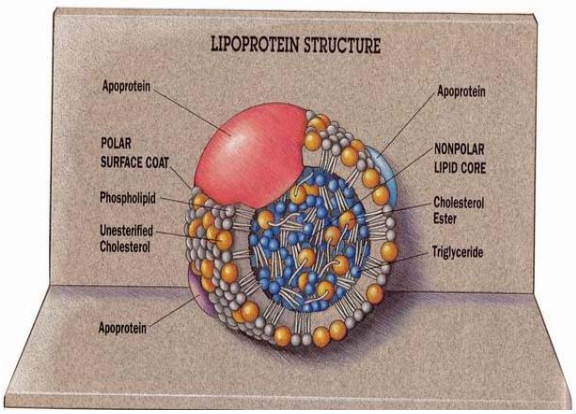
ความสัมพันธ์ของความหลากหลายยีน apolipoprotein B กับภาวะไขมันในเลือดสูง

(Relationship of Apolipoprotein B Gene Polymorphisms with Hyperlipidemia)

นันท์นภัส เติมวงศ์*

*สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

ภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) หมายถึงภาวะที่มีการสูงขึ้นของระดับคอเลสเทอรอล (cholesterol) และ/หรือ ไทรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เนื่องจากคอเลสเทอรอลและไทรกลีเซอไรด์มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำจึงรวมตัวอยู่ในอนุภาคที่เรียกว่าลิโพโปรตีน (lipoprotein) นอกจากนี้โครงสร้างพื้นฐานของลิโพโปรตีน (ภาพที่ 1) ยังประกอบไปด้วยไขมันประเภทฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และมีโปรตีนมาห่อหุ้มที่ผิวของอนุภาคซึ่งเรียกว่า apolipoprotein (apo) (พรทิพย์ โล่ห์เลขา, 2536; Grundy, 1990; www.navy.mi.th/navylady/content/article712.htm) โดยความผิดปกติของภาวะไขมันในเลือดสูงอาจเกิดจากอัตราสังเคราะห์และ/หรือการกำจัดลิโพโปรตีนออกจากกระแสเลือด นอกจากนี้ความผิดปกติอาจเกี่ยวข้องกับ apolipoprotein เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิพิดและ/หรือตัวรับ (receptor) ซึ่งโดยปกติสามารถตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของระดับคอเลสเทอรอลและไทรกลีเซอไรด์ได้จากกระแสเลือด แต่อย่างไรก็ตามลักษณะที่แสดงออกของยีน (phenotype) ดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่จะเข้าใจถึงพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นอย่างแท้จริง (Bhagaven, 1992; Schuttz et al., 1997)



ภาพที่ 1. โครงสร้างพื้นฐานของลิโพโปรตีน
ที่มา : (Grundy, 1990)

สาเหตุเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง

สาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงจำแนกได้ 2 ชนิดดังนี้ (Stein, 1987; Durrington, 1995; www.navy.mi.th/navylady/content/article712.htm)

1. ภาวะไขมันในเลือดสูงชนิดปฐมภูมิ

(primary of familial or sporadic hyperlipidemia) สาเหตุของการเกิดไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเกิดจากพันธุกรรมมีความผิดปกติทำให้มีการสังเคราะห์ apo B-100 (apolipoprotein B-100) มากเกินไป ส่งผลให้ลิโพโปรตีนที่มี apo B-100 เป็นองค์ประกอบเช่น VLDL (very low density lipoprotein) และ LDL (low density lipoprotein) เพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด และ/หรือความผิดปกติตรงบริเวณ LDL receptor หรือ apo B-100 ส่งผลให้การกำจัด LDL ในกระแสเลือดลดลงทำให้ระดับ LDL ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น

