

ORIGINAL

Análisis funcional de mutaciones en el promotor del *LDLR* y su relación con la hipercolesterolemia familiar

Isabel de Castro-Orós^{a,b,*}, Alfonso Bolado-Carrancio^c, Sandra Pampín^c, Lourdes Palacios^d, Nuria Plana^e, Aguirre de Cubas^a, Esperanza Martorell^f, José Puzo^g, Marianne Stef^d, Luis Masana^e, Fernando Civeira^{b,h}, José Carlos Rodríguez-Rey^c y Miguel Pocoví^{a,i}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza, España

^b RECAVA, Instituto de Salud Carlos III, Zaragoza, España

^c Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria e Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander, España

^d Progenika Biopharma, S.A., Derio, Vizcaya, España

^e Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme (CIBERDEM), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

^f Hospital Comarcal de Inca, Islas Baleares, España

^g Departamento de Bioquímica, Hospital San Jorge, Huesca, España

^h Unidad de Lipidos y Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza, España

ⁱ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Zaragoza, España

Recibido el 1 de diciembre de 2010; aceptado el 20 de febrero de 2011

Disponible en Internet el 18 de mayo de 2011

PALABRAS CLAVE

LDLR;
Mutación;
Hipercolesterolemia
familiar;
Región promotora;
Genes reporteros

Resumen

Introducción: La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad autosómica dominante, causada principalmente por mutaciones en la región codificante del gen del receptor de las LDL (*LDLR*). Sin embargo, varias mutaciones situadas en el promotor de *LDLR* se han asociado con la HF. La búsqueda de mutaciones en sujetos clínicamente diagnosticados como HF reveló la presencia en la zona promotora de *LDLR* de 4 mutaciones nuevas en heterocigosis.

Objetivo: Estudiar la funcionalidad de las 4 mutaciones nuevas en el promotor del *LDLR* (c.-36T>G, c.-136C>G, c.-140C>G y c.-208A>T) encontradas en España mediante el uso de la plataforma LIPOchip® en pacientes con sospecha clínica de HF.

Métodos: Se realizó el análisis funcional de las mutaciones mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) y transfección de promotores mutados con el gen reportero de la luciferasa en cultivos celulares de HepG2.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: idecastro.iacs@aragon.es (I. de Castro-Orós).

Resultados: Las mutaciones c.-136G y c.-140G localizadas en el elemento regulador R3 mostraron un cambio significativo en el patrón de afinidad por las proteínas nucleares en los EMSA. Además, estas mutaciones produjeron una reducción de la actividad del promotor *LDLR* del 88-93%. Las mutaciones c.-36G y c.-208T no provocaron cambios significativos ni en los experimentos EMSA ni con genes reporteros.

Conclusiones: Las mutaciones localizadas en el elemento R3 se asocian con HF, mientras que las que se encuentran fuera de los elementos reguladores del promotor de *LDLR* no son causa directa de hipercolesterolemia. Nuestros resultados revelan la importancia de realizar análisis de funcionalidad de las variantes encontradas en la región promotora de *LDLR* con objeto de conocer su implicación con el fenotipo HF.

© 2010 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

LDLR;
Mutations;
Familial hypercholesterolemia;
Promoter region;
Reporter genes

Functional analysis of *LDLR* promoter mutations and their relationship with familial hypercholesterolemia

Abstract

Introduction: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder mainly caused by mutations in the coding region of the *LDLR* gene. However, a variety of mutations within the *LDLR* promoter have been associated with FH. Genetic screening in persons clinically diagnosed with HF revealed the presence of four new heterozygous mutations within the promoter region.

Objective: To study the functionality of the four new *LDLR* promoter mutations (c.-36T>G, c.-136C>G, c.-140C>G and c.-208A>T) found in Spain, using the LIPOchip® platform in patients with clinically suspected FH.

Methods: The functional analysis of mutations was carried out by using electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and luciferase reporter gene expression in HepG2 transfected cells with the mutated promoters.

Results: Two mutations, c.-136G and c.-140, located within the R3 regulatory element, showed a significant change in the pattern of nuclear binding protein affinity. Moreover, these mutations reduced the residual activity of the *LDLR* promoter by 88-93%. However, mutations c.-36G and c.-208T, located outside the response elements, produced no significant changes in EMSA experiments or reporter genes.

