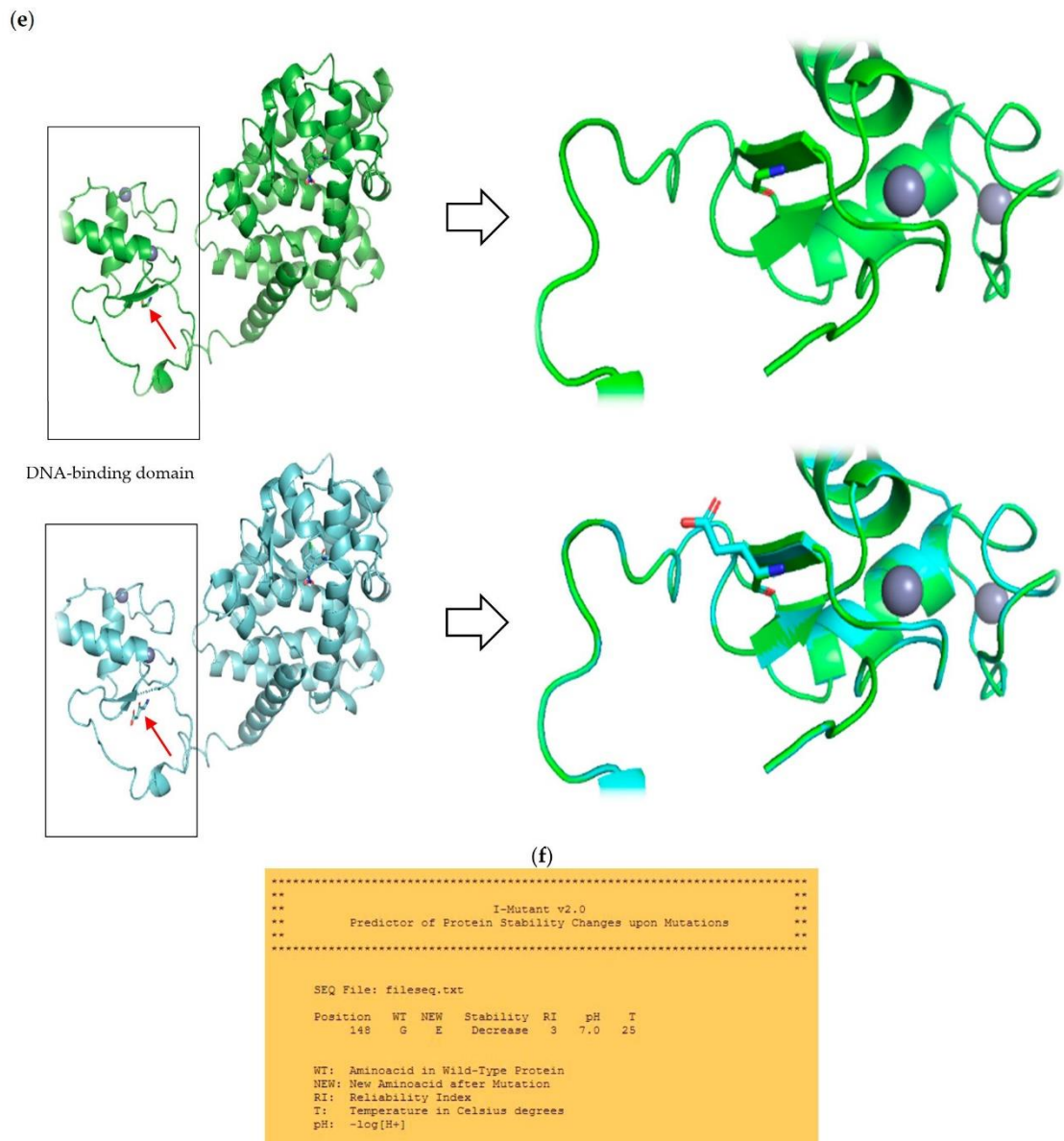


Figure 2. (a) Schematic presentation of PPAR γ domain organization, showing the location of novel G148E mutation. (b) Multiple sequence alignment of the amino acid at position 148 of the PPAR γ protein from various species (CHICK—*Gallus gallus*; VOMUR—*Vombatus ursinus*, MOUSE—*Mus musculus*, BOVIN—*Bos Taurus*, PIG—*Sus scrofa*, CANLF—*Canis lupus familiaris*, MACMU—*Macaca mulatta*, HUMAN—*Homo sapiens*) using Jalview 2.11.0 and Clustal Omega 1.2.4. The conserved glycine amino acid at position 148 is indicated by red frame. (c) Sequence chromatogram showing c.443G>A variant of both forward and reverse strand. (d) Schematic amino acid structure of zinc finger I. Substitution G→E at position 148 is marked in red. (e) The homology model of wild type (i) and mutant (ii) PPAR γ protein. The red arrow indicates the position of amino acid substitution. Homology modelling was conducted using SWISS-MODEL. PPAR γ protein template model was

downloaded from the uniprot.org. Both protein models were compared in PyMOL 2.5.2 software. (f) Result of mutant protein stability assessment conducted by I-Mutant 2.0. Predicted protein stability change upon mutation was estimated as decrease with RI = 3 (reliability index), where 10 being the highest. The tool uses data derived from ProTherm [29].

The presence of the c.443G>A variant was confirmed by Sanger sequencing (Figure 2c). Data was compared to the published *PPARG* gene sequence NM_015869.4. The variant was submitted to ClinVar and assigned the accession number SCV001622778.

5. Discussion

This paper describes the case of a 29-year-old patient harbouring a novel heterozygous *PPARG* mutation c.443G>A, in the DNA-binding domain of the PPAR γ protein. The discovery of the missense variant, resulting in glycine to glutamic acid substitution at position 148 is a new one and broadens the spectrum of disease-causing genetic factors contributing to familial partial lipodystrophy type 3.

The PPAR γ nuclear receptor is activated by a number of coactivators and corepressors that can either stimulate or inhibit its function [30]. It plays a crucial role in lipid and glucose homeostasis, and as such, any disruptions in its functioning can result in the manifestation of metabolic disturbances such as insulin resistance, diabetes mellitus, hypertriglyceridemia or hepatic steatosis.

It is interesting how alterations in separate genes can result in a similar phenotype, as illustrated by the resemblance between the two most common types of congenital lipodystrophy (FPLD2 and FPLD3). It is known that mutations in *PPARG* disrupt the differentiation of adipocytes, while *LMNA* mutations lead to their premature apoptosis. Numerous transcriptional factors regulate lamin and PPAR γ activity. It was found that SREBP1 (sterol regulatory element-binding transcription factor 1) binds to Lamin A, but also activates expression of many genes, including *PPARG*. It is suspected that abnormal amount of prelamin A, as a consequence of *LMNA* mutation, could significantly decrease the pool of active SREBP1, which may also affect *PPARG* expression. However, the precise molecular mechanism of invalid prelamin A/SREBP1 binding remains unclear [11,31]. The overlap between the FPLD2 and FPLD3 phenotypes is certainly associated with its effects on the various stages of adipogenesis. The relationship between *LMNA* and *PPARG* genes remains unclear. In the 29-year-old index patient, the first hallmark of ongoing disease was severe dyslipidemia, with a triglyceride level reaching 1700 mg/dL and total cholesterol of 400 mg/dL. Interestingly, a high triglyceride level (360 mg/dL) was also detected in the proband's son, aged 3 years, which strongly indicated a genetic background of the disease. Hypertriglyceridemia is commonly reported with varying degrees of severity in FPL patients—some present very high TG levels (>500 mg/dL), while others only demonstrate a slight elevation. Most authors propose that the severity of lipid disturbances translates directly into body fat reduction, which is more pronounced in women. Moreover, Lazarte et al. suggest that the risk of severe hypertriglyceridemia and consequent pancreatitis in FPLD2 depends on the co-occurrence of diabetes [32]. Our index patient and her mother also demonstrate severe hypertriglyceridemia with features of high cellular insulin resistance, which supports the findings of other studies. This impaired lipid metabolism in the patient resulted in the development of hepatic steatosis. As the blood test is one of the basic laboratory analyses performed routinely, often these extremely high TG levels are the first sign of fatty tissue disorder. Furthermore, this should be a relevant indication to control possible IR and implement early treatment by the clinician.