2. ภาวะไขมันในเลือดสูงชนิดทุติยภูมิ

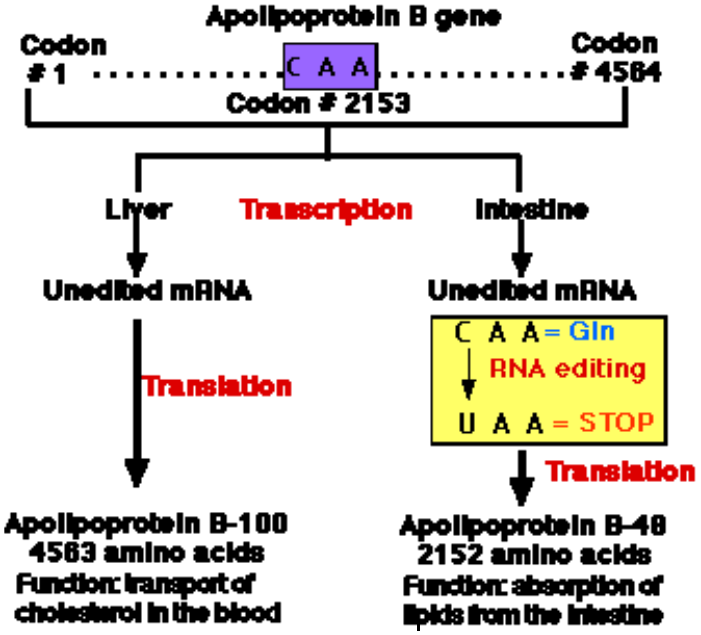
(secondary hyperlipidemia) สาเหตุการเกิดที่สำคัญได้แก่การรับประทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง หรือได้รับพลังงานสูง หรือรับประทานอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวสูง การตั้งครรภ์ การดื่มแอลกอฮอล์ โรคเบาหวาน ภาวะไทรอยด์ฮอร์โมนต่ำ ไตวายเรื้อรัง ท่อทางเดินน้ำดีอุดตัน โรคตับหรือมีภาวะ uremia นอกจากนี้การได้รับยาบางชนิดเช่น สเตรอยด์ ยาเม็ดคุมกำเนิด มีผลทำให้ไขมันในเลือดสูงขึ้นได้

เนื่องจาก apo B-100 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ LDL และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิพิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือด จากการศึกษาทางระบาดวิทยาในประชากรทั่วโลกพบว่าการเกิดความหลากหลาย (polymorphism) ของยีนใน apo B-100 ส่งผลทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง และมีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (coronary heart disease) (Poledne et al., 1993; Jorde et al., 1995; Meisenberg et al., 1998) เนื่องจากลักษณะทางองค์ประกอบของยีน (genotype) จะไม่เปลี่ยนแปลงจากกระบวนการเกิดโรค เวลา และวิถีชีวิต ดังนั้นการตรวจลักษณะทางองค์ประกอบของยีนapo B-100 จึงใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ในประชากร เพื่อเป็นประโยชน์ในการพยากรณ์โอกาสและความรุนแรงของการเกิดโรค นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับบุคคลที่มีความเสี่ยงเพื่อป้องกันการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน

Apolipoprotein B (apo B)

Apolipoprotein B เป็น apolipoprotein ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของมนุษย์ ซึ่งสังเคราะห์ได้จากทั้งเซลล์ตับและเซลล์ลำไส้เล็ก และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของลิโพโปรตีนเช่น chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL), intermediate density lipoprotein (IDL) และ low density lipoprotein (LDL) (Stein, 1987; Parums, 1996) apo B มีบทบาทสำคัญในการขนส่งและกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิโพโปรตีนและรักษาสภาวะสมดุลของคอเลสเทอรอลในกระแสเลือด apo B มีความเข้มข้นในกระแสเลือด 0.7-1.0 mg/ml (Herbert et al., 1982) จากการศึกษาของ Kane และคณะในปี ค.ศ. 1980

