

**MOLECULAR FUNCTION ANALYSIS OF LDLR MUTATIONS  
IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MEDICAL TECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2010**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

**MOLECULAR FUNCTION ANALYSIS OF LDLR MUTATIONS IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA**

NUTJAREE JEENDUANG      4836642 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D.,  
KLAI-UPSORN PONGRAPEEPORN, Ph.D.,  
SUREERUT PORNTADAVITY, Ph.D.**ABSTRACT**

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder which is caused by the mutation of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene. FH is characterized by elevated plasma LDL cholesterol (LDL-C), tendon xanthomas, and premature coronary heart disease (CHD). In this study, structural and functional characteristics of two novel LDLR mutations, D151Y and M391T, that are found in Thai heterozygous FH patients were clarified. Both mutations were located in conserved residues of different functional domains of LDLR. The changing of the hydrogen bond pattern, solvent accessibility area, a negative charge, and conformation of the  $\beta$ -strand were observed in D151Y and M391T, suggesting their irregular structure may cause a deleterious effect on the function of LDLR. As expected, the functional defect of these mutations was elucidated after being studied in transfected CHO-*ldla7* cells with wild type and mutant LDLR cDNAs. D151Y and M391T were defined as class 2B (transport-defective) mutations, and the reduction of their cell-surface LDLR expression to 18% and 38%, as well as the level of LDL uptake to 12% and 86%, respectively, were observed. In addition, we also developed the array primer extension (APEX) microarray in order to perform simultaneous multigene (LDLR, apoB-100, PCSK9, apoE, and CETP) detection. The optimization of hybridization temperature at 55°C and DNA template sizes between 50-150 bp were successful. Our APEX microarray enabled us to discriminate individual genotypes from blind DNA samples. Our findings suggest that together with the APEX microarray used as molecular diagnosis in hypercholesterolemia patients, structural and functional study can confirm these FH-causing mutations.

**KEY WORDS:** ARRAYED PRIMER EXTENSION/ DNA MICROARRAY /  
FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA/ FUNCTIONAL  
ANALYSIS / LDLR/ MUTATION / STRUCTURAL ANALYSIS

138 pages

การศึกษาการทำงานระดับโมเลกุลของตัวรับ แอล ดี แอล ในผู้ป่วยโรคแฟมมิลีเลียล ไฮเปอร์  
โคเลสเตอรอลลิเมีย

MOLECULAR FUNCTION ANALYSIS OF LDLR MUTATIONS IN FAMILIAL  
HYPERCHOLESTEROLEMIA

นุชจรี จินด้าง 4836642 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : จำรัส พร้อมมาศ Ph.D., กล้ายอัสพร พงศ์พีพร Ph.D.,  
สุรียรัตน์ พรธาดาวิทย์ Ph.D.

บทคัดย่อ

แฟมมิลีเลียล ไฮเปอร์โคเลสเตอรอลลิเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดถ่ายทอดทางยีนเด่น  
ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน LDLR ผู้ป่วยโรคนี้มีไขมันในเลือดสูง และมีไขมันสะสมใต้ผิวหนัง เส้น  
เอ็น หรือกระดูก และมักเกิดโรคหัวใจได้เร็วกว่าคนปกติ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบาย  
การกลายพันธุ์ของยีน LDLR ที่พบในคนไทยสองตำแหน่ง คือ D151Y และ M391T ในการก่อให้เกิด  
พยาธิสภาพของโรค จากการศึกษาโครงสร้างการกลายพันธุ์ในสองตำแหน่งนี้ พบว่าเกิดขึ้นในบริเวณ  
อนุรักษณ์ของโครงสร้างในส่วนที่ทำหน้าที่ต่างกันของ LDLR และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของพันธะ  
ไฮโดรเจน พื้นที่การสัมผัสของเหลว ประจุ และการบิดงอในโครงสร้างสามมิติของการกลายพันธุ์สอง  
ตำแหน่งนี้ และเมื่อศึกษาหน้าที่พบว่า LDLR ชนิด D151Y และ M391T บกพร่องในขั้นตอนการขนส่ง  
โปรตีน ทำให้มีโปรตีนค้างค้างอยู่ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ส่งผลให้ LDLR บนผิวเซลล์ลดลงเหลือ 18  
เปอร์เซ็นต์ และ 38 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถนำ แอล ดี แอล โคเลสเตอรอล เข้าสู่เซลล์ลดลงเหลือ  
12 เปอร์เซ็นต์ และ 86 เปอร์เซ็นต์ ในการกลายพันธุ์ชนิด D151Y และ M391T ตามลำดับ นอกจากนี้ยัง  
ได้พัฒนาเทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์สำหรับตรวจคัดกรองการกลายพันธุ์ของยีน LDLR, apoB-100,  
PCSK9 และความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน apoE และ CETP ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม  
สำหรับการเข้าสู่ของดีเอ็นเอคือ 55°C และขนาดของเป้าหมายดีเอ็นเอคือ 50-150 bp ทั้งนี้ไมโครอาร์เรย์  
สามารถแยกแยะจีโนไทป์ที่ต่างกันในแต่ละตัวอย่างได้ การศึกษาทั้งหมดนี้จึงยืนยันได้ว่าการกลายพันธุ์  
D151Y และ M391T เป็นสาเหตุการเกิดโรคแฟมมิลีเลียลไฮเปอร์โคเลสเตอรอลลิเมีย และเทคนิคไมโคร  
อาร์เรย์สามารถที่จะนำไปใช้วินิจฉัยในระดับโมเลกุลในผู้ป่วยไขมันในเลือดสูงต่อไป

138 หน้า