Conclusions: Mutations within the R3 element are associated with FH, while those located outside the regulatory elements of the *LDLR* promoter are not a direct cause of FH. Our results reveal the importance of functional analysis of the new variants in the *LDLR* promoter region to identify their role in the FH phenotype.

© 2010 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por concentraciones muy elevadas de colesterol LDL (cLDL), xantomas tendinosos (XT) y riesgo elevado de padecer enfermedad coronaria prematura¹. La HF fue descrita por primera vez por Müller en 1938², pero no es hasta mediados de los años setenta cuando Brown y Goldstein encontraron en el receptor de las LDL (rLDL) la causa de la enfermedad, y actualmente se conocen más de 1.000 mutaciones en el gen que codifica para el rLDL (*LDLR*) asociadas con HF (<http://www.ucl.ac.uk/fh>, <http://www.umd.necker.fr>)^{3,4}. Posteriormente se han descrito mutaciones en el gen que codifica para la apolipoproteína B (*APOB*), ligando natural del rLDL⁵, y en *PCSK9*, que producen un fenotipo similar⁶. La mayoría de las mutaciones descritas en las bases de datos se concentran en la región codificante del gen *LDLR*; sin embargo, últimamente se han identificado varias mutaciones en los elementos reguladores del promotor de *LDLR* y en sitios de ayuste⁷.

La síntesis proteica de rLDL está regulada de manera muy sofisticada por un mecanismo de retroalimentación que controla la transcripción del gen *LDLR* en respuesta a variaciones intracelulares de la concentración de esterolos y la demanda celular de colesterol^{8,9}. Los elementos esenciales para la regulación transcripcional del *LDLR* se localizan a lo largo de 280 pb en el promotor, partiendo del sitio de inicio de transcripción. Esta región contiene todos los elementos para la expresión basal y la regulación por esterolos, incluyendo 3 repeticiones directas imperfectas de 16 pb cada una (R1, R2 y R3). Las regiones R1 y R3 contienen sitios de unión para el factor de transcripción Sp1⁸ y contribuyen a la expresión basal que requiere la contribución de R2 para la sobreexpresión del gen¹⁰. La repetición 2 contiene un elemento de regulación por esterolos (SRE) que incrementa la transcripción cuando la concentración intracelular de esterolos es baja, al ser reconocido por el factor de transcripción SREBP-1¹¹. Entre las posiciones -110 a -94 de la región 5'UTR, y solapándose con las secuencias de la caja TATA-like, se reconoció un elemento *cis* independiente de la regulación por esterolos, denominado SIRE¹². Además de estos

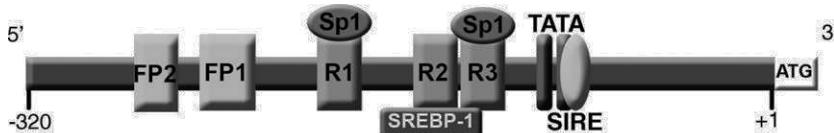


Figura 1 Representación gráfica de la región promotora y 5'UTR del gen *LDLR*. El nucleótido A del ATG es considerado como la posición +1. Entre las posiciones -94 y -110 se encuentra el elemento de regulación independiente de los esteroles (SIRE). Las dos cajas TATA se sitúan entre las posiciones -101 y -116. Las repeticiones 1 y 3 (R1 y R3) localizadas entre las posiciones -188 a -196 y -130 a -145, respectivamente, son elementos de unión a Sp1 y contribuyen a la expresión basal del gen, y colaboran en la regulación mediada por esteroles. La repetición 2 (R2) se localiza entre las posiciones -146 a -161 y contiene el sitio de unión del factor de transcripción SREBP-1 regulado por la concentración de esteroles. Entre las posiciones -218 a -238 y -268 a -280 se encuentran los elementos de regulación FP1 y FP2.

elementos, se han descrito dos más, FP1 y FP2, localizados entre las posiciones -281 y -269, que contienen elementos esenciales para la inducción máxima de la transcripción (fig. 1)¹³. Recientemente se ha identificado un nuevo elemento rico en CT que se encuentra en la secuencia R3 e interactúa con el transactivador hnRNP K, una ribonucleoproteína nuclear que reconoce el elemento en la cadena sencilla y activa la transcripción del gen *LDLR*¹⁴.