Apo B-48 สังเคราะห์ที่ลำไส้เล็ก และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของลิโพโปรตีนชนิด chylomicron และ chylomicron remnant นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการดูดซึมอาหารประเภทไขมัน และวิตามินที่ละลายในไขมันบริเวณลำไส้เล็ก (Goldstein et al., 1982; Law et al., 1986) โครงสร้างของ apo B-48 ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่า apo B-48 ประกอบด้วยบริเวณ NH_2-terminal ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ของ apo B-100 แม้ว่ายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ apo B เป็นยีนเดียวกัน โดยการสังเคราะห์ apo B-100 ที่ตับประกอบด้วยกรดอะมิโน 4,563 ตัว แต่เมื่อเกิด mRNA editing ในการสังเคราะห์ apo B ที่ลำไส้เล็กที่ codon 2153 ทำให้เกิด stop codon ในลำไส้เล็กและการแปลรหัส (translation) หยุดลง จึงมีกรดอะมิโนเหลือเพียง 2,152 ตัว เท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ของ apo B-100 ทำให้ได้ apo B-48 (นีโลบล เนื่องตัน, 2542; Chen et al., 1987) (ภาพที่ 2) พบว่า apo B-48 ขาดส่วน carboxyl-terminal ซึ่งบริเวณ carboxyl-terminal พบใน apo B-100 และเป็นบริเวณที่ไปจับกับ LDL receptor ดังนั้น apo B-48 จึงไม่สามารถจับกับ LDL receptorได้จึงไม่มีบทบาทในการกำจัด chylomicron remnant ออกจากกระแสเลือด



ภาพที่ 2. mRNA editing ของ apo B mRNA codon ที่ 2153 ในตับบริเวณ exon ที่ 26 เป็น CAA ซึ่งเป็นรหัสสำหรับกรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) แต่ในลำไส้เล็กเปลี่ยนเป็น UAA ซึ่งเป็น stop codon ทำให้กระบวนการแปลรหัสหยุดลง จึงมีกรดอะมิโนเหลือเพียง 2152 ตัว ทำให้ได้ apo B-48 ซึ่งตรงกับบริเวณ NH_2-terminal ของ apo B-100

ที่มา : (http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RNA_editing2.gif)

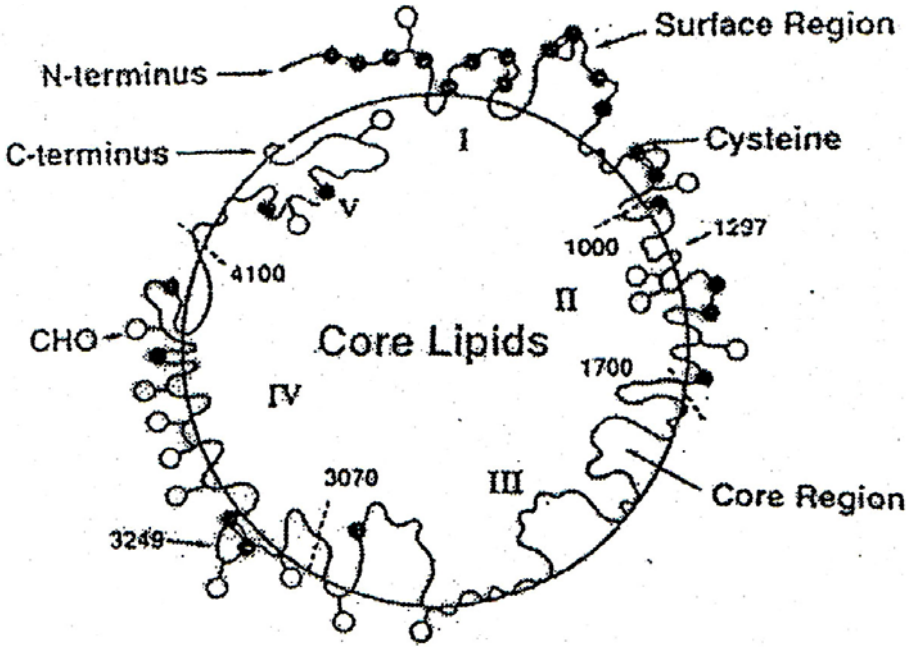
Apo B-100 สังเคราะห์ที่ตับและเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของลิโพโปรตีนชนิด VLDL, IDL และ LDL พบว่า apo B-100 เป็น apolipoprotein ชนิดเดียวที่เป็นส่วนประกอบของ LDL โดย apo B-100 บน LDL ทำหน้าที่เป็น ligand ในการจับกับ LDL receptor ที่พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ตับหรือเซลล์อื่นๆ ที่มี receptor นี้อยู่ ซึ่ง LDL (apo B,E) receptor จำเพาะกับ apo B-100 และ apo E เท่านั้น (Knott et al., 1985; Chen et al., 1987) ฉะนั้น apo B-100 จึงมีความสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ LDL โดยการกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือดผ่านทาง LDL receptor ดังนั้นถ้าเกิดความหลากหลายและการกลายพันธุ์ของยีน apo B-100 ส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับ apo B-100 ขึ้น ทำให้การกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือดลดลง ก่อให้เกิดระดับ LDL ในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น เป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันในที่สุด (Yang et al., 1986)