The main physical feature characterizing all familial partial lipodystrophies is gradual subcutaneous adipose tissue loss from the extremities, starting at puberty. The other characteristics of specific FPLD subtypes may be poorly expressed or unnoticeable. Physical examination of our index patient revealed atrophy of fat tissue on the upper and lower limbs, waist and chest region with excess fat deposits on the face and neck and hirsutism. In this cases, a diagnosis of partial lipodystrophy was made, with no further phenotypic

categorisation between FPLD2 and FPLD3, which is sometimes troublesome. In general, FPLD3 individuals have less extensive adipose tissue loss, more severe and earlier occurring acanthosis nigricans, hepatic steatosis, PCOS, hirsutism, hypertension, diabetes type 2 and greater biochemical insulin resistance [1]; patients with FPLD3 are more likely to present severe clinical and biochemical disturbances, disproportionate to the lipodystrophy extent compared to FPLD2 [33]. It should be also noted that there is no firm diagnostic criteria for lipodystrophy, because of its rarity and high degree of genetic heterogeneity [34]; as such, it can easily go unrecognized, or be misdiagnosed as developing metabolic syndrome [35]. One of the essential hallmarks of congenital lipodystrophy, distinguishing it from uncontrolled diabetes mellitus or thyrotoxicosis, is the inability to recover a proper fat distribution [34]. Further identification of a specific lipodystrophy subtype requires genetic testing.

Molecular diagnosis of FPLD can be based on a single or panel gene sequencing, or even more comprehensive technology like whole-exome sequencing (WES) or whole-genome sequencing (WGS). Considering that the genetic background of congenital lipodystrophies are known only to a small extent, the use of high-throughput technologies seems to be justified. In the present study, exon sequencing of the *LMNA* and *PPARG* genes was performed simultaneously based on a custom NGS panel. The conducted analysis revealed no pathogenic variants within the *LMNA* gene; however the missense heterozygous variant c.443G>A was noted in exon 4 of *PPARG*. The detected mutation results in a glycine to glutamic acid substitution at position 148 (p.Gly148Glu; G148E). Sanger sequencing confirmed the presence of the same variant in the proband's son and symptomatic mother.

The substitution results in the formation of an additional side chain ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$) within the DNA-binding domain of $\text{PPAR}\gamma$, which is highly conserved among other receptors and species. Figure 2b presents the conducted multiple sequence alignment. Combined computational analysis based on 15 predictor tools (BayesDel_addAF, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM, LIST-S2, LRT, M-CAP, MVP, MutPred, MutationAssessor, MutationTaster, PolyPhen2, PROVEAN, PrimateAI and SIFT) on Varsome (<https://varsome.com>) classified the above variant as pathogenic, with no benign predictions from any of them. Mutant protein stability estimated by I-Mutant 2.0 software was defined as decreased. The detected aberration cosegregates with FPLD phenotype in the proband's family.

Cases of DNA-binding domain mutations and their unequivocal effect on $\text{PPAR}\gamma$ receptor effectiveness have been described in the literature. For example, heterozygous *PPARG* mutations (C114R, C131Y, C162W) located within DBD, inhibit wild-type receptor activity by a dominant negative mechanism [36]. In turn, Visser et al. showed that pathogenic Y151C displayed impaired DNA-binding capacity and hence reduced transcriptional activity compared with wild type $\text{PPAR}\gamma$ [37]. Ludtke et al. demonstrated that a receptor with a novel C190S variant has significantly lower ability to activate the reporter gene compared to wild-type protein, without any observations of dominant negative effects [38]. Based on the available data, it is reasonable to assume that G148E plays an important role due to crucial localization within the DNA-binding domain; its presence can potentially lead to invalid receptor attachment and decreased *PPARG* transcriptional activity.

To the best of our knowledge this is the first time that the c.443G>A, p.(Gly148Glu) variant has been reported. The presented computational analysis, variant cosegregation and literature review support our hypothesis about the pathogenicity of G148E. However, functional testing is needed to confirm the pathogenicity of this variant.

6. Materials and Methods

Due to a clinical suspicion of lipodystrophy the patient was referred to the Department of Genetics. Genomic DNA was automatically extracted from peripheral blood lymphocytes using MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan), according to the manufacturer's instructions. Quantitative and qualitative assessment of extracted DNA was performed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sample sequencing was performed on MiniSeq sequencer

(Illumina, San Diego, CA, USA), with the use of custom designed lipid NGS panel covering all exons and the exon-intron boundaries of 21 genes (*ABCA1, ABCG5, ABCG8, APOA5, APOB, APOC2, APOE, CYP7A1, GPIHBP1, LCAT, LDLR, LDLRAP1, LIPA, LMF1, LMNA, LPL, PCSK9, PPARG, SCAP, SREBF2, STAP1*), including the *LMNA* and *PPARG* gene. Probes for the targeted regions were designed using Illumina Design Studio (2× 150 base pair read length in paired-end mode). Libraries were prepared using TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit according to the manufacturer's protocol (Illumina). The PhiX library was combined with a prepared library and used as a sequencing control. Identification, annotation and classification of disease-relevant variants was conducted by Variant Studio 3.0 (Illumina). The presence of identified c.443G>A variant was confirmed by bidirectional Sanger sequencing on 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). DNA Variants Analysis was performed using Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, State College, PA, USA). No pathogenic variants were found in other genes.

Informed consent was obtained from all participants or their legal guardian. The study was approved by the ethics committee of the Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute (No. 15/2016 from 12 January 2016).

7. Conclusions

Our presented literature review illustrates the genetic heterogeneity of congenital lipodystrophies and their wide spectrum of severe metabolic complications. Due to the overlapping clinical symptoms they can be easily misdiagnosed as early onset insulin resistant diabetes mellitus, persistent hypertriglyceridemia, hepatic steatosis, PCOS or hepatosplenomegaly. Description of a new cases is highly needed both in terms of understanding the disease pathology from clinical point, but also increasing the awareness of rare diseases, such as congenital lipodystrophy syndromes. Apart from the relevant role of an experienced clinician, a significant contribution of genetic diagnosis cannot be omitted. Searching for new genetic backgrounds brings us closer to better understanding the origin of metabolic consequences, therefore improving the diagnostic and treatment pathways. Further analyses of known and candidate genes implicated in familial partial lipodystrophy are highly needed.

Author Contributions: Conceptualization, A.G. and L.R.; methodology, A.G. and L.R.; software, D.S.; validation, D.S. and L.R.; formal analysis, L.R.; investigation, A.G.; resources, A.G., K.L. and A.L.; data curation, D.S. and L.R.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, A.G. and L.R.; visualization, A.G. and L.R.; supervision, A.G.; project administration, L.R.; funding acquisition, A.G. and L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, grant number 2016/X/9-SZB.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute (opinion number 15/2016, date of approval 12 January 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient to publish this paper.

