



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**MLb-LDLr: LDL hartzaile aldaeren
eragina auresateko ikasketa
automatikoko eredua**

*Asier Larrea Sebal, Unai Galicia,
Shifa Jebari, Rocio Alonso,
Asier Benito, Kepa Uribe,
Sonia Arrasate, Humberto Gonzalez
eta Cesar Martin*

13-19 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.01>

ANTOLATZAILEA:



LAGUNTZAILEAK:



MLb-LDLr: LDLaren hartzailearen aldaeren eragina auresateko ikasketa automatikoko eredu

Larrea, A.¹, Galicia, U.¹; Jebari, S.¹; Alonso, R.¹; Benito-Vicente, A.¹ Uribe, K.²,
Arraste, S.³; Gonzalez, H.³, Martin, C.¹

¹Biofisika Unitatea (CSIC, UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila,
UPV/EHU. 48080 Bilbo.

²Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), Basque Research and
Technology Alliance (BRTA), Paseo de Miramon 182, 20014, Donostia

³Kimika Organikoa II Saila, (UPV/EHU), 48940 Bilbo
asierlarrea@yahoo.es

Laburpena

Hiperkolesterolemia Familiarrak plasmako dentsitate baxuko lipoproteina-kolesterol maila altua du ezaugarri nagusi. Hiperkolesterolemia Familiarra agertzearen arrazoirik ohikoena LDL hartzailearen aldaerak dira, zeintzuek dentsitate baxuko lipoproteina-kolesterol hartzea murrizten eta plasman pilatzea eragiten duten. Gaixotasunaren diagnosi goiztiarra gako da gaixotasun kardiobaskularraren agerpena saihesteko. Alderen karakterizazioan gehien erabilitako tekniken prozesuak luzeak eta garestiak dira. *In silico* softwareak, aldiz, non algoritmo konputazionalak erabiltzen diren aldaera baten eragina auresateko, konponbide berritzaile bat dira. Lan honetan LDL hartzailearen *missense* aldaeren patogenizitatea auresan dezakeen ikasketa automatikoko eredu bat garatu dugu.

Hitz gakoak: Hiperkolesterolemia Familiarra, LDLr, Ikasketa Automatikoa

Abstract

Familial hypercholesterolemia is characterized by high concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma. The most common cause of Familial hypercholesterolemia are mutations in LDL receptor (LDLr) gene, which reduce LDL-C uptake and promote the accumulation of LDL-C in plasma. An early diagnosis of the disease is key to avoiding cardiovascular disease development. The most used characterization techniques are long and expensive processes. On the other hand, in silico software, where computational algorithms are used to predict the effect of a variant, is an innovative solution. In this work, we have developed a Machine Learning model that can predict the pathogenicity of LDLr missense variants.

Keywords: Familial Hypercholesterolemia, LDLr, Machine Learning

1. Sarrera eta motibazioa

Hiperkolesterolemia Familiarra (HF) gaixotasun autosomiko gainartzaileko ohikoena da mundu-mailan eta plasmako LDL-kolesterol (ingelesez *Low-density Lipoprotein-Cholesterol* edo LDL-C) maila altua du ezaugarri nagusi (Sjouke *et al.*, 2015). Plasmako LDL-C pilaketak ez du sintomarik eragiten maila larrietara iritsi arte, gaixotasun kardiobaskularrak (ingelesez *Cardiovascular disease* edo CVD) hedatzeko aukerak oso altuak diren arte. Arazo horrek diagnosi goiztiarraren garrantzia azpimarratzen du. Hala ere, HF kasuen % 1 bakarrik diagnostikatzen da (Benito-Vicente *et al.*, 2018), (Nordestgaard *et al.*, 2013).

LDL-Caren metabolismoan garrantzia duten geneetan gertaturiko mutazioek eragiten dute HFa, eta haien artean LDLaren hartzailea (LDLR) da ohikoena (Palacios *et al.*, 2012). Proteina horretan mutazio kaltegarriak gertatuz gero, zelula ezberdinen LDL-Caren barneraketa murrizten eta plasmako LDL-Caren kontzentrazioa handiagotzen da. Gaur egun 2.900 aldaera baino gehiago aurkitu dira LDLRn eta *missense* motakoak dira gehienak aminoazido baten edo gutxi batzuen aldaketa eragiten dutenak (Chora *et al.*, 2018). Aldaera horiek eragin kaltegarria izan dezakete proteinaren funtzionamenduan, patogenoak izanik, edo ez dezakete eraginik izan, onberak izanik. Hala ere, gutxi dira era egokian karakterizatu diren aldaerak. Kosegregazio-analisiak eta *in vitro* analisi funtzionalak dira karakterizazioa egiteko modurik fidagarrienak, nahiz eta biek desabantailak izan: *In vitro* analisiak eskulan eta denbora asko behar dute, eta kosegregazio-analisiak egiteko aldaera berdina duten hainbat gaixoren datu klinikoak behar dira (Knowles *et al.*, 2017), (Huijgen *et al.*, 2012).

Aldaera bakoitzaren eragina aurreikusteko gai diren tresna informatikoen erabilpena asko zabaldua osasun-zientzietan azken urteotan. Software edo eredu horiek gene zein proteinaren hainbat ezaugarri erabiltzen dituzte haien patogenizitatea auresateko, eta era oso azkar eta fidagarrian ematen dituzte emaitzak. Horretarako datu-base handiak behar dira, informazio nahikoa lortzeko eta emaitzak estatistikoki esanguratsuak izateko. LDLRan aldaera asko aurkitu direnez, haien eragina auresateko gai den software baten sorrera posible eta oso lagungarria izango litzateke. Badaude edozein genetaren gertatutako mutazioen eragina auresaten duten software batzuk (PolyPhen-2 eta SIFT) baita LDLRarekiko espezifikoak direnak ere (SFIP-MutID) (Adzhubei *et al.*, 2010), (Sim *et al.*, 2012), (Guo *et al.*, 2019). Hala ere, kontraesanak daude haien aurreikuspenen artean, eta aldaera onberen kasuan zehazki ez daukate oso asmakuntza-tasa altua.

Guk proposatutako ereduak karakterizatutako LDLRaren aldaera guztiak erabiltzen ditu ikasketa automatikoko teknikak erabiliz, patogenoen eta onberen arteko ezberdintasunak zeintzuk diren ikasteko eta horren arabera aldaerak sailkatzeko

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburua izan da LDLRaren aldaeren eragina asmatzeko gai den eredu bat sortzea.

Hiru helburu nagusi izan ditugu:

1. Eredu fidagarri bat sortzea.
2. Era errazean eguneratzea.
3. Beste gene batzuetarako erabilgarria izatea aldaketa gutxirekin.

Badaude hainbat software LDLRaren aldaeren eragina asma dezaketenak, baina askotan haien emaitzak ez datoz bat eta ez dira behar bezain zehatzak. Gainera, software horiek ez dira maiztasun askorekin berriren, baina gure helburuetako bat modu erraz eta azkarrean eguneratu daitekeen software baten garapena izan da. Azkenik, nahiz eta LDLR generako burutua izan, ereduaren muinak beste edozein genetarako balio izatea nahi dugu.

3. Ikerketaren muina

3.1. Metodologia

3.1.1. Datuen lorpena eta sailkapena

LDLRaren aldaerak ClinVar datu-basetik lortu ziren. Bertan *missense* eta era eztabaidaezinean karakterizatutakoak aukeratu ziren, 2.900 aldaeretatik 744. Horietatik 664 patogeno bezala sailkatu ziren eta 80 onbera bezala. Ondoren aztertuak izango ziren aminoazidoen 7 ezaugarri zehaztu ziren: oinarritzko eta aminoazido berria, zer kontserbatua dagoen aldatutako aminoazidoaren kokalekua, tamaina, karga eta hidrofobizitate-aldaketak eta proteinaren zer domeinutan gertatzen den. Aminoazidoen kokalekuen kontserbazioa lortzeko hainbat espezieren LDLR geneak konparatu ziren eta software bat erabiliz kontserbazio-balio bat atxiki zitzaion LDLR proteinaren 860 aminoazidoetako bakoitzari. Karga-aldaketa posible bakoitzari izen bat eman zitzaion: aminoazido positibo bat beste positibo bategatik aldatzen bazen, A; positibo bat negatibo bategatik, B etab. Tamaina eta hidrofobizitate-aldaketen balioak lortzeko jatorrizko aminoazidoaren balioari aminoazido berriaren balioa erantsi zitzaion. Azkenik, LDLR proteina 7 domeinu nagusitan banatu zen: seinale-sekuentzia, LBD (ingelesez *Ligand Binding Domain*), EGF-A (ingelesez *Epidermal Growth Factor A subunit*), EGF-B, β -upela, EGF-C, O-lotura domeinua, mintzean zeharreko domeinua eta domeinu zitosolikoa. 1 Taulan ezaugarrien laburpen bat azaltzen da.

1 Taula: Kontuan hartutako LDLR aldaeren ezaugarriak

Kontuan hartutako ezaugarriak	Sailkapena
Kontserbazioa	Oso kontserbatua-Gutxi kontserbatua
Karga aldaketa	Karga+/Karga+, Karga+/Karga-, Karga+/Karga gabe...
Tamaina aldaketa	Aldaketa handia-Aldaketa txikia
Hidrofobizitate aldaketa	Aldaketa handia-Aldaketa txikia
Jatorrizko amino azidoa	Alanina, Arginina, Asparagina...
Amino azido berria	Alanina, Arginina, Asparagina...
Domeinua	Seinale sekuentzia, Ligandoarekin batzen den domeinua...

3.1.2. Ereduaren azalpena

Behin ezaugarriak zehaztuta, aldaera patogenoen eta onberen artean bereizteko gai izango zen eredia definitu zen. Horren oinarria zera zen: ezaugarri bat zenbat eta ohikoagoa izan aldaera patogenoetan, orduan eta aukera gehiago ezaugarri hori duen aldaera bat patogeno izateko. Hori kontuan izanik, aurretiaz aukeratutako 760 aldaeren artean zer ezaugarri ziren ohikoenak bilatu zen patogenoen artean, eta patogeno izateko probabilitate-balio bat erantsi zitzaion bakoitzari (P_{ik}). Jatorrizko eta aminoazido berria, domeinua eta karga-aldaketa ezaugarriak motaren arabera taldekatu ziren: oinarrizko aminoazido zehatz bat duten zenbat patogeno, karga-aldaketa zehatz bat dutenak, etab. Beste ezaugarriak —kontserbazioa, tamaina eta hidrofobizitatea—, ezaugarri jarraituak zirenez, balio posibleak 5 taldetan banatu ziren: oso kontserbatuak (kontserbazio-balioa 0.9-0.7 artean), kontserbatuak (0.7-0.5), etab. Ondoren ezaugarri bakoitzari pisu edo garrantzi ezberdin bat eman zitzaion ausaz, denek ez zutelako era berean eragiten aldaera bat patogeno izateko aukeretan (e_k). Azkenik, muga-balio bat ezarri zen, puntu horretatik gora patogeno eta hortik bera onbera izendatuz aldaera (e_0).

Kontzeptu horiekin guztiekin honakofuntzioa ezarri zen (1).

$$f(P_i)_{calc} = -e_0 + \sum_{k=1}^{k=7} e_k * P_{ik} \quad (1)$$

$f(P_i)_{calc}$ LDLRaren aldaera bati atxikitako patogenizitate-balioa da eta zenbaki hori lortzeko aldaera baten 7 ezaugarrien ($k=1$ etik $k=7$ ra) patogeno izateko aukerak (P_{ik}) ezaugarri bakoitzaren pisuarekin (e_k) biderkatu eta muga-balioa (e_0) eransten zaio. Zenbaki hori positiboa bada, aldaera patogenoa dela esango du ereduak, eta negatiboa bada, onbera.

3.1.3. Entrenamendu eta balioztatzea

Koefiziente guztiak, bai ezaugarri bakoitzaren aukerak patogeno izateko zein haien pisua patogenizitate orokorrean, ClinVar-etik lortutako aldaerekin kalkulatu ziren. Datu-basea bitan banatu zen, bi heren entrenamendurako eta beste herena balioztapenerako. Entrenamendu-taldearekin aipatutako probabilitate eta pisuak zehaztu ziren, eta ondoren ereduaren asmakuntza-tasa frogatu zen balioztapen-taldearekin. Era horretan prozesu zientifikoa bete genuela ziurtatu genuen, datu-base osoarekin lan eginez gero ez genuelako jakingo aldaera berri baten aurrean zer erantzun emango zuen ereduak.

3.1.4. Optimizazioa

e_0 zein e_k balioak ausaz aukeratu zirenez, ereduaren eraginkortasuna hobetu zitekeela uste genuen. Horretarako, ESEA (ingelesez *Excel Solver Evolutionary Algorithm*) metodoa erabili genuen, zeinak funtzio bat optimizatu dezakeen aldagai batzuk aldatuz (Barati, 2013). Kasu honetan, era egokian asmatutako aldaeren kopurua optimizatzeko eskatu genion, aldagaiak pisuak eta muga-balioa izanik.

Horrekin batera, P_{ik} balio batzuk aldatu genituen eskuz, ezaugarri horiek zituzten aldaera oso gutxi aurkitzen zirelako ClinVar datu-basean eta horrek egiazkoak ez ziren emaitzak agertzea eragin zezakeelako. ESEA bidezko optimizazioa eta eskuz egindako aldaketak behin eta berriz eraman ziren aurrera, hobekuntzarik lortu ez zen arte.

3.1.5. Ereduaren balioztapen esperimentalak

Nahiz eta ClinVar-eko datuak erabili datu-basea sortzeko, bertan agertzen ez ziren LDLRaren 13 aldaera karakterizatu genituen balioztapen esperimental bat izateko. Aldaera horiek aukeratzeko orduan, ClinVar-en gatazkatsu bezala sailkatutako eta softwarearekin bat etortzen ez zirenak bilatu ziren. Era horretan auresateko aldaera zailak eta softwareak konparatzeko balio zutenak aurkitu genituen.

Karakterizazioa egiteko, LDLRaren 13 aldaera horiek sintetizatzen zituzten plasmidoak lortu eta haiekin HEK293 giltzurrun-zelulak transfektatu ziren. Ondoren, fluxu-zitometria erabiliz, plasmido horiek zituzten zelulen LDLaren barneraketa neurtu zen. LDL molekula horiek fluoreszentsiaz markatuak zeudenez, zenbat eta LDL gehiago barneratu, orduan eta fluoreszenteagoak bihurtzen ziren zelulak. Era horretan LDLRaren aldaerek hartzaile eta LDL arteko afinitatean nola eragiten zuten ikusi zen, zenbat eta seinale gutxiago, orduan eta aldaera patogenoagoa izanik.

3.2. Emaitzak

ESEA eta eskuz eginiko optimizazio-prozesua amaitzean, hurrengo ekuazioa lortu genuen (2).

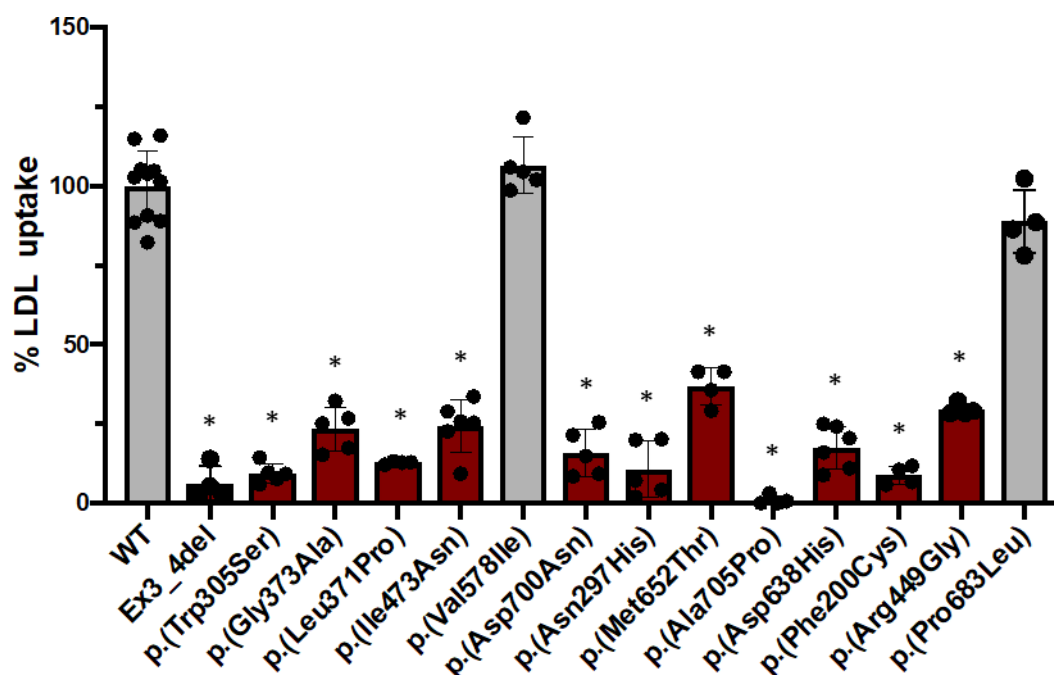
$$f(P_i)_{calc} = -(+0.667) + 0.082 * P_{i1} + 0.132 * P_{i2} + 0.093 * P_{i3} + 0.088 * P_{i4} + 0.165 * P_{i5} + 0.115 * P_{i6} + 0.077 * P_{i7} \quad (2)$$

Ekuazio honen zehaztasun-maila % 90 baino handiagoa dauka aldaera patogeno eta onberak ezberdintzerakoan. Zehazki, aldaera onberen % 92,5 ongi asmatzen ditu eta aldaera patogenoen % 91,5. Beste software ezagunekin konparatuz, MLb-LDLRk bigarren asmakuntza-tasarik altuena dauka aldaera patogenoetan eta onena da aldaera onberak asmatzen (2 Taula).

2 Taula: MLb-LDLr-en zehaztasuna beste software batzuekin konparatuz.

Software	Zehaztasuna patogenoetan (%)	Zehaztasuna onberetan (%)	Zenbat aldaera patogeno (664tik)	Zenbat aldaera onbera (80tik)
MLb-LDLr	91.5	92.5	608	74
PolyPhen-2	93.3	85	620	68
SIFT	85.5	90	568	72
SFIP-MutID	91.1	21.2	605	17

Ondoren zitometria bidez balioztatutako LDLR aldaeren LDLaren barneraketa aztertu zen (1 Irudia). Kontrol bezala LDLR andui basatia (ingelesez *Wild Type* edo WT) erabili zen. Emaitzetatik ondorioztatu daiteke bi laginek (p.(Asp700Asn) eta p.(Pro683Leu)) WT bezalako eragina daukatela, beraz, onberak dira, eta beste 11 aldaerek LDLaren barneraketa murriztua erakusten dute.



1. Irudia: Zitometria bidezko 13 LDLR aldaeren karakterizazioa.

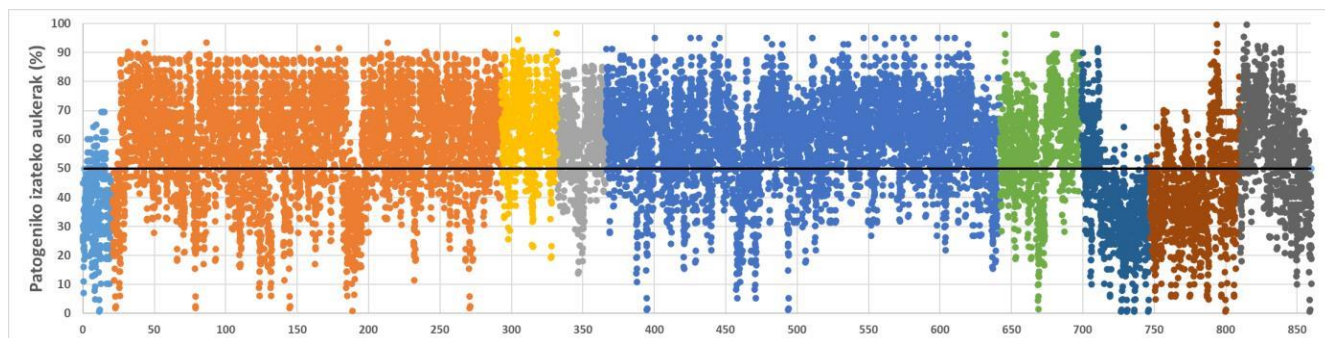
Ondoren beste softwareen aurreikuspenekin konparatu ziren zitometria-emaizak (3. Taula). 11 aldaera patogenoetatik gure ereduak 8 asmatzen ditu, bigarren emaitzarik onena SFIP-MutIDren atzetik. Aldaera onberetan, bestalde, MLb-LDLRk aldaera bakarra asmatu du, aztertutako bi laginetik, eta SIFTek bakarrik asmatu ditu 2 aldaerak. Emaizta hauek softwareen asmakuntza-tasarekin bat ez datozen arren, kontuan izan behar da aldaera gatazkatsua eta softwareen artean emaitza ezberdinak erakusten dituzten aldaerak aukeratu direla. Beraz, batek asmatuz gero, beste batek huts egin behar du. Hala ere, badago erlazio bat 2. Taularekin, SFIP-MutID aldaera patogenoak asmatzen ona baina onberak asmatzen txarra izanik eta SIFT kontrako emaitzak erakutsiz. Orokorrean MLb-LDLRk oso emaitza onak erakutsi ditu eta orekatuena da.

3. Taula: Software ezberdinen zitometria bidez karakterizatutako aldaeren aurreikuspena.

Software	Asmatutako patogenoak (11tik)	Asmatutako patogenoak (%)	Asmatutako onberak (2tik)	Asmatutako onberak (%)	Zehaztasuna (%)
MLb-LDLr	8	0.72	1	50	0.69
PolyPhen-2	6	0.54	0	0	0.46
SIFT	2	0.18	2	100	0.30
SFIP-MutID	10	0.91	0	0	0.77

Gure ereduaren asmakuntza-tasa ikusita, LDLRaren aldaera posible guztiak aztertzea erabaki genuen. LDLR proteinak 860 aminoazido dituenaz eta 19 aminoazido-aldaketa posible daudenez, 16.340 aldaketa posible gerta daitezke proteinan eta bakoitzaren patogeno izateko aukerak irudikatu ditugu (2. Irudia).

2. Irudia: LDLRk izan ditzakeen aldaera posible guztien patogeno izateko aukera MLb-LDLr-ren arabera.



Kolore bakoitza LDLRaren domeinu ezberdin bati dagokio. Erdiko marra beltzak aldaera patogeno eta onberak bereizten ditu. Gainera, software bat argitaratu dugu, edozein aldaeraren patogeno izateko aukerak era azkarrean ematen dituen (https://rocky-beyond-90850.herokuapp.com/). Horretaz gain arlo ezberdinetako informazioa erakusten du: zer domeinutan kokatzen den, tamaina aldaketa, etab.

4. Ondorioak

Proiektu honek genituen helburu guztiak bete ditu: MLb-LDLr-k fidagarritasun oso handia erakutsi du, merkatuan dauden beste software batzuekin lehiatzeko gai izanik. Eguneratzeari dagokionez, modu oso azkar eta errazean egin daiteke, ESEA eta eskuz eginiko aldaketak minutu gutxi batzuetan egin ahal baitira. Horrek ahalbidetzen du aldaera berriak agertzean haien datuak ereduari sartzea, MLb-LDLr-ren fidagarritasuna handituz. Azkenik, ereduaren beste proteina batzuen patogenizitatea asmatzeko gai izango litzatekeela uste dugu, aldaketa gutxi batzuekin. Kontserbazio- eta domeinu-balioak bakarrik aldatu beharko genituzke, ondoren ESEA eta eskuzko aldaketak berriz egiteko.

In silico iragarpen-softwareak hain modu azkar eta errazean sortu ahal izateak haien garrantzia azpimarratzen du. Fidagarritasun handiko iragarpenek diru eta denbora asko aurreztu dezakete eta horien etengabeko eboluzioak etorkizuneko teknika nagusia bilakatuko direla erakusten du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honekin batera software bat argitaratu dugu¹ eta haren arrera zein den ikusiko dugu. Kritikak jasotakoan ereduaren zein softwarea moldatuko ditugu, jendearen beharrak asetzeko eta fidagarritasuna handitzeko. Era berean, 6 hilabeterik behin ClinVar-eko datu-basea berritu nahi dugu, emaitzak eguneratzeko.

Horretaz gain, beste proteina batzuen iragarpenak egin ditzan nahi dugu. Horretarako, oso aztertuak eta aldaera datu-base handia duten beste proteina batzuk bilatuko ditugu eta horiekin prozesu guztia aurrera eramango dugu.

6. Erreferentziak

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Barati, R. (2013). Application of excel solver for parameter estimation of the nonlinear Muskingum models. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 17(5), 1139–1148. <https://doi.org/10.1007/s12205-013-0037-2>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., & Martin, C. (2018). Familial hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113426>
- Guo, J., Gao, Y., Li, X., He, Y., Zheng, X., Bi, J., Hou, L., Sa, Y., Zhang, M., Yin, H., & Jiang, L. (2019). Systematic prediction of familial hypercholesterolemia caused by low-density lipoprotein receptor missense mutations. *Atherosclerosis*, 281, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.003>
- Huijgen, R., Kindt, I., Defesche, J. C., & Kastelein, J. J. P. (2012). Cardiovascular risk in relation to functionality of sequence variants in the gene coding for the low-density lipoprotein receptor: A study among 29 365 individuals tested for 64 specific low-density lipoprotein-receptor sequence variants. *European Heart Journal*, 33(18), 2325–2330. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs038>
- Knowles, J. W., Rader, D. J., & Khoury, M. J. (2017). Cascade screening for familial hypercholesterolemia and the use of genetic testing. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 318(4), 381–382. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.8543>
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., Wiklund, O., Hegele, R. A., Raal, F. J., Defesche, J. C., Wiegman, A., Santos, R. D., Watts, G. F., Parhofer, K. G., Hovingh, G. K., Kovanen, P. T., Boileau, C., Averna, M., Borén, J., ... Tybjaerg-Hansen, A. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *European Heart Journal*, 34(45), 3478–3490. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs273>
- Palacios, L., Grandoso, L., Cuevas, N., Olano-Martín, E., Martínez, A., Tejedor, D., & Stef, M. (2012). Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis*, 221(1), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.021>
- Sim, N. L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 452–457. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
- Sjouke, B., Kusters, D. M., Kindt, I., Besseling, J., Defesche, J. C., Sijbrands, E. J. G., Van Lennep, J. E. R., Stalenhoef, A. F. H., Wiegman, A., De Graaf, J., Fouchier, S. W., Kastelein, J. J. P., & Hovingh, G. K. (2015). Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: Prevalence, genotype-phenotype relationship, and clinical outcome. *European Heart Journal*, 36(9), 560–565. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu058>

7. Eskerrak eta Oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiot Eusko Jaurlaritzari Doktoretza-aurreko diru laguntza emateagatik. Era berean José Ángel Fernándezi web orria eta softwarea sortzeagatik.