โครงสร้างของ apo B-100

Apo B-100 เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ที่สุดในลิโพโปรตีนของมนุษย์ มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและมีมวลโมเลกุลสูง ดังนั้น apo B-100 จึงไม่เกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างลิโพโปรตีนชนิดอื่นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิโพโปรตีน (Kane, 1983) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ที่สมบูรณ์ของ apo B complementary DNA (cDNA) พบว่าสารตั้งต้น (precursor) ของ apo B-100 ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 4,563 ตัว ซึ่งมาจาก mRNA 14,121 นิวคลีโอไทด์ รวมทั้ง signal peptide ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 ตัว หรือ 27 ตัว โดยบริเวณ signal peptide นี้จะถูกตัดออกจากโครงสร้างของ apo B-100 ก่อนที่จะมีการหลั่งของ nascent VLDL ออกจากตับทำให้ mature peptide ของ apo B-100 ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 4,536 ตัว กับบริเวณ 5′ untranslated มี 128 นิวคลีโอไทด์ และบริเวณ 3′ untranslated มีความยาว 304 คู่เบส มีมวลโมเลกุลประมาณ 550,000 Da ซึ่งรวมคาร์โบไฮเดรตประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (Chen et al., 1986; Cladaras, et al., 1986; Knott et al., 1986; Innerarity et al., 1990; Visvikis et al., 1990) นอกจากนี้พบว่า apo B-100 มีตำแหน่ง heparin binding site ทำให้มีความสามารถจับกับ heparin ได้ดี ซึ่งบริเวณนี้จะช่วยในการจับของ VLDL ที่ผนัง endothelium ของหลอดเลือดฝอย ทำให้ไทรกลีเซอไรด์ที่อยู่แกนกลางของ VLDL ถูกย่อยโดยเอนไซม์ lipoprotein lipase ได้ดีขึ้น (Yang et al., 1989)

LDL ประกอบด้วยส่วนที่เป็นลิพิด 80 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบของ LDL คือ apo B-100 จากการศึกษา apo B-100 ของ LDL โดย electron microscopy (EM) (Phillips et al., 1989; Yang et al., 1989) พบว่า apo B-100 อยู่ล้อมรอบ LDL (ภาพที่ 3) ซึ่ง apo B-100 มีทั้งส่วนที่อยู่ในแกนกลาง (core) ของ LDL และส่วนที่ยื่นไปบนพื้นผิวของ LDL จากการนำ apo B-100 บน LDL มาตัดด้วยเอนไซม์ trypsin ได้เป็นเพปไทด์ (peptide) ขนาดเล็ก พบว่าส่วนที่ยื่นไปบนพื้นผิวของ LDL ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนไลซีน (lysine : lys) และอาร์จินีน (arginine : arg) เอนไซม์ trypsin สามารถตัดได้เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กเรียกบริเวณนี้ว่าtrypsin-releasable (TR) peptide ในขณะที่ส่วนที่อยู่ในแกนกลางของ LDL พบว่าเอนไซม์ trypsin ไม่สามารถตัดได้เรียกบริเวณนี้ว่า trypsin-nonreleasable (TN) peptide การ

NH_2



ภาพที่ 3. โครงสร้างของ apo B-100 บน LDL ส่วนที่ยื่นบนพื้นผิวของ LDL คือ trypsin-releasable region และส่วนที่อยู่ในแกนกลางของ LDL คือ trypsin-nonreleasable region เส้นประ (...) แยก 5 domain ออกจากกัน (0) แทน N-glycosylated carbohydrate (●) แทน cysteine residue (=) แทน พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond)

ที่มา : (Garnier et al., 1978)

apo B-100 มีหน้าที่สำคัญดังนี้

1. Apo B-100 เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์และการหลั่งของ VLDL จากตับ

2. Apo B-100 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของลิโพโปรตีนชนิด VLDL และ LDL

3. Apo B-100 สามารถจับกับ heparin และ proteoglycan ในหลอดเลือดแดง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะหลอดเลือดหัวใจอุดตัน

4. Apo B-100 บน LDL สามารถจับกับ LDL receptor ส่งผลให้มีการกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือด

จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของ apo B-100 พบว่าประกอบด้วยส่วนที่เป็น α- helix 43 เปอร์เซ็นต์ β-sheet 21 เปอร์เซ็นต์ random 20 เปอร์เซ็นต์ และ β-turn 16 เปอร์เซ็นต์ แต่พบโครงสร้าง amphipathic helix น้อยมาก (DeLoof et al., 1986) จากการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์พบว่าบางส่วนของบริเวณ α-helix และ β- sheet มีลักษณะโครงสร้าง amphipathic helix ซึ่งโครงสร้างนี้เกี่ยวข้องกับการจับไขมันของ apolipoprotein ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ และสามารถแลกเปลี่ยนระหว่างลิโพโปรตีนชนิดอื่น ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิโพโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้าง amphipathic helix ไม่ใช่ลักษณะเฉพาะของ apolipoprotein เนื่องจากสามารถพบได้ในโปรตีนชนิดอื่น โครงสร้าง α- helix มักพบบริเวณพื้นผิวของ apo B-100 อาจมีบทบาทสำคัญในการสร้าง receptor- binding domain สำหรับจับกับ LDL receptor (Visvikis et al., 1990) ส่วนโครงสร้าง amphipathic β-sheet ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติทั้ง hydrophobic และ hydrophilic ซึ่งพบโดยตลอดโครงสร้าง apo B-100 บริเวณนี้จะประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน 5 ตัว โดยเป็นไปอย่างต่อเนื่องคือ acidic-aromatic-polar-aliphatic-proline ซึ่งโครงสร้าง amphipathic β-sheet นี้ไม่พบใน apolipoprotein ชนิดอื่น พบเฉพาะ apo B-100 (Law et al., 1986; Yamamoto et al., 1986; Davis, 1990) มีหน้าที่สำคัญในการจับกับ LDL ซึ่ง apo B-100 แตกต่างจาก apolipoprotein ชนิดอื่น เพราะ apo B-100 จะไม่แยกจากลิโพโปรตีนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิโพโปรตีน เนื่องจาก apo B-100 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำถึงแม้จะสกัดเอาส่วนที่เป็นไขมันออกไปแล้วก็ตาม (Knott et al., 1986)

ในโครงสร้างของ apo B-100 พบว่ามีการกระจายตัวของ cysteine residue จำนวน 25 ตัว แบบไม่สมมาตร โดย cysteine residue จำนวน 14 ตัว พบในบริเวณ NH_2-terminal ส่งผลทำให้เกิดโครงสร้าง globular ภายในโมเลกุล (Garnier et al., 1978) พบว่า cysteine residue จำนวน 6 ตัว ใน cysteine residue ทุก 7 ตัว เกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ภายในโมเลกุล (Deeb et al., 1986) ส่วน cysteine residue ที่เหลืออย่างน้อย 1 ตัว จะอยู่ในรูป free sulfhydryl โดย cysteine residue มีความสำคัญในโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของ apo B-100 พันธะไดซัลไฟด์ซึ่งพบในโครงสร้าง globular ภายในโมเลกุลของ apo B-100 มีความสำคัญในการสร้างลิโพโปรตีนที่มี apo B-100 เป็นองค์ประกอบ (Lodish et al., 1995) และทำให้โมเลกุลของ apo B-100 บน LDL มีความเสถียร พบว่า ligand ที่อยู่บน LDL receptor มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) จำนวนมาก และถ้ามีการขาดหายไปของกรดอะมิโนซีสเทอีนจะทำให้ LDL

ยีน apo B

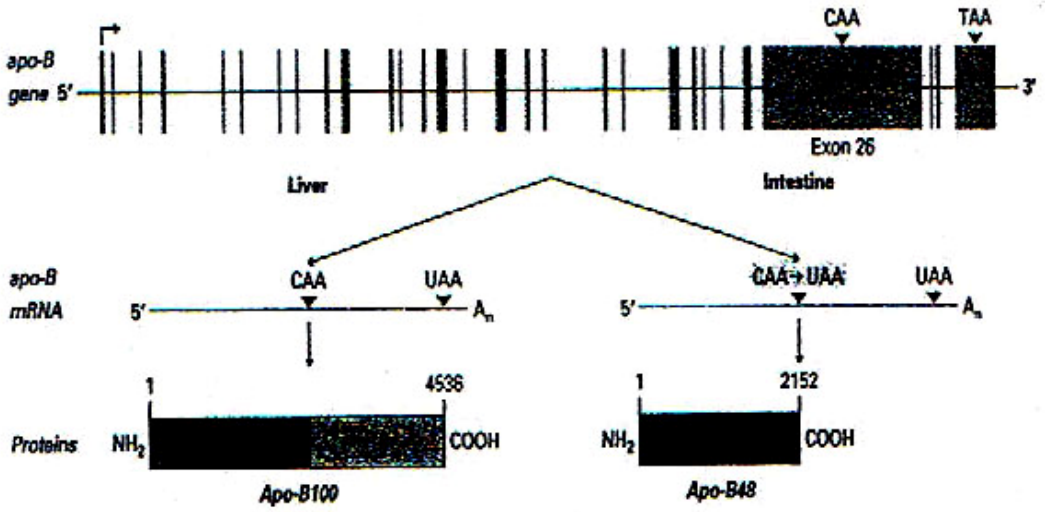
จากการศึกษายีนของ apo B โดยเทคนิค *in situ* hybridization พบว่ามียีนของ apo B อยู่ตรงส่วนปลายของแขนสั้นในโครโมโซมคู่ที่ 2 (2p23-2p24) (Deeb et al., 1986) จากการศึกษา genomic DNA และ mRNA ของ apo B จากตับและลำไส้เล็กโดยใช้เทคนิค filter hybridization พบว่ายีนของ apo B จากตับและลำไส้เล็กมาจากยีนตัวเดียวกัน ยีนของ apo B มีความยาว 43 คู่เบส ประกอบด้วย 28 intron และ 29 exon (Yang et al., 1986) ความยาวของ exon มีขนาดที่หลากหลายแสดงดังตารางที่ 1 (Knott et al., 1986) ตั้งแต่ 39 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่พบใน exon ที่ 2 จนถึง 7572 นิวคลีโอไทด์ที่พบใน exon ที่ 25 แต่พบว่า exon ส่วนใหญ่มีขนาด 150 นิวคลีโอไทด์ ถึง 250 นิวคลีโอไทด์ (Blackhart et al., 1986; Brooks et al., 1991) การกระจายของ intron ภายในยีน apo B เป็นแบบไม่สมมาตร ตัวอย่างเช่นจากทั้งหมด 28 intron มี 24 intron พบที่บริเวณ 5′ untranslated ส่วนบริเวณ 3′ untranslated พบว่ามี intron น้อย และพบลักษณะ long open reading frames (ORFs) ที่มีขนาดยาวมากที่ exon ที่ 26 มีความยาว 7572 คู่เบส และ exon ที่ 29 มีความยาว 1906 คู่เบส (ภาพที่ 4) (Lodish et al., 1995) โดยทั่วไปความยาวของ exon ที่พบในยีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีขