

# Come interpretare i risultati dell'analisi genetica nell'ipercolesterolemia familiare

Sebastiano Calandra<sup>1</sup>, Patrizia Tarugi<sup>2</sup>, Claudio Rabacchi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena;

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto.

Università di Modena e Reggio Emilia, Policlinico, Modena

## ■ INTRODUZIONE

La definizione di ipercolesterolemia familiare (FH) comprende disordini a trasmissione monogenica di tipo semi-dominante o recessivo che in passato erano definiti rispettivamente come Ipercolesterolemia familiare autosomica dominante (Autosomal Dominant Hypercholesterolemia, ADH) e ipercolesterolemia autosomica recessiva (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia, ARH). Indipendentemente dal tipo di trasmissione, questi disordini sono caratterizzati da elevati livelli di LDL-colesterolo (LDL-C) che sono dovuti a difetti del meccanismo responsabile per la rimozione delle LDL dal plasma mediata dal recettore LDL (LDL-R) (1-5).

I geni coinvolti nella ADH comprendono:

- 1) il gene *LDLR* che codifica il recettore delle LDL (ADH-1). Questo recettore è coinvolto nel processo di cattura, internalizzazione cellulare e conseguente degradazione delle LDL plasmatiche nei tessuti, particolarmente nel fegato;
- 2) il gene *APOB* che codifica l'apolipoproteina B-100 (ApoB-100), la maggiore com-

ponente proteica delle LDL responsabile del legame delle LDL al LDL-R (ADH-2);  
3) il gene *PCSK9* che codifica la proteina Protein Convertase Subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9), una proteina che promuove la degradazione intracellulare del LDL-R (ADH-3).

Nella ARH il gene coinvolto è *LDLRAP1* che codifica la proteina adattatrice coinvolta nel reclutamento di LDL-R in specifiche regioni della membrana cellulare degli epatociti per la internalizzazione del LDL-R nelle cellule. ADH-1 e ADH-2 sono causate da varianti di sequenza che determinano perdita di funzione (*Loss of function*, LOF variant) del gene *LDLR* o del gene *APOB* o da varianti geniche che determinano un guadagno di funzione (*Gain of function*, GOF variant) del gene *PCSK9*. ARH è dovuta a varianti LOF del gene *LDLRAP1* (1-7).

La caratterizzazione molecolare di un grande numero di pazienti ADH (eterozigoti ed omozigoti) ha mostrato che più del 90% di essi sono risultati portatori di varianti LOF del gene *LDLR*. Ad oggi, circa 3000 varianti di questo gene sono state riportate nelle banche dati disponibili. Molto meno numerose sono le varianti LOF (soltanto 16) del gene *APOB* che riducono il legame di LDL al LDL-R, che sono state riscontrate in 3-8% dei pazienti con FH. Circa l'1% dei pazienti FH sono

Autore corrispondente

Sebastiano Calandra

E-mail: sebcald@unimore.it

risultati portatori di 32 varianti GOF del gene *PCSK9*. Una ventina sono le varianti LOF del gene *LDLRAP1* che sono state riscontrate nei rari pazienti con ARH.

Vi sono altri disordini genetici del metabolismo del colesterolo a trasmissione monogenica recessiva che possono presentare ipercolesterolemia dovuta ad un aumento delle LDL plasmatiche simile a quello riscontrata nei pazienti FH. Tra questi disordini troviamo la Sitosterolemia, dovuta a varianti patogeniche dei geni *ABCG5/ABCG8* (coinvolti nell'assorbimento intestinale del colesterolo) e il Difetto di Lipasi Acida Lisosomiale, un enzima coinvolto nel metabolismo epatico del colesterolo, dovuta a varianti patogeniche del gene *LIPA*. L'analisi genetica di numerosi pazienti FH ha dimostrato che alcuni di essi sono risultati portatori eterozigoti sia di una variante patogenica dei geni candidati per FH (*LDLR, APOB, PCSK9*) che portatori eterozigoti di varianti patogeniche dei geni *ABCG5/ABCG8* o del gene *LIPA*. Questa rara condizione è definita come ipercolesterolemia familiare a eredità oligogenica (4, 8, 9).

È importante sottolineare che una grande percentuale (40-60%) di pazienti adulti con ipercolesterolemia primitiva non ha varianti patogeniche nei geni candidati; questi pazienti sono designati soggetti "fenotipo positivi/genotipo negativi". È stato riportato che una pro-

porzione variabile di questi soggetti ha ereditato una combinazione di varianti genetiche, frequenti nella popolazione, ognuna delle quali induce un modesto aumento dei livelli plasmatici di LDL-C, ma il cui effetto combinato può essere causa di un aumento di LDL-C simile a quello osservabile in pazienti FH "fenotipo positivo/genotipo positivo" (Eredità poligenica, Polygenic burden) (4, 8, 9).

È opportuno ricordare che il termine "variante genica" è oggi impiegato per indicare qualsiasi variazione della sequenza del gene oggetto di studio, a prescindere dal suo impatto biologico. Il termine "variante patogenica" ed il termine "variante verosimilmente patogenica" indicano una variante che è causa certa o altamente probabile del disordine genetico oggetto di studio (es. FH). Questi termini sono oggi usati in sostituzione rispettivamente di "mutazione" e "polimorfismo" impiegati in passato.

In un paziente con sospetta diagnosi di FH omozigote (HoFH) a trasmissione semi-dominante possiamo riscontrare tre diversi assetti genotipici:

- 1) presenza di due identiche varianti patogeniche dello stesso gene candidato (*LDLR\*/LDLR\**, *APOB\*/APOB\**, *PCSK9\*/PCSK9\**). In passato tale paziente era definito come "omozigote vero"; oggi è indicato come affetto da FH a trasmissione semi-dominante

**TABELLA 1 • Nuova nomenclatura genetica per il fenotipo clinico Ho-FH.**

Terminologia clinica tradizionale	Terminologia basata sulla genetica molecolare	Commenti
IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE OMOZIGOTE (Ho-FH) <i>Termine generico che include uno spettro di diagnosi genetiche</i>	Ipercolesterolemia bi-allelica semi-dominante: monogenica (singolo gene causativo) - 2 copie di varianti identiche - 1 singola copia di 2 varianti diverse	"Semi-dominante" indica che i familiari portatori di un singolo allele mutato (eterozigoti) hanno un fenotipo meno severo - Precedentemente chiamato "omozigote vero" - Precedentemente chiamato "eterozigote composto"
	Ipercolesterolemia bi-allelica semi-dominante: digenica (due diversi geni causativi) - 1 singola copia di 2 varianti diverse	"Semi-dominante" indica che i familiari portatori di un singolo allele mutato (eterozigoti) hanno un fenotipo meno severo - Precedentemente chiamato "doppio eterozigote"
	Ipercolesterolemia bi-allelica recessiva (ARH): monogenica (singolo gene causativo) - 2 copie di varianti identiche - 1 singola copia di 2 varianti diverse	I genitori eterozigoti del paziente sono "portatori veri" con fenotipo clinico e biochimico normale - Precedentemente chiamato ARH "omozigote vero" - Precedentemente chiamato ARH "eterozigote composto"

- di tipo monogenico, portatore di due copie di una identica variante dello stesso gene (portatore bi-allelico) (*Tabella 1*);
- 2) presenza di due varianti patogeniche diverse dello stesso gene candidato (*LDLR+ / LDLR\**; *APOB+ / APOB\**; *PCSK9+ / PCSK9\**) ereditate dai genitori portatori eterozigoti rispettivamente di una delle due varianti. In passato tale paziente era definito come “eterozigote composto”; oggi è indicato come affetto da FH a trasmissione semi-dominante di tipo monogenico portatore bi-allelico di una copia di due differenti varianti dello stesso gene (*Tabella 1*);
  - 3) presenza di due varianti patogeniche di due geni candidati diversi (*LDLR\* / APOB\**; *LDLR\* / PCSK9\**; *APOB\* / PCSK9\**) ereditate dai genitori ciascuno eterozigote per una delle due varianti. In passato, tale paziente era definito come “doppio eterozigote”; oggi è indicato come affetto da FH a trasmissione semi-dominante di tipo digenico in quanto portatore di una copia di due varianti patogeniche di due geni diversi (*Tabella 1*).

## ■ CLASSIFICAZIONE E INTERPRETAZIONE CLINICA DELLE VARIANTI

La classificazione e la interpretazione clinica delle varianti si basa su diverse osservazioni:

- 1) la frequenza della variante annotata nelle banche dati di popolazione (es. 1000 Genomes, dbSNP);
- 2) la frequenza della variante nei soggetti affetti rispetto ai soggetti sani;
- 3) la presenza della variante nelle banche dati specifiche per gene/malattia (es. HGMD, LOVD);
- 4) il tipo di variante (missenso, nonsense, frameshift, ecc.);
- 5) la valutazione funzionale mediante sistemi di predizione *in silico* (es. Polyphen-2, SIFT, CADD);
- 6) la localizzazione della variante in regioni “calde” del gene (hot spots);
- 7) studi funzionali della variante in sistemi biologici;

- 8) dati derivanti dalla letteratura scientifica (es. PubMed);
- 9) segregazione della variante con il fenotipo clinico (es. OMIM, ClinVar);
- 10) modalità di trasmissione della variante.

L’American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) e l’Association for Molecular Pathology (AMP) hanno sviluppato linee guida per classificare le varianti in base al loro impatto biologico, distinguendo le seguenti classi funzionali:

- 1) *variante patogena* (pathogenic variant, P);
- 2) *variante probabilmente patogena* (likely pathogenic, LP);
- 3) *variante di significato incerto* (variant of uncertain significance, VUS);
- 4) *variante probabilmente benigna* (likely benign, LB);
- 5) *variante benigna* (benign variant, B).

La ACMG/AMP ha anche proposto i criteri da adottare per assegnare un ruolo patogenico alle varianti riscontrate nell’analisi del gene in esame (10).

## ■ IDENTIFICAZIONI DI VARIANTI GENICHE NELLA FH

### Gene *LDLR*

Il sequenziamento di questo gene nei pazienti con ADH-1 (eterozigoti ed omozigoti) ha portato alla identificazione di un’ampia serie di varianti di diversa tipologia sia riguardo al tipo di variante (vedi oltre) che alla sua specifica localizzazione nel gene. La tipologia delle varianti riscontrate è riassunta nella *tabella 2*. Le varianti più frequentemente riscontrate sono sostituzioni e delezioni di singoli nucleotidi, anche se non mancano delezioni o inserzioni di grandi dimensioni. Riguardo alla attribuzione di patogenicità si può affermare che alcuni tipi di varianti siano probabilmente patogeniche anche in assenza di studi funzionali; è il caso di delezioni, inserzioni, varianti che provocano l’inserimento di codoni di terminazione del mRNA, varianti nei siti di splicing, sostituzione di singoli nucleotidi che determinano la formazione di un codone di terminazione del mRNA. Ciò non si applica direttamente a quelle varianti di singoli nucle-

**TABELLA 2 •** Tipi di varianti nella sequenza del DNA.

Tipo di variante	Descrizione
Sostituzione	Un singolo nucleotide è stato sostituito da un nucleotide diverso
Delezione	Uno o più nucleotidi sono stati eliminati
Inserzione	Uno o più nucleotidi sono stati inseriti
Duplicazione	Uno o più nucleotidi sono stati duplicati in tandem
Delezione-inserzione	Uno o più nucleotidi sono stati eliminati e rimpiazzati da uno o più nucleotidi diversi
Inversione	Uno o più nucleotidi sono stati invertiti nella loro sequenza complementare

otidi che determinano la sostituzione di singoli aminoacidi a livello del LDL-R (varianti missenso). In questo caso, l'attribuzione di patogenicità deve basarsi su una serie di criteri condivisi dalla comunità scientifica come da indicazioni di ACMG/AMP (vedi oltre).

### Gene *APOB*

Nel caso del gene *APOB*, le varianti riscontrate in pazienti con FH (ADH-2) sono un numero molto ridotto e sono tutte sostituzioni di singoli nucleotidi che determinano la sostituzione di singoli aminoacidi (varianti missenso). Tra queste sostituzioni, particolare rilievo rivestono quelle che riguardano la regione della proteina ApoB ritenuta costituire il principale sito di legame dell'ApoB con il LDL-R. Nel caso specifico, vi è una singola variante prevalente nella popolazione caucasica, che determina la sostituzione dell'arginina in posizione 3527 della proteina ApoB con l'aminoacido glutammina.

### Gene *PCSK9*

Anche per questo gene, le varianti più frequentemente riscontrate nei pazienti FH (ADH-3) sono sostituzioni di singoli nucleotidi che determinano variazioni di singoli aminoacidi. In questo caso, tali sostituzioni possono determinare un guadagno di funzione della proteina PCSK9 (varianti GOF), responsabili di una aumentata degradazione del LDL-R.

### Gene *LDLRAP1*

La rara ipercolesterolemia autosomica recessiva (ARH) è dovuta prevalentemente a varianti nonsense e frameshift che causano la

formazione di proteine LDLRAP1 troncate e non funzionali.

## ■ ATTRIBUZIONE DI PATOGENICITÀ ALLE VARIANTI MISSENSO

L'attribuzione di patogenicità particolarmente nel caso di varianti missenso è resa possibile dall'impiego di tre diverse strategie di indagine, che comprendono:

- 1) prove biologiche funzionali;
- 2) studi di co-segregazione nelle famiglie;
- 3) analisi bio-informatiche (11-13).

### Prove biologiche funzionali

Nel caso di varianti missenso dei geni *LDLR* e *LDLRAP1* (ADH-1 e ARH), le prove funzionali comportano l'incubazione di cellule derivate dal paziente (fibroblasti cutanei o linfoblasti derivati da linfociti del sangue) con LDL "normali" marcate con isotopo radioattivo o con sostanza fluorescente, al fine di stabilirne, il legame, la internalizzazione e la degradazione intracellulare in confronto a cellule derivate da un soggetto sano di controllo. Nel caso del gene *APOB* (ADH-2), lo studio funzionale consiste nella incubazione di fibroblasti o linfociti/linfoblasti di un soggetto normale in presenza di LDL isolate dal paziente portatore della variante della proteina ApoB per verificarne la capacità di legame al LDL-R.

La presenza di varianti aminoacidiche nella proteina PCSK9 (ADH-3) prevede l'impiego di diverse tecniche per determinare alcune proprietà della variante di PCSK9, quali il clivaggio autocatalitico, la espressione della

proteina, l'effetto della variante sull'attività del LDL-R e la sua affinità per LDL-R (14). È superfluo sottolineare che le prove funzionali richiedono laboratori dedicati con esperienza specifica e risorse finanziarie adeguate che sono disponibili in un numero limitato di centri che si occupano di genetica della FH.

### Studi di co-segregazione

Queste indagini prevedono lo screening della variante genica riscontrata nel paziente (caso indice) in tutti i familiari disponibili. L'obiettivo è verificare se la variante riscontrata nel caso indice sia presente in altri membri della famiglia con FH e non si riscontri nei familiari normocolesterolemici. Tanto maggiore è il numero di familiari esaminati tanto più informativo è questo screening.

### Analisi bio-informatiche

L'analisi bio-informatica (analisi *in silico*) delle varianti missenso si basa sul confronto fra i caratteri fisico-chimici della proteina

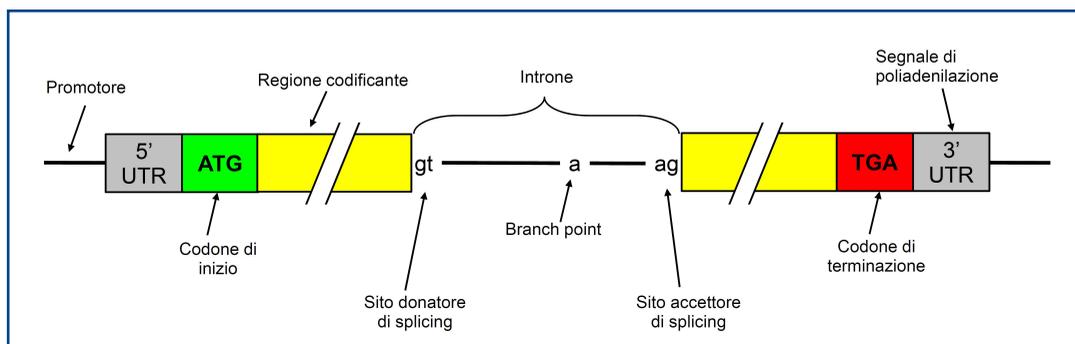
mutata con quelli della proteina normale, condotto sulla base di alcune caratteristiche quali:

- 1) proprietà fisico-chimiche dell'aminoacido mutato;
  - 2) grado di conservazione del dominio della proteina contenente l'aminoacido in questione nel corso dell'evoluzione;
  - 3) proprietà strutturali della proteina mutata.
- È oggi disponibile un software integrato (sistema REVEL) che permette di considerare simultaneamente le varie proprietà della proteina mutata (15).

## ■ REFERTO GENETICO-MOLECOLARE

Il referto genetico deve riportare i geni che sono stati analizzati, la metodologia di sequenziamento genico e fornire una descrizione accurata delle varianti riscontrate. Possono emergere i seguenti scenari:

- 1) presenza di una variante rara in uno dei



**FIGURA 1** • Regioni del gene in cui le varianti possono influenzare la funzione genica.

1) Varianti nella regione del promotore possono influenzare l'espressione genica aumentandola o riducendola in vario grado fino alla abolizione di funzione; 2) varianti nella regione 5' non tradotta (5'UTR) partecipano alla regolazione della traduzione della proteina a livello dei ribosomi; 3) varianti nel codone di inizio della traduzione possono bloccare la traduzione causando la riduzione/assenza della proteina; 4) varianti nella regione codificante la proteina possono avere effetti diversi, nella maggior parte dei casi si può formare una proteina strutturalmente alterata con l'acquisizione di nuove funzioni o perdita della funzione originaria. Ad esempio, le varianti missenso (in cui un aminoacido è sostituito con un aminoacido diverso) possono alterare la funzione della proteina e/o alterare la sua stabilità ed il suo metabolismo intra- ed extra-cellulare. Le varianti nonsense (in cui un aminoacido è sostituito da un codone di stop) causano l'arresto della traduzione della proteina con conseguente formazione di una proteina troncata. Le varianti "frameshift" che consistono in delezioni, inserzioni o delins (contemporanea delezione ed inserzione di nucleotidi) di un numero di nucleotidi non multiplo di 3 comportano lo scorrimento della trama di lettura del mRNA producendo un codone di terminazione prematuro con formazione di una proteina troncata; 5) varianti nella sequenza non codificante, localizzate nei siti di splicing o negli introni, possono influenzare la maturazione del mRNA la cui sequenza potrebbe essere alterata a causa della perdita completa o parziale di sequenze codificanti. Varianti di splicing possono indurre alterazioni della trama di lettura del mRNA con la formazione di codoni di terminazione prematuri e la conseguente formazione di proteine troncate.

geni candidati già dimostrata essere patologica o probabilmente patologica da prove funzionali *in vitro*, studi di co-segregazione, analisi bioinformatica *in silico* (diagnosi genetica positiva per variante FH-causativa);

- 2) presenza di una variante rara in uno dei geni candidati non riportata in banche dati e non ancora sostenuta da studi funzionali (variante di incerto significato, VUS) ma che in base ad analisi bio-informatica *in silico* è risultata avere un effetto *deletorio* (diagnosi probabilmente positiva). In questo caso, l'attribuzione di patogenicità richiederebbe l'analisi di co-segregazione e studi di popolazione ed eventualmente l'analisi funzionale *in vitro* e l'analisi del carico poligenico (Polygenic risk score);
- 3) presenza di una variante rara in uno dei geni candidati non riportata in banche dati e non ancora sostenuta da studi funzionali (variante di incerto significato, VUS) ma che in base ad analisi bio-informatica *in silico* è risultata avere effetto *benigno* (diagnosi incerta). In questo caso, l'attribuzione di patogenicità richiederebbe l'analisi di co-segregazione e studi di popolazione ed eventualmente l'analisi funzionale *in vitro* e l'analisi del carico poligenico (Polygenic risk score);
- 4) assenza di varianti rare in uno dei geni candidati (fenotipo positivo/genotipo negativo) con polygenic risk score elevato (>90° percentile) (diagnosi di ipercolesterolemia poligenica);
- 5) assenza di varianti rare in uno dei geni candidati (fenotipo positivo/genotipo negativo) con polygenic risk score negativo (diagnosi genetica negativa);
- 6) presenza di varianti comuni (polimorfismi) a basso impatto biologico (diagnosi genetica negativa).

Quando l'analisi genetica indica la presenza di una variante rara, come ai punti 2 e 3, non ancora funzionalmente caratterizzata, l'analisi bioinformatica può essere considerata uno strumento utile per definire la probabilità che tale variante abbia un effetto biologico patogenico o benigno. Comunque sia, in questi casi il

clinico, in attesa di un risultato definitivo che può derivare da ulteriori studi, è chiamato a procedere al trattamento ipolipemizzante più idoneo per il paziente sulla base della gravità del fenotipo clinico e della storia familiare.

## ■ CONCLUSIONI

A fronte di un paziente con ipercolesterolemia primitiva, l'analisi genetica rappresenta una tappa fondamentale del procedimento diagnostico. Le attuali tecnologie di sequenziamento consentono di effettuare la sequenza in parallelo di un pannello di geni coinvolti a vario titolo nel metabolismo del colesterolo. Nel caso della Ipercolesterolemia Familiare (FH), i geni candidati coinvolti nella forma semi-dominante (ADH-1, ADH-2 e ADH-3) sono rispettivamente *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* ed il gene coinvolto nella forma recessiva (ARH) è il gene *LDLRAP1*. Il maggior numero di varianti geniche causative (varianti patogeniche) riguarda il gene *LDLR*. Il tipo di varianti e la loro localizzazione nel gene sono molto variabili. L'attribuzione di patogenicità ad una variante è basata su diversi criteri tra cui la prova funzionale biologica *in vitro*, la dimostrazione di una co-segregazione della variante con il fenotipo FH, e analisi bio-informatiche condotte con diversi algoritmi. Nel caso che non siano riscontrate varianti nei geni candidati è probabile che il fenotipo ipercolesterolemico sia il risultato della presenza, in vari geni del genoma, di varianti a basso impatto biologico, capaci singolarmente di determinare un minimo incremento di LDL-C, ma il cui effetto combinato può determinare un incremento sostanziale dei livelli di LDL-C paragonabili a quello dovuto a varianti patogeniche del gene *LDLR*. Si parla in questo caso di eredità poligenica (Carico poligenico) che può essere quantificata dimostrando la presenza di queste varianti nel genoma.

## ■ BIBLIOGRAFIA

1. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In C.R. Scriver, A.L.

- Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, eds, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill 2001; 2863-2913.
- Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*. 2015; 161: 161-172.
  - Defesche JC, Gidding SS, Harada-Shiba M, et al. Familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17093.
  - Berberich AJ, Hegele RA. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol*. 2019; 16: 9-20.
  - Bertolini S, Pisciotta L, Rabacchi C, et al. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*. 2013; 227: 342-348.
  - Bertolini S, Calandra S, Arca M, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia in Italy: Clinical and molecular features. *Atherosclerosis*. 2020; 312: 72-78.
  - D'Erasmus L, Di Costanzo A, Arca M. Autosomal recessive hypercholesterolemia: update for 2020. *Curr Opin Lipidol*. 2020; 31: 56-61.
  - Tada H, Nohara A, Kawashiri MA. Monogenic, polygenic, and oligogenic familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*. 2019; 30: 300-306.
  - Di Taranto MD, Fortunato G. Genetic Heterogeneity of Familial Hypercholesterolemia: Repercussions for Molecular Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 3224.
  - Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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.
  - Benito-Vicente A, Alves AC, Etxebarria A, et al. The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genet Med*. 2015; 17: 980-988.
  - Bourbon M, Alves AC, Sijbrands EJ. Low-density lipoprotein receptor mutational analysis in diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*. 2017; 28: 120-129.
  - Chora JR, Iacocca MA, Tichy L, et al. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for LDLR variant classification. *Genet Med*. 2022; 24: 293-306.
  - Larrea-Sebal A, Trenti C, Jebari-Benslaiman S, et al. Functional Characterization of p. (Arg-160Gln) PCSK9 Variant Accidentally Found in a Hypercholesterolemic Subject. *Mol Sci*. 2023; 24: 3330.
  - Larrea-Sebal A, Jebari-Benslaiman S, Galicia-Garcia U, et al. Predictive Modeling and Structure Analysis of Genetic Variants in Familial Hypercholesterolemia: Implications for Diagnosis and Protein Interaction Studies. *Curr. Atheroscler. Rep*. 2023; 25: 839-859.