Actualmente hay registradas varias mutaciones que se localizan en la región promotora del gen *LDLR* y que afectan a la función del rLDL. Se han descrito mutaciones en R2 (c.-153C>T)¹⁵ en el sitio de reconocimiento del factor de transcripción Sp1 en la secuencia R3 (c.-142C>T, c.-138T>C, c.-138deltaT, c.-137C>T, c.-136C>G)¹⁶⁻²⁰ y en la región próxima a la caja TATA (c.-120C>T)¹⁵ que se asocian con el fenotipo HF. Incluso se ha demostrado que las mutaciones descritas en los elementos reguladores FP1 y FP2 provocan una alteración en la actividad transcripcional de *LDLR*²¹.

El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis funcional de 4 mutaciones nuevas en el promotor del *LDLR* encontradas en España mediante el uso de la plataforma LIPOchip® en pacientes con sospecha clínica de HF²².

Material y métodos

Detección de mutaciones

Los sujetos considerados como probandos para este estudio fueron diagnosticados clínicamente según los criterios MedPed, considerándose aquellos con diagnóstico definitivo de HF (individuos cuya puntuación fuera mayor de 8) o probable (puntuación entre 6-8)²³. Partiendo de muestras de sangre periférica se extrajo el ADN mediante el producto QiAmp Blood DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante y posteriormente analizado con la plataforma LIPOchip® (Progenika Biopharma, Bilbao, España)²². Para aquellos sujetos en los que no se identificó la mutación mediante el método de microarray, se secuenciaron tanto el promotor, como los exones y las regiones de unión exón-intrón del *LDLR*.

Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Para la realización de los ensayos de retardo de la movilidad electroforética se diseñaron los siguientes

oligonucleótidos de doble cadena marcados durante la síntesis con IRDye700 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE): GCAGGTCGTGA(T/G)CCGGGTCGG (para c.-36T>G), CAAACTCTTC(C/G)CCCTGCTAG (c.-136C>G), CACTGCAAAC(C/G)CTCCCCCTGC (c.-140C>G) y CCGATGT-CAC(A/T)TCGGCCGTT (c.-208A>T). La obtención de los extractos nucleares y el procedimiento de la electroforesis se han descrito en trabajos anteriores²⁴. El análisis y la cuantificación de los EMSA se realizaron con el Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska).

Construcciones de plásmidos con el promotor del gen *LDLR* y el gen reportero luciferasa

Los constructos fueron diseñados en 2 tipos diferentes de vectores GENEART (Geneart AG, Alemania) resistentes a la ampicilina. Para el constructo que contiene la secuencia salvaje y los constructos portadores de las mutaciones c.-120T, c.-135G, c.-136G y c.-208T, partiendo de los vectores GENEART, se amplificó un fragmento de 271 pb del promotor de *LDLR*, desde la posición -319 a -64, usando los cebadores siguientes: 5'-CTGAGCTCCAGCTCTTCACGGAGACC-3' y 5'-CTGCTAGCCCTGCTGTGCTAGCTGGAAA-3'. Para las mutaciones c.-36G y c.-140G, así como para la secuencia salvaje, se amplificó un fragmento de 325 pb del promotor, desde la posición -319 a -1 usando el cebador directo anteriormente descrito y el reverso: 5'-GCTAGCGCTCGCAGCTCTG-3'. Estos oligonucleótidos introducen la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción SacI y NheI (subrayado) en los extremos 5' y 3', respectivamente, del producto resultante. Se purificó el producto de PCR mediante el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc, Chatworth, California). El plásmido purificado fue digerido con las enzimas de restricción anteriormente nombradas y subclonado en el vector pGL3-Basic (Promega Madison, Wisconsin) que contiene el gen reportero de la luciferasa y carece de promotor²⁴. Se verificó la presencia de las variantes adecuadas y ausencia de otras mutaciones introducidas por PCR mediante secuenciación del plásmido resultante.