Data Availability Statement: The data of novel variant that we describe in the manuscript was submitted to ClinVar database with the accession number SCV001622778.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bagias, C.; Xiarchou, A.; Bargiota, A.; Tigas, S. Familial Partial Lipodystrophy (FPLD): Recent Insights. *Diabetes Metab. Syndr. Obesity Targets Ther.* **2020**, *13*, 1531–1544. [\[CrossRef\]](#)
2. Mann, J.P.; Savage, D.B. What lipodystrophies teach us about the metabolic syndrome. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 4009–4021. [\[CrossRef\]](#)
3. Gonzaga-Jauregui, C.; Ge, W.; Staples, J.; Van Hout, C.; Yadav, A.; Colonie, R.; Leader, J.B.; Kirchner, H.L.; Murray, M.F.; Reid, J.G.; et al. Clinical and Molecular Prevalence of Lipodystrophy in an Unascertained Large Clinical Care Cohort. *Diabetes* **2019**, *69*, 249–258. [\[CrossRef\]](#)
4. Lightbourne, M.; Brown, R.J. Genetics of Lipodystrophy. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2017**, *46*, 539–554. [\[CrossRef\]](#)
5. Broekema, M.; Savage, D.; Monajemi, H.; Kalkhoven, E. Gene-gene and gene-environment interactions in lipodystrophy: Lessons learned from natural PPAR γ mutants. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 715–732. [\[CrossRef\]](#)
6. Knebel, B.; Müller-Wieland, D.; Kotzka, J. Lipodystrophies—Disorders of the Fatty Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8778. [\[CrossRef\]](#)
7. Savage, D.B. Mouse models of inherited lipodystrophy. *Dis. Model Mech.* **2009**, *2*, 554–562. [\[CrossRef\]](#)
8. Wojtanik, K.M.; Edgemon, K.; Viswanadha, S.; Lindsey, B.; Haluzik, M.; Chen, W.; Poy, G.; Reitman, M.; Londos, C. The role of LMNA in adipose: A novel mouse model of lipodystrophy based on the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy mutation. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 1068–1079. [\[CrossRef\]](#)
9. Nolis, T. Exploring the pathophysiology behind the more common genetic and acquired lipodystrophies. *J. Hum. Genet.* **2013**, *59*, 16–23. [\[CrossRef\]](#)
10. Cao, H. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 109–112. [\[CrossRef\]](#)
11. Varlet, A.-A.; Helfer, E.; Badens, C. Molecular and Mechanobiological Pathways Related to the Physiopathology of FPLD2. *Cells* **2020**, *9*, 1947. [\[CrossRef\]](#)
12. Garg, A.; Misra, A. Lipodystrophies: Rare disorders causing metabolic syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2004**, *33*, 305–331. [\[CrossRef\]](#)
13. Foss-Freitas, M.C.; Akinci, B.; Luo, Y.; Stratton, A.; Oral, E.A. Diagnostic strategies and clinical management of lipodystrophy. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **2020**, *15*, 95–114. [\[CrossRef\]](#)
14. Gerbino, A.; Procino, G.; Svelto, M.; Carmosino, M. Role of Lamin A/C Gene Mutations in the Signaling Defects Leading to Cardiomyopathies. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1356. [\[CrossRef\]](#)
15. Jenning, E.H.; Gurnell, M.; Kalkhoven, E. Functional implications of genetic variation in human PPAR γ . *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 380–387. [\[CrossRef\]](#)
16. Pap, A.; Cuaranta-Monroy, I.; Peloquin, M.; Nagy, L. Is the Mouse a Good Model of Human PPAR γ -Related Metabolic Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1236. [\[CrossRef\]](#)
17. Sokółowska, M.; Kowalski, M.L.; Pawliczak, R. Peroxisome proliferator-activated receptors- γ (PPAR- γ) and their role in immunoregulation and inflammation control. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **2005**, *3*, 472–484.
18. Kroker, A.J.; Bruning, J.B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. *PPAR Res.* **2015**, *2015*, 816856. [\[CrossRef\]](#)
19. Vasandani, C.; Li, X.; Sekizkardes, H.; Brown, R.; Garg, A. SUN-LB111 Comparison of Phenotype and Metabolic Abnormalities Among Familial Partial Lipodystrophy Due to LMNA or PPARG Variants. *J. Endocr. Soc.* **2020**, *4*. [\[CrossRef\]](#)
20. Brown, R.J.; Araujo-Vilar, D.; Cheung, P.T.; Dunger, P.D.; Garg, A.; Jack, M.; Mungai, L.; Oral, E.A.; Patni, N.; Rother, K.I.; et al. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 4500–4511. [\[CrossRef\]](#)
21. Akinci, B.; Sahinoz, M.; Oral, E. Lipodystrophy Syndromes: Presentation and Treatment. In *Endotext*; MDText.com, Inc.: South Dartmouth, MA, USA, 2000.
22. Stears, A.; Hames, C. Diagnosis and management of lipodystrophy: A practical update. *Clin. Lipidol.* **2014**, *9*, 235–259. [\[CrossRef\]](#)
23. Phishe, M.M. An approach to acanthosis nigricans. *Indian Dermatol. Online J.* **2014**, *5*, 239–249. [\[CrossRef\]](#)
24. Simha, V.; Garg, A. Inherited lipodystrophies and hypertriglyceridemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **2009**, *20*, 300–308. [\[CrossRef\]](#)
25. Joseph, J.; Shamburek, R.D.; Cochran, E.K.; Gorden, P.; Brown, R.J. Lipid Regulation in Lipodystrophy versus the Obesity-Associated Metabolic Syndrome: The Dissociation of HDL-C and Triglycerides. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E1676–E1680. [\[CrossRef\]](#)
26. Semple, R.K.; Savage, D.B.; Cochran, E.K.; Gorden, P.; O'Rahilly, S. Genetic Syndromes of Severe Insulin Resistance. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 498–514. [\[CrossRef\]](#)
27. Polyzos, S.A.; Perakakis, N.; Mantzoros, C.S. Fatty liver in lipodystrophy: A review with a focus on therapeutic perspectives of adiponectin and/or leptin replacement. *Metabolism* **2019**, *96*, 66–82. [\[CrossRef\]](#)
28. Ozen, S.; Akinci, B.; Oral, E.A. Current Diagnosis, Treatment and Clinical Challenges in the Management of Lipodystrophy Syndromes in Children and Young People. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **2020**, *12*, 17–28. [\[CrossRef\]](#)
29. Arshad, M.; Bhatti, A.; John, P. Identification and in silico analysis of functional SNPs of human TAGAP protein: A comprehensive study. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0188143. [\[CrossRef\]](#)

30. Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications—A review. *Nutr. J.* **2014**, *13*, 17. [\[CrossRef\]](#)
31. Peng, Y.; Tang, Q.; Xiao, F.; Fu, N. Regulation of Lipid Metabolism by Lamin in Mutation-Related Diseases. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 820857. [\[CrossRef\]](#)
32. Lazarte, J.; Wang, J.; McIntyre, A.D.; Hegele, R.A. Prevalence of severe hypertriglyceridemia and pancreatitis in familial partial lipodystrophy type 2. *J. Clin. Lipidol.* **2021**, *15*, 653–657. [\[CrossRef\]](#)
33. Hegele, R.A.; Joy, T.R.; Al-Attar, S.A.; Rutt, B.K. Thematic review series: Adipocyte Biology. Lipodystrophies: Windows on adipose biology and metabolism. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1433–1444. [\[CrossRef\]](#)
34. Araújo-Vilar, D.; Santini, F. Diagnosis and treatment of lipodystrophy: A step-by-step approach. *J. Endocrinol. Investig.* **2019**, *42*, 61–73. [\[CrossRef\]](#)
35. Cortes, V.A.; Fernández-Galilea, M. Lipodystrophies: Adipose tissue disorders with severe metabolic implications. *J. Physiol. Biochem.* **2015**, *71*, 471–478. [\[CrossRef\]](#)
36. Agostini, M.; Schoenmakers, E.; Mitchell, C.; Szatmari, I.; Savage, D.; Smith, A.; Rajanayagam, O.; Semple, R.; Luan, J.; Bath, L.; et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPAR γ mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 303–311. [\[CrossRef\]](#)
37. Visser, M.E.; Kropman, E.; Kranendonk, M.E.; Koppen, A.; Hamers, N.; Stoes, E.S.; Kalkhoven, E.; Monajemi, H. Characterisation of non-obese diabetic patients with marked insulin resistance identifies a novel familial partial lipodystrophy-associated PPAR γ mutation (Y151C). *Diabetologia* **2011**, *54*, 1639–1644. [\[CrossRef\]](#)
38. Lüdtke, A.; Buettner, J.; Wu, W.; Muchir, A.; Schroeter, A.; Zinn-Justin, S.; Spuler, S.; Schmidt, H.H.-J.; Worman, H.J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ C190S Mutation Causes Partial Lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 2248–2255. [\[CrossRef\]](#)

12. Zgoda Komisji Bioetycznej.

Komisja Bioetyczna
przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki
93-338 Łódź, Rzgowska 281/289 tel. (42) 2711401
e-mail sek45@iczm.edu.pl

Łódź, 12 stycznia 2016 r.

Dr n. med. Agnieszka Gach
Zakład Genetyki
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki działając zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej na posiedzeniu w dniu 12 stycznia 2016 r. rozpatrywała wniosek dotyczący pracy:

„Genetyczne uwarunkowania dyslipidemii pierwotnej”

Opinia Nr 15/2016

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki zapoznała się z ww projektem eksperymentu medycznego, przeanalizowała wniosek, wysłuchała opinii recenzenta o przedstawionym projekcie i wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania, po rozważeniu kryteriów etycznych oraz celowości i wykonalności projektu pozytywnie zaopiniowała projekt eksperymentu medycznego.

Uchwałę podjęto jednogłośnie. _____
Uchwałę podjęto przy sprzeciwie _____

Przewodnicząca:

Dr hab. med. Iwona Maroszyńska, prof. ICZMP

Zastępca Przewodniczącej:

Prof. dr hab. n. farm. Daria Orszulak-Michalak 

Członkowie:

Mec. Michał Araszkiewicz

Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Biegański

Dr n. med. Paweł Czekalski

Mgr Grażyna Korybut

Prof. dr hab. med. Jerzy Niedzielski

Prof. dr hab. med. Jacek Rysz

Prof. dr hab. med. Krzysztof Szaflik

Dr n. filozofii Wojciech Sztombka

Prof. dr n. med. Krzysztof Szyłło

Ks. dr hab. Jan Wolski

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman 