



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Hiperkolesterolemia familiarra:
LDLR, APOB eta PCSK9-en
mutazioen balioztapen funtzionala
diagnostiko zehatz baterako**

*A. Etxebarria, A. Benito-Vicente,
L. Palacios, H. Ostolaza
eta C. Martin*

751-756 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.104>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Hiperkolesterolemia familiarra: LDLR, APOB eta PCSK9-en mutazioen balioztapen funtzionala diagnostiko zehatz baterako.

Ettxebarria A¹, Benito-Vicente A¹, Palacios L², Ostolaza H¹, Martin C¹.

¹Biofisika Unitatea (CSIC, UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, UPV/EHU. 48080 Bilbo. ²Progenika Biopharma, Grifols, Derio, Spain.

Kontakturako e-posta: aitor_ettxebarria@hotmail.com; cesarbakio@gmail.com

Laburpena

Hiperkolesterolemia familiarra (HF) gaixotasun autosomiko dominantea da eta gizabanakoen heterozigosiaren forma 1:500-maiztasun batekin agertzen da. HF-aren oinarri genetikoa *LDLR*, *APOB* eta *PCSK9* geneetan kokatutako mutazioen baten ondorio izan ohi da. Nahiz eta geneko mutazio funtzionalen detekzioak HF-egoeraren nolabaiteko diagnosi bat hornitu, oraindik gene horien aldaera asko funtzionalki karakterizatu gabe daude. Ikerketa honen helburuak honakoak izan dira: HF-an agertzen diren mutazioen ezagumendua zabaldu eta diagnosi zehatz bat hornitu gertaera kardiobaskularren arriskua murrizteko.

Hitz gakoak: Hiperkolesterolemia familiarra, LDLR, ApoB-100, PCSK9.

Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is a common autosomal codominant disease with a frequency of 1:500 individuals in its heterozygous form. The genetic basis of FH is most commonly mutations within the *LDLR*, *APOB* and *PCSK9* genes. Although the detection of functional mutations provides an unequivocal diagnosis of the FH condition, there are many variants whose pathogenicity is still unknown. The aims of this study were to expand our knowledge of mutations responsible for FH, providing an accurate diagnosis and leading to early treatment to reduce the risk of premature cardiovascular events.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, LDLR, ApoB-100, PCSK9.

1. Sarrera eta motibazioa

Hiperkolesterolemia familiarra (HF), gizartean oso hedatua dagoen gaixotasun autosomiko dominantea da. HF, normalean, *LDLR*-an, *APOB*-en edo *PCSK9*-an mutazioen baten ondorio izan ohi da. Ezaugarri nagusi moduan, odoleko kolesterola maila altua dakar. Gaixotasun hau pairatzen duten pertsonak, tendoietako xantoma, kornea inguruko eraztuna eta betazal-xantelasma nabarmenak izaten dituzte; halaber, arterien barne-geruzan lipidoz, makrofagoz, muskulu-zelulaz, ehun konektiboz eta bestelako odol-zelulez osaturiko metaketak ageri dira, aterosklerosi eta bihotzeko gaixotasun goiztiarrak sortzen dituztenak (Hata et al. 1981). HF delakoa zelulek kolesterolaren barneraketa-mekanismoan sortutako akatsen ondorio izan ohi dela esan beharra dago.

Munduko Osasun Erakundeak (OMS) esaten duenaren arabera, zenbat eta HF-aren diagnostikoa goiztiarrago egin, are eta onuragarriagoak izango dira tratamendu bitarteko onurak. Hori dela eta, gaixotasunaren diagnostiko goiztiar bat lortzeko estrategia baten garapena ezinbestekoa da, arazoa konpontzeko analisi genetiko azkar eta zorrotz bat bide egokia izan daitekeelarik. Azken hau, ordea, ez da guztiz fidagarria, kasu gehienetan adierazita dauden mutazioak ez baitaude funtzionalki karakterizatuta. Ondorioz, mutazio hauen izaera ezagutzeak diagnostiko genetiko guztiz fidagarri bat lortzeko garrantzi handia dauka (Nordestgaard et al. 2013).

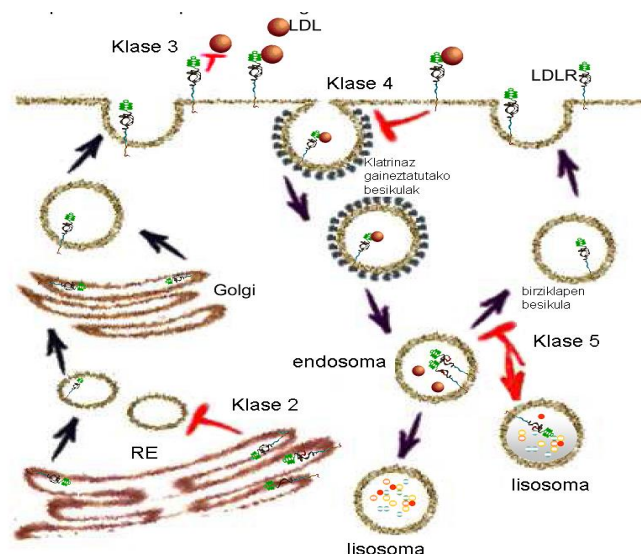
Kolesterola, eta haren esterrak, uretan ia erabat disolbaezinak direnez, sorleku duten ehunetik (gibelektik batez ere) metatu edo kontsumituko duten ehunetara plasmako dentsitate txikiko lipoproteinen bidez (LDL) garraiatzen dira. ApoB-100 LDL-aren proteina nagusia da, eta inguruetako ehunetara iristean bere hartzaile espezifiko den LDLR-aren bidez, LDL eta bide batez kolesterola, zeluletara sartzen da (Rader et al. 2003).

LDLR genea 19p kromosoman kokatzen da eta I klaseko transmintza proteina kodetzen du (Lindgren et al. 1985). LDLR proteina erretikulu endoplasmatikokoan sintetizatzen da eta mintz plasmatikokoan LDL-aren ApoB-100 proteina ezagutzen duenean klatrinaren menpeko endozitosiaren prozesuari hasiera ematen dio. Endozitosiaren ostean, endosomak azidifikatuta

duen medioan, LDLR eta ApoB-100 proteinen arteko afinitatea jaisten da. Honen ondorioz, LDL endosomaren lumenean aske geratzen da eta hartzaileak konformazioz aldatzen du, ostean, alde batetik, LDLR mintz plasmatikora birbideratzen da, eta beste alde batetik, LDL lisosomara joango da bere degradadazioaren bidezidorra jarraituz (Innerarity 2002).

LDLR-aren genean 1200 mutazio baino gehiago aurkitu dira (Usifo et al. 2012). LDLR-aren mutazioek LDLR funtzionamendu arruntari nola eragiten dioten arabera bost talde handitan bana daitezke: 1go klasekoak, LDLR-aren adierazpenaren galera sortzen duten mutazioak dira; 2. klasekoak, LDLR mintzera heltzeko gaitasuna, partzialki edo osorik, galarazten duten mutazioak dira; 3. klasekoak, LDL eta LDLR arteko lotura galarazten duten mutazioak dira; 4. klasekoak, Klatrina bidezko endozitosia galarazten duten mutazioak aurkituko ditugu; eta azkenik, 5. klasekoak Birziklapenean galera sortzen duten mutazioak dira (Etxebarria et al. 2015) (1. irudia).

1. irudia: LDLR-aren mutazioek LDLR funtzionamendu arruntari nola eragiten dioten arabera bost talde handitan bana daitezke.



LDL hartzailean aurkitu diren hainbat mutazioekin alderatuz, ApoB eta PCSK9 proteinetan, ordea, gaixotasun-eragile diren mutazio gutxi batzuk aurkitu eta egiaztatu dira (Austin et al. 2004). ApoB-100 proteinak bi funtzio nagusi ditu: LDL partikularen osotasuna mantentzea eta LDL-LDLR arteko batuketa ahalbidetzea, honen ondorioz, LDLR-ek bideratzen duen barneraketa prozesua dela medio, zirkulazioan dauden LDL partikulen garbiketa eraginez. HF-aren eragile diren APOB mutazioen maiztasuna Europako hainbat populazio kaukasianoetan 1/300-1/700 pertsonetakoa da. ApoB proteinan identifikatutako eta bereizitako lehen mutazioa, ApoB3500 edo ApoB3527 ere deitua, 1980. hamarkadaren bukaeran deskribatu zen (Soria et al. 1989).

2003-an LDL-aren bidezidorra erregulatzen duen azkenetariko proteina bat aurkitu zen, PCSK9 deritzona (Abifadel et al. 2003). PCSK9 (ingelesez, *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9*) plasmako proteina bat da eta honek zelulak gainazalean daukan LDLR kopurua erregulatzen du. PCSK9-k LDLR lotzen du, ApoB-100 proteinak lotzen duen gune desberdin batean. Behin endozitatua, endosomaren medio azidoan, PCSK9 eta LDLR-ren arteko afinitatea, jaitsi egin beharrean, LDL-arekin gertatzen den bezala, areagotzen da. Honek ez du LDLR-aren konformazio aldaketa baimentzen eta ondorio gisa, hartzailea ezin da mintzera itzuli eta lisosoman degradatzen da (Fisher et al. 2007).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Datu klinikoekin konbinatzen den LDLR, ApoB-100 eta PCSK9 proteinen aldaeren detekzio goiztiarrek LDL-C (LDL-ean dagoen kolesterola) mailen eta HF edo hiperkolesterolemia familiar konbinatuaren (FCHL) fenotipoekin asoziazioa egitea ahalbideratzen dute. Asoziazio ikasketa hauetan, datuak baieztatzeko eta fenotipoan LDLR, ApoB-100 eta PCSK9 proteinek duten eginkizun zehatza identifikatzeko familia kopuru handiak beharrezkoak dira. Azken aldi

honetan, aldaera hauek LDL-C maila kontrolatzeko duten betebeharrak biologikoen aurkikuntzarako funtzio-azterketen beharra izan da. Ikerketa honen helburu nagusia LDLR, ApoB-100 eta PCSK9 proteinetan agertzen diren hainbat mutazioen balioztapen funtzionala izan zen, aukeratutako mutazioak LIPOchip[®] plataformak (Progenika-Biopharma) aurkitutako Espainako estatuko HF gaixoetan agertzen direnak izanik (Alonso et al. 2009, Tejedor et al. 2006, Tejedor et al. 2005). Lan honek gaixotasunaren diagnostiko zuzen bat finkatzea baimentzen du, diagnosi genetikoak ekar ditzakeen positibo faltsuak ekidinez eta mutazioak dakarren akatsaren larritasuna zehaztuz.

3. Ikerketaren muina

3.1-LDL-aren aldaerak

Estatuko populazioan detektatu diren mutazio ohikoenen efektuak aztertu genituen, hau da, 4 kasu-indize baino gehiago dituztenak. Hori dela eta, proteinen funtzioa aztertzeko CHO zelulak mutazio desberdinak daramatzaten plasmidoekin transfektatu ziren. LDLR-aren aktibitatea fluxuzko zitometria bidez (FACS) neurtu zen. Alde batetik, LDL-aren batuketak eta barneraketa zehazteko, fluoreszentez markatutako LDL-ak erabili genituen LDLR aldaera guztietarako. Bestalde, mintz zelularretako LDLR-aren adierazpen maila aztertu genuen, anti-LDLR-aren antigorputz primarioa eta Alexa Fluor 488-konjugatutako bigarren antigorputz bat erabiliz. Patogenizitatea argitzeko helburuarekin, neurtutako hartzaile-aldaeren aktibitatea eta adierazpena jatorrizko tipoko proteinarekin konparatu ziren. Lan honetan karakterizatu ditugun 18 LDLR-ren aldaerak 1. taulan agertzen dira. Patogenizitateaz gain, mikroskopia konfokalaren bidez aztertutako (aurkeztu ez diren emaitzak) mutazioaren klasea ere adierazten da.

1. taula. LDLR aldaeren karakterizazio funtzionala eta mutazioaren sailkapena.

Kokapena	DNA Kodetzailea	Proteina	Domeinua	Klasea
Exoi 3-4	c.191-?_694+?del	p.[L64S];[S65_A232del]	Batzeko domeinua	3. Klase
Exoi 4	c.346T > C	p.Cys116Arg	Batzeko domeinua	3. klase
Exoi 5	c.806G>A	p.Gly269Asp	Batzeko domeinua	funtzionala
Exoi 6	c.862G>A	p.Glu288Lys	Batzeko domeinua	3. klase
Exoi 6	c.902A > G	p.Asp301Gly	Batzeko domeinua	3. klase
Exoi 9	c.1246C>T	p.Arg416Trp	β-propeller	5. klase
Exoi 12	c.1729T>G	p.Trp577Gly	β-propeller	2. klase
Exoi 13	c.1871_1873delTCA	p.Ile624del	β-propeller	2. klase
Exoi 13	c.1942T>C	p.Ser648Pro	β-propeller	2. klase
Exoi 14	c.2053C>T	p.Pro685Ser	EGF-C	2. klase
Exoi 18	c.2575G>A	p.Val859Met	isatsa-zitoplasmatikoa	funtzionala
Introi 3	c.313+2dupT	p.[L64S];[S65_P105del]	Batzeko domeinua	2. klase
Introi 8	c.1186+5G>A	p.G396fs*26	EGF aitzindari-modukoa	E/Z (Ez zehaztuta)
Introi 12	c.1845+1G>C	p.Glu615fs*25	EGF aitzindari-modukoa	E/Z
Exoi 4	c.346T > C	p.Cys116Arg	Batzeko domeinua	3. klase
Exoi 4	c.514G > A	p.Asp172Asn	Batzeko domeinua	3. klase
Exoi 5	c.769C > T	p.Arg257Trp	Batzeko domeinua	funtzionala
Exoi 5	c.806G>A	p.Gly269Asp	Batzeko domeinua	funtzionala

E/Z: Ez zehaztuta.

3.2-ApoB-100 proteinaren aldaerak

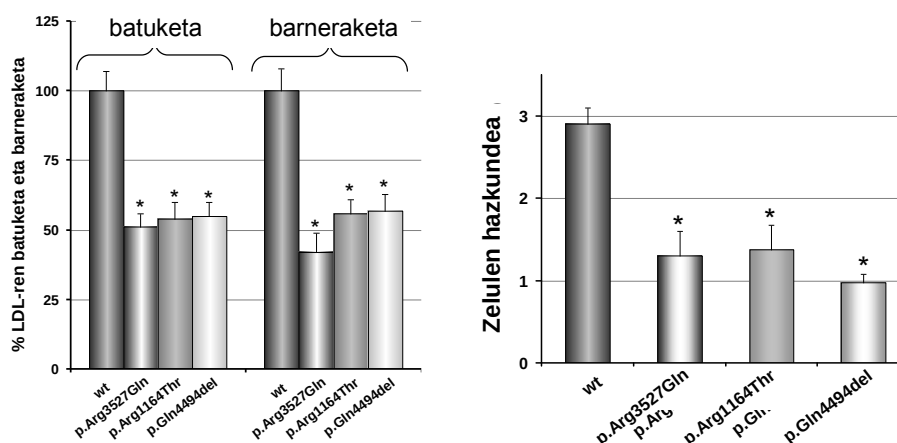
ApoB-100 proteinan aurkitu diren aldaerak nagusiki LDL eta LDLR-aren arteko batuketari eragiten diote (Pejic 2014).

Lan honetarako, fluxu zitometria eta U937 zelularen hazkundera erabiliz, Espainako populazioan oso ohikoa diren 3 aldaera ikertu ditugu.

ApoB-100-en patogenizitatea karakterizatzeko fluxu zitometriaz, aktibatutako linfozitoak 4 orduz inkubatzeko FITC-LDL-arekin, 37°C-tan LDL-aren barneraketa neurtzeko eta 4°C-tan batuketa neurtzeko. 2. irudian ikusi daitekeen moduan p.Arg3527Gln, p.Arg1164Thr eta p.Gln4494del-en batuketa, jatorrizko tipokoarekin (wt, ingelesetik *wild type*) konparatzen genuenean, gutxituta agertzen zen (wt: 100 $\pm$ 7; p.Arg3527Gln: 51 $\pm$ 5; p.Arg1164Thr: 54 $\pm$ 6; p.Gln4494del: 55 $\pm$ 5). Bestalde, LDL-aren barneraketa aztertu zenean oso emaitza antzekoa lortu zen (wt: 100 $\pm$ 8; p.Arg3527Gln: 42 $\pm$ 7; p.Arg1164Thr: 56 $\pm$ 5; p.Gln4494del: 57 $\pm$ 6).

U937 zelulek kolesterolaren *de novo* sintesirako ezinbestekoa den HMG-CoA erreduktasa entzima suntsituta dutenez, kanpotik jasotzen duten kolesterolaren iturriaren menpe daude. Ezaugarri honetan oinarrituz ApoB-100 aldaerak dituzten LDL-ak kolesterol iturri bakarra izanda U937 zelulen hazkundera jarraitu zen ApoB-100-en patogenizitatea detektatzeko. 2. irudian ikusi daitekeen moduan, U937 zelulak ApoB-100 aldaerak dituzten LDL-ekin inkubatu zirenean zelulen hazkunderaren murrizketa agerikoa da (wt: 2.9 $\pm$ 0.2; p.Arg3527Gln: 1.3 $\pm$ 0.3; p.Arg1164Thr: 1.38 $\pm$ 0.3; p.Gln4494del: 0.98 $\pm$ 0.1).

2. irudia: ApoB-100 proteinaren mutazioak.



3.3-PCSK9-ren aldaerak

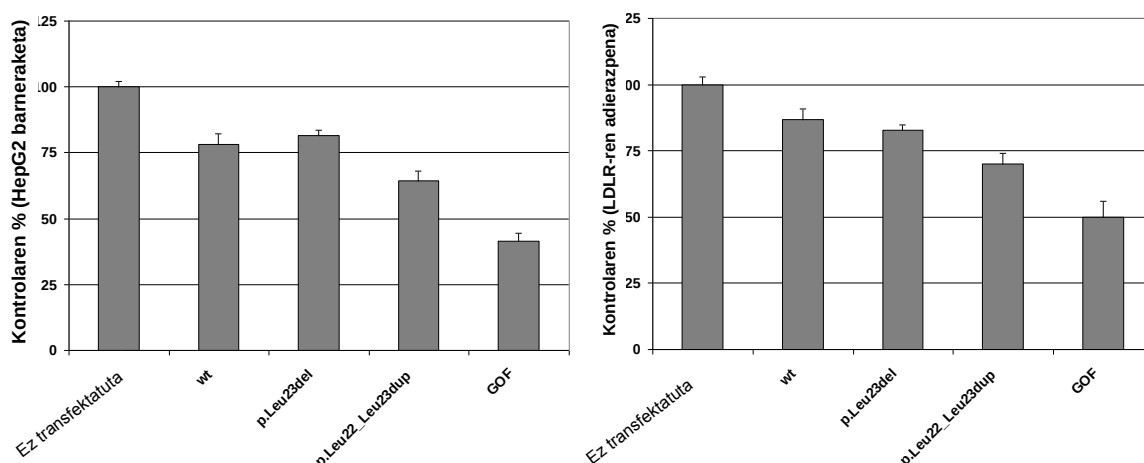
PCSK9-ren aldaerak bi motatakoak izan daitezke: funtzio areagotzaileak (GOF, ingelesetik *Gain Of Function*) edo funtzio galtzaileak (LOF, ingelesetik *Loss Of Function*). GOF aldaerak HF-aren kasuekin erlazionatuta daude zelularen gainazaletik LDLR gehiegi kentzen dutelako; LOF aldaerak, aldiz, babes efektua ematen diete LOF aldaerei (Cameron et al. 2006).

Ikerketa honetan, fluxu zitometria teknika nagusi moduan erabiliz p.Leu22_Leu23dup eta p.Leu23del oso ohikoak diren aldaerak karakterizatu ditugu.

PCSK9-ren aldaerak zelularen gainazalaren LDLR-aren adierazpenean duten efektua aztertzeko, HepG2 zelulak p.Leu22_Leu23dup, p.Leu23del, wt, eta GOF aldaerak zeramatzaten plasmidoekin transfektatu ziren. PCSK9-ren efektua ikusteko, oso ohikoa da zelula mota hau erabiltzea, oso LDLR kantitate handia adierazten baitute. Horretarako, bi metodo desberdin erabili ziren: metodo zuzen bat, PCSK9-ren aldaeren efektua LDLR-aren espresioaren galera isladatzen duena; eta beste metodoa, zeharkako metodoa alegia, LDL-aren barneraketaren murrizketa bezala agertzen dena.

3 irudian, p.Leu23del aldaera wt-arekin konparatuta efekturik ez daukala ikus dezakegu, hau da, aldaera hori guztiz funtzionala dela, eta aldiz p.Leu22_Leu23dup aldaera funtzio areagotzaile bat dela, nahiz eta kontrol moduan erabili dugun GOF aldaera baino efektu gutxiago izan. Honez gain, p.Leu22_Leu23dup GOF bat bihurtzearen zergatia zein den jakiteko ikerketa gehiago egitea beharrezkoa da.

3. irudia: PCSK9-ren mutazioak



4. Ondorioak

Gaur egun, LDLR, ApoB-100 eta PCSK9-an agertzen diren barianteen karakterizazio funtzionala egitea beharrezkoa da, diagnosi zehatz bat egiteko eta ondorioz, HF tratamendua hobetzeko.

Lan honetan Estatu Espainolean ohikoenak diren HF-an parte hartzen duten gene nagusien aldaeren balioztapen funtzionala burutu da, mutazio hauen inguruko ondorengo informazio berriaren ekarpena eginez: patogenizitatea edo eza, patogenizitate maila edo hala badagokio, LDL-aren barneraketaren bidezidorrean kaltetutako prozesua.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gaixotasun kardiobaskularrak hilkortasun-kausa nagusietako bat izanik, pazienteak lehenbailehen identifikatzea oso garrantzitsua da, bai diagnostiko goiztiar bat izateko bai tratamendu egoki bat emateko. HF-ak mendebaldeko gizartean duen inpaktu soziala kontuan hartuta, diagnostiko genetiko baten bidez gaixoak diagnostikatzeko HF-an inplikaturik dauden proteinen akzio mekanismoak eta gene horien aldaera patogenoak sakonago ezagutzea interes handikoa da. Aldaeren karakterizazioak eta sailkapenak pertsonalizatutako tratamenduak baimenduko dituzte. Bestalde eta bukatzeko, HF-an parte hartzen duten gene berrien aurkikuntzak eta ikasketak estrategia terapeutiko berriak proposatzeko aukera irekiko lukete.

6. Erreferentziak

- Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villegier, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G. and Boileau, C. (2003), Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia, *Nat Genet*, 34(2): 154-156.
- Alonso, R., Defesche, J. C., Tejedor, D., Castillo, S., Stef, M., Mata, N., Gomez-Enterria, P., Martinez-Faedo, C., Forga, L. and Mata, P. (2009), Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia using a DNA-array based platform, *Clin Biochem*, 42(9): 899-903.
- Austin, M. A., Hutter, C. M., Zimmern, R. L. and Humphries, S. E. (2004), Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review, *Am J Epidemiol*, 160(5): 407-420.

- Cameron, J., Holla, O. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E. and Leren, T. P. (2006), Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors, *Hum Mol Genet*, 15(9): 1551-1558.
- Etxebarria, A., Benito-Vicente, A., Palacios, L., Stef, M., Cenarro, A., Civeira, F., Ostolaza, H. and Martin, C. (2015), Functional characterization and classification of frequent low-density lipoprotein receptor variants, *Hum Mutat*, 36(1): 129-141.
- Fisher, T. S., Lo Surdo, P., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J. C., Wisniewski, D., Cummings, R. T., Calzetta, A., Cubbon, R. M., Fischer, P. A., Tarachandani, A., De Francesco, R., Wright, S. D., Sparrow, C. P., Carfi, A. and Sitlani, A. (2007), Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation, *J Biol Chem*, 282(28): 20502-20512.
- Hata, Y., Shigematsu, H., Tsushima, M., Oikawa, T., Yamamoto, M., Yamauchi, Y. and Hirose, N. (1981), Serum lipid and lipoprotein profiles in patients with xanthomas: a correlative study on xanthoma and atherosclerosis (I), *Jpn Circ J*, 45(11): 1236-1242.
- Innerarity, T. L. (2002), Structural biology. LDL receptor's beta-propeller displaces LDL, *Science*, 298(5602): 2337-2339.
- Lindgren, V., Luskey, K. L., Russell, D. W. and Francke, U. (1985), Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(24): 8567-8571.
- 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., Aversa, M., Boren, J., Bruckert, E., Catapano, A. L., Kuivenhoven, J. A., Pajukanta, P., Ray, K., Stalenhoef, A. F., Stroes, E., Taskinen, M. R., Tybjaerg-Hansen, A. and European Atherosclerosis Society Consensus, P. (2013), Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society, *Eur Heart J*, 34(45): 3478-3490a.
- Pejic, R. N. (2014), Familial hypercholesterolemia, *Ochsner J*, 14(4): 669-672.
- Rader, D. J., Cohen, J. and Hobbs, H. H. (2003), Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment, *J Clin Invest*, 111(12): 1795-1803.
- Soria, L. F., Ludwig, E. H., Clarke, H. R., Vega, G. L., Grundy, S. M. and McCarthy, B. J. (1989), Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(2): 587-591.
- Tejedor, D., Castillo, S., Mozas, P., Jimenez, E., Lopez, M., Tejedor, M. T., Artieda, M., Alonso, R., Mata, P., Simon, L., Martinez, A. and Pocovi, M. (2006), Comparison of DNA array platform vs DNA sequencing as genetic diagnosis tools for familial hypercholesterolemia, *Clin Chem*, 52(10): 1971-1972.
- Tejedor, D., Castillo, S., Mozas, P., Jimenez, E., Lopez, M., Tejedor, M. T., Artieda, M., Alonso, R., Mata, P., Simon, L., Martinez, A., Pocovi, M. and Spanish, F. H. G. (2005), Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia, *Clin Chem*, 51(7): 1137-1144.
- Usifo, E., Leigh, S. E., Whittall, R. A., Lench, N., Taylor, A., Yeats, C., Orengo, C. A., Martin, A. C., Celli, J. and Humphries, S. E. (2012), Low-density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment, *Ann Hum Genet*, 76(5): 387-401.

7. Eskerrak eta oharrak

Esker onak Rocío Alonso teknikariari (UPV-EHU) bere laguntzagatik.