Cultivos celulares

Se cultivaron células HepG2 en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 10% de suero

fetal bovino (SFB). Para los experimentos de transfección, se sembraron células HepG2 con densidad de 1×10^6 células/pocillo de una placa de 12 pocillos y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia en 1 ml de DMEM con y sin SFB, en dependencia del experimento. Dichas células fueron transfectadas mediante Lipofectamine 200TM (Invitrogen, Carlsbad, California) con 1,6 μ g del constructo reportero de pGL3-BASIC y 0,05 μ g de pRL-TK para normalizar los experimentos, según las instrucciones del fabricante. Tras 36 h, se lisaron las células y se realizaron los experimentos para medir la actividad de luciferasa usando el producto Dual-Luciferase[®] Reporter Assay (Promega, Madison, Wisconsin). Los resultados obtenidos fueron integrados y analizados mediante el programa informático WinGlow v.124 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Alemania). Se normalizaron los datos respecto a la actividad específica de Renilla. Cada experimento fue realizado por triplicado.

Resultados

Detección de mutaciones

Tras el análisis llevado a cabo por la plataforma LIPOchip[®] (Progenika Biopharma, Bilbao, España) en individuos con un diagnóstico probable o definitivo de FH, según los criterios MedPed²³, se identificaron 6 sujetos que carecían de mutaciones frecuentes detectadas por el chip, pero, tras la secuenciación de las regiones codificadoras, las uniones exón-intrón, así como el promotor, presentaron mutaciones en heterocigosis en la región promotora. Dos de las variantes encontradas en esta población, c.-120C>T y c.-135C>G, ya habían sido descritas y analizadas funcionalmente por otros estudios^{15,18}.

Considerando las 4 mutaciones nuevas, 2 de ellas se localizaban en la zona de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1, dentro de R3: c.-136C>G y c.-140C>G⁸. Las restantes variantes no se encontraban dentro de los elementos reguladores.

Estudio funcional de las mutaciones

Con objeto de analizar la implicación de las nuevas mutaciones en la funcionalidad del promotor del gen *LDLR*, realizamos ensayos de retardo de la movilidad electroforética. Como se observa en la figura 2 (B y C), las mutaciones de R3, c.-136G y c.-140G, produjeron una reducción en la afinidad de los oligonucleótidos por las proteínas nucleares, así como una reducción del 88 y 93%, respectivamente, en la actividad luciferasa analizada mediante los constructos mutantes del promotor de *LDLR* en plásmidos pGL3 (tabla 1). Sin embargo en los EMSA y la actividad transcripcional de *LDLR* que se encontraban fuera de las regiones descritas como reguladoras correspondientes a las variantes c.-36G y c.-208T no mostraron cambios significativos (fig. 2 A y D).

Las mutaciones c.-120C>T y c.-135C>G habían sido previamente analizadas por Francova et al¹⁵ y Hobbs et al¹⁸, respectivamente. Para comprobar la metodología de los ensayos de funcionalidad utilizados en este trabajo, se volvieron a analizar, y tal y como se esperaba mostraron una

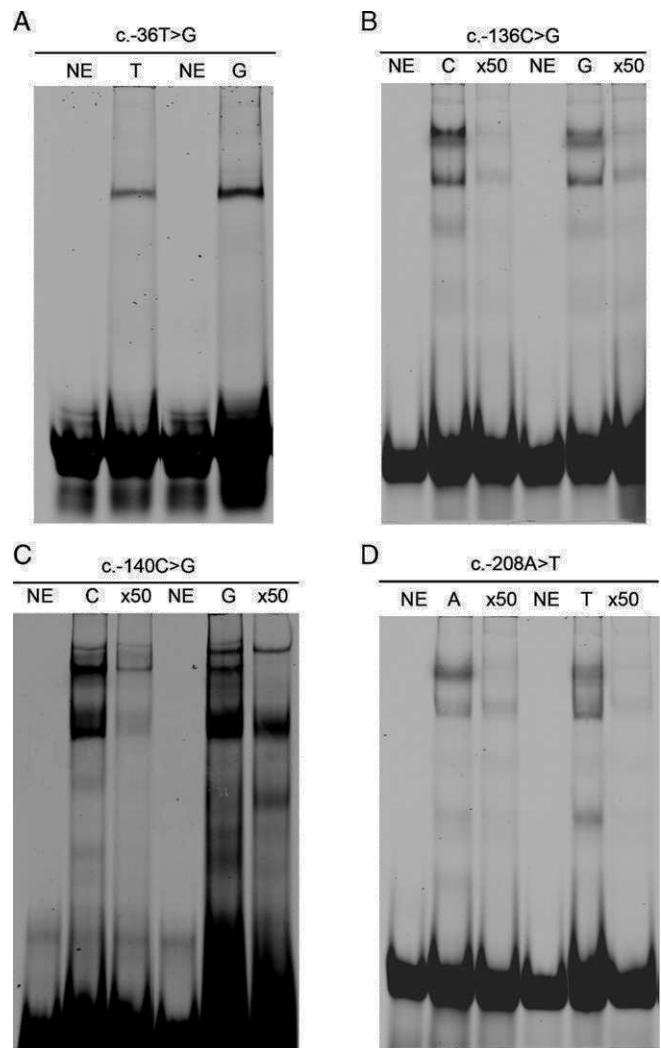


Figura 2 A y D) Efecto de las mutaciones c.- 36T>G y c.-208A>T sobre las propiedades de unión a proteínas de fragmentos de ADN. Se mezclaron 0,5 μ l de oligonucleótidos (10 μ M) marcados con un fluoróforo, con 20 μ g de extracto nuclear. La mutación analizada se indica en la parte superior de cada panel. Carriles: NE indica que el experimento se ha llevado a cabo en ausencia de extracto nuclear. T, G o A indican la identidad del alelo. x50 indica el exceso de oligonucléotido marcado que ha sido añadido a la mezcla antes de la reacción de unión. B y C) Efecto de las mutaciones c.-136C>G y c.-140C>G sobre las propiedades de unión a proteínas de fragmentos de ADN. La mutación analizada se indica en la parte superior de cada panel. Carriles: NE indica que el experimento se ha llevado a cabo en ausencia de extracto nuclear. C, G, T o A indican la identidad del alelo. x50 indica el exceso de oligonucléotido marcado que ha sido añadido a la mezcla antes de la reacción de unión.

reducción de la actividad del promotor del 48% ($p < 0,001$) y el 89% ($p < 0,0001$), respectivamente (tabla 1).

Discusión

En este trabajo analizamos 4 mutaciones en el *LDLR* no descritas previamente, y dos de ellas se localizaron en la principal región de regulación⁸. La mayoría de las

Tabla 1 Valores en porcentaje de la actividad luciférica relativa de los promotores mutantes de *LDLR*

Mutación	% Actividad luciférica relativa mutante vs. salvaje	p
c.-36T>G	128 ± 73,9	0,387
c.-120C>T ^a	52 ± 15,8	<0,001*
c.-135C>G ^b	11 ± 5,3	<0,0001*
c.-136C>G	12 ± 10,9	<0,0001*
c.-140C>G	7 ± 2,6	<0,0001*
c.-208A>T	84 ± 40,2	0,116

Valores de la actividad luciférica relativa expresados como media de los porcentajes obtenidos en tres experimentos individuales desarrollados por triplicado.

* Valor de p estadísticamente significativo calculado mediante la T de Student. ^ac.-120C>T fue descrito previamente por Francova et al¹⁵; ^bc.-135C>G fue descrito previamente por Hobbs et al¹⁸.

secuencias reguladoras del gen *LDLR* se encuentran en los 280 nucleótidos anteriores al codón de iniciación. En esta región se localizan dos secuencias ricas en AT, denominadas cajas TATA, y tres repeticiones imperfectas de 16 nucleótidos que son responsables de la actividad del promotor, así como un elemento de regulación independiente de esteroles (SIRE) que se encuentra entre las posiciones -94 y -110, incluye una de las cajas TATA y contiene los sitios de unión para C/EBP y CREB (fig. 1)^{8,12}. La transcripción de *LDLR* es estimulada por los esteroles a través del SREBP y su sitio de unión SER-1 localizado en la repetición 2⁹⁻¹¹. Además, las repeticiones 1 y 3 son elementos de unión a Sp1 para contribuir a la expresión basal del gen, y cooperan con la repetición 2 en la regulación mediada por esteroles¹⁰. Recientemente se ha identificado una proteína transactivadora, hnRNP K, que reconoce el elemento rico en CT de la región R3¹⁴.

Estudios de funcionalidad y co-segregación han demostrado que otras mutaciones que se producen en los nucleótidos conservados de R3 pueden considerarse causales del fenotipo HF. Es en esta región donde se han descrito la mayoría de las mutaciones identificadas en el promotor hasta ahora²⁵. La mayoría de las mutaciones en esta zona producen amplias reducciones en la potencia del promotor, obteniéndose generalmente entre el 5 y el 15% de la actividad transcripcional del promotor tipo salvaje^{16-20,26,27}. Los resultados obtenidos para las mutaciones identificadas en esta región a lo largo de este trabajo, c.-136C>G y c.-140C>G, correspondieron con lo esperado. Los experimentos EMSA realizados mostraron un patrón de afinidad por las proteínas nucleares diferente según se utilizase el alelo mutado o el salvaje (fig. 1). Igualmente, los experimentos de transfección de clones mutantes en cultivos celulares de HepG2 presentaron una actividad residual del promotor *LDLR* del 12 y del 7%, respectivamente (tabla 1). Estos valores fueron similares a los que observó el grupo de Hobbs et al¹⁸ con la mutación c.-135C>G, que nosotros utilizamos como control interno y con la que obtuvimos una actividad residual del 11%.

La mutación c.-120C>T también fue utilizada como control interno, con el fin de tener un valor orientativo de la afectación en la actividad transcripcional por parte de

mutaciones no localizadas en regiones reguladoras principales. Nuestro grupo obtuvo una reducción del 48% en la actividad del promotor de *LDLR*, valores similares a los obtenidos por Francova et al¹⁵.

Los resultados obtenidos en los EMSA para el resto de variantes, c.-36T>G y c.-208A>T, indicaron que sólo producían cambios minoritarios en el patrón de bandas que determina la afinidad de una secuencia por las proteínas nucleares (datos no mostrados). El análisis de la actividad transcripcional del promotor *LDLR* mutado para con estas variantes no mostró diferencias significativas (tabla 1). Aunque estas mutaciones no se encuentran en las regiones más importantes de regulación, se ha demostrado que la variante c.-217C>T, localizada cerca del nucleótido c.-208, produce cambios en la actividad transcripcional del promotor *LDLR*¹⁰. Se han identificado muy pocas mutaciones en la región 5'UTR, una de las cuales, c.-22delC, creaba un nuevo codón de inicio de la traducción y era por tanto causante de la HF²⁸. Sin embargo, los pequeños cambios que producen las mutaciones externas a las zonas de regulación sugieren que, en general, aunque podrían tener cierta influencia sobre los niveles del colesterol, su efecto no sería suficiente para ser causa del fenotipo HF de los pacientes.

En conclusión, hemos encontrado 4 mutaciones nuevas en el promotor del gen *LDLR* de varios pacientes afectos de HF. Los estudios de funcionalidad demuestran que sólo 2 de ellas, que se localizan en la repetición 3, producen efectos suficientemente drásticos para considerarlas responsables de la HF. Estos resultados muestran la necesidad de realizar análisis de funcionalidad en las nuevas variantes encontradas en el promotor del gen *LDLR*, con el fin de conocer su influencia en el fenotipo HF.

Contribución de los autores

Isabel de Castro-Orós ha participado en el diseño, la recogida de datos, el análisis y la interpretación de los mismos, así como en la realización del borrador del artículo y la aprobación final del mismo.

Sandra Pampín, Alfonso Bolado-Carrancio y Lourdes Palacios participaron en el diseño, la recogida, el análisis y la interpretación de los resultados, colaboraron en la realización del borrador del artículo y aprobaron el resultado final.

Aguirre de Cubas, Nuria Plana, Esperanza Martorell, José Puzo y Luis Masana han participado en el diseño, en la recogida y el análisis de datos, en la revisión crítica del contenido del artículo y en su aprobación final.

Marianne Stef, Fernando Civeira, José Carlos Rodríguez-Rey y Miguel Pocoví diseñaron el estudio, realizaron una revisión crítica del contenido del artículo y aprobaron el resultado final.

Financiación

Este estudio ha sido financiado con una beca de la Sociedad/Fundación Española de Arteriosclerosis para Investigación Básica (2005).

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. En: Scriver CR, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Nueva York: McGraw-Hill; 2001. p. 2863–913.
2. Müller C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand.* 1938;89:75–84.
3. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70:2084–8.
4. Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71:788–92.
5. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Kraus RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:6919–23.
6. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154–6.
7. Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, Medeiros AM, Marques L, Soutar AK. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet.* 2009;46:352–7.
8. Sudhof TC, Van der Westhuyzen DR, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 1987;262:10773–9.
9. Dawson PA, Hofmann SL, Van der Westhuyzen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem.* 1988;263:3372–9.
10. Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 1990;265:2306–10.
11. Jeon H, Meng W, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor Y2TD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol.* 2001;8:499–504.
12. Liu J, Ahlbom TE, Briggs MR, Kraemer FB. Identification of a novel sterol-independent regulatory element in the human low density lipoprotein receptor promoter. *J Biol Chem.* 1996;271:33616–22.
13. Mehta KD, Chang R, Underwook J, Wise J, Kumer A. Identification of a novel cis-acting element participating in maximal induction of the human LDL-receptor gene transcription in response to low cellular cholesterol levels. *J Biol Chem.* 1996;271:33616–22.
14. Li H, Liu J. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a transactivator for human LDL receptor gene transcription. *J Biol Chem.* 2010;285:17789.
15. Francova H, Trbusek M, Zapletalova P, Kuhrova V. New promoter mutations in the low-density lipoprotein receptor gene which induce familial hypercholesterolemia phenotype: molecular and functional analysis. *J Inher Metab Dis.* 2004;27:523–8.
16. Mozas P, Galetto R, Albajar M, Ros E, Pocoví M, Rodríguez-Rey JC. A mutation (-49C>T) in the promoter of the low density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2002;43:13–8.
17. Sun XM, Neuwirth C, Wade DP, Knight BL, Soutar AK. A mutation (T-45C) in the promoter region of the low-density lipoprotein (LDL)-receptor gene is associated with a mild clinical phenotype in a patient with heterozygous familial hypercholesterolemia (FH). *Hum Mol Genet.* 1995;4:2125–9.
18. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992;1:1445–66.
19. Koivisto UM, Palvimo JJ, Janne OA, Kontula K. A single-base substitution in the proximal Sp1 site of the human low density lipoprotein receptor promoter as a cause of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10526–30.
20. Dedoussis GV, Pitsavos C, Kelberman D, Skoumas J, Prassa ME, Choumerianou DM, et al. FH-Pyrgos: a novel mutation in the promoter (-45delT) of the low-density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 2003;64:414–9.
21. Lind S, Rystedt E, Eriksson M, Wiklund O, Angelin B, Eggertsen G. Genetic characterization of Swedish patients with familial hypercholesterolemia: a heterogeneous pattern of mutations in the LDL receptor gene. *Atherosclerosis.* 2002;163:399–407.
22. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, et al., Spanish Familial Hypercholesterolemia Group. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2005;51:1137–44.
23. Defesche J. Familial hypercholesterolemia. En: Betteridge J, editor. *Lipids and vascular disease*. Londres: Martin Dunitz; 2000. p. 65–76.
24. De Castro-Orós I, Pampín S, Cofán M, Mozas P, Pintó X, Salas-Salvadó J, et al. Promoter variant -204A>C of the cholesterol 7α-hydroxylase gene: association with response to plant sterols in humans and increased transcriptional activity in transfected HepG2 cells. *Clin Nutr.* 2011;30: 239–46.
25. Leigh SEA, Foster AH, Whittall RA, Hubbard CS, Humprhies SE. Update and Analysis of the University College London Low Density Lipoprotein Receptor Familial Hypercholesterolemia Database. *Ann Hum Genet.* 2008;72:485–98, doi:10.1111/j.1469-1809.2008.00436.x.
26. Scholtz C, Peeters A, Hoogendoijk C, Thiart R, de Villiers J, Hillermann R, et al. Mutation -59ct in repeat 2 of the LDL receptor promoter: reduction in transcriptional activity and possible allelic interaction in a South African family with familial hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet.* 1999;8:2025–30.
27. Smith AJP, Ahmed F, Nair D, Whittall R, Wang D, Taylor A, et al. A functional mutation in the LDLR promoter (-139C>G) in a patient with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Gen.* 2007;15:1186.
28. Sözen MM, Whittall R, Oner C, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, et al. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in Turkish patients. *Atherosclerosis.* 2005;180:63–71, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.042.