

**IDENTIFICATION AND CONFIRMATION OF
UNKNOWN MUTATIONS AT
LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR LOCUS**

PORNSIRIN CHUNHAPIMON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-5541-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การค้นหและการยืนยันผลของการกลายพันธุ์ในยีน LDL receptor (IDENTIFICATION AND CONFIRMATION OF UNKNOWN MUTATIONS AT THE LDL RECEPTOR LOCUS)

พรศิริรินทร์ ชูณหพิมล 4437346 SIBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: คล้ายอัปสร พงศ์พิพร, Ph.D., พิภพ จิรภิญโญ, M.D., อธิป ลิขิตลิขิต, M.Sc.

บทคัดย่อ

Familial hypercholesterolemia เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน LDL receptor ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของ LDL receptor protein ผิดปกติ ส่งผลให้เกิดภาวะโคเลสเตอรอลสูงในกระแสเลือด การศึกษานี้ใช้เทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) ในการค้นหาการกลายพันธุ์ในคนไทยที่มีภาวะโคเลสเตอรอลสูงแบบปฐมภูมิ ซึ่ง DNA ที่พบ Abnormal SSCP pattern ได้ถูกวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยใช้เทคนิค automated DNA sequencing การเปลี่ยนแปลงของเบสที่เกิดขึ้นจะยืนยันผลโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) หรือเทคนิค allele specific amplification (ASA) จากการศึกษานี้พบว่ามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นทั้งหมด 4 ตำแหน่งและความหลากหลาย 1 ตำแหน่ง ได้แก่ 313+1 G>T, E153K, M391T, S554L และ G1414A ตามลำดับ โดยตำแหน่งที่ 313+1 G>T, E153K, M391T ถูกนำไปค้นหาการกลายพันธุ์ในคนที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในระดับปกติจำนวน 100 คน โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และ ASA ผลจากการศึกษาว่าไม่มีการกลายพันธุ์เหล่านี้ในคนปกติ สำหรับ E153K การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ได้ถูกพบในเด็กชายอายุ 10 ขวบและในพ่อของเด็กโดยที่ไม่พบในแม่ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้จึงน่าจะเป็นสาเหตุของภาวะโคเลสเตอรอลสูงทั้งพ่อและลูก โดยเฉพาะในลูกมีภาวะโคเลสเตอรอลที่สูงมากอาจเป็น compound heterozygous FH โดยอาจได้รับการถ่ายทอดการกลายพันธุ์อีกตำแหน่งหนึ่งจากแม่ซึ่งมีภาวะโคเลสเตอรอลสูงและมีอาการของโรคหลอดเลือดหัวใจ ขณะนี้อยู่ในระหว่างขั้นตอนการศึกษา จากการเปรียบเทียบ amino acid ในหลายสายพันธุ์ พบว่าการกลายพันธุ์เหล่านี้เป็นผลให้เกิดการแทนที่ของ amino acid แบบ non-conservative substitution ใน conserved region ของ receptor protein และน่าจะมีผลให้ต่อการทำงานของโปรตีน ส่วน G1414(R471) พบเฉพาะ ในผู้ที่มีภาวะโคเลสเตอรอลสูงทั้งหมด 5 คน โดยที่ทั้ง 5 คนนี้ไม่มี ความเกี่ยวข้องกัน ความหลากหลายที่ตำแหน่งนี้มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล (NCBI) และน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะโคเลสเตอรอลสูงในผู้ป่วยเหล่านี้

94 หน้า ISBN 974-04-5541-7

IDENTIFICATION AND CONFIRMATION OF UNKNOWN MUTATIONS AT THE LDL RECEPTOR LOCUS.

PORNIRIN CHUNHAPIMON 4437346 SIBC/M:

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: KLAI-UPSORN PONGRAPEEPORN Ph.D., PIPOP JIRAPINYO M.D. ATIP LIKIDLILID M.Sc.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is caused by a defect in the function of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and is inherited in an autosomal dominant pattern. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was used to screen for mutations at the LDL receptor locus in Thai subjects with primary hypercholesterolemia. The abnormal SSCP patterns were subjected to direct DNA sequencing and secondary confirmation by examination of the DNA fragment used for sequencing, either by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) or allele specific amplification (ASA). Four mutations and one polymorphism, 313+1 G>T, E153K, M391T, S554L and G471A, respectively were found. Three mutations (313+1 G>T, M391T, S554L) were screened in a group of 100 normolipidemic subjects by PCR-RFLP and ASA. From this screening, these mutations were not observed in control DNA samples (n=100). The E153K mutation was observed in a 10 years old Thai boy and his father. The E153K mutation was not present in the boy's mother. It might be a pathogenic mutation causing the hypercholesterolemic condition in the boy and his father. Since the boy has severe hypercholesterolemia, then, boy may be a compound heterozygous FH and has inherited another FH causing mutation from his mother. G471A polymorphism, the abnormal SSCP pattern was observed in five unrelated patients. Two in five of the abnormal SSCP patterns were subjected to sequencing analysis. From amino acid sequence alignments, these mutations cause non-conservative substitution in the relatively conserved region of the protein molecule and thus may consequently disturb the function of the receptor protein. These findings, including the absence of these mutations in normolipidemic subjects, suggest that these mutations are pathogenic and could be the possible cause of the hypercholesterolemic condition in these index subjects.

**KEY WORDS : LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR/ FAMILIAL
HYPERCHOLESTEROLEMIA/
PRIMARY HYPERCHOLESTEROLEMIA**

94 P. ISBN 974-04-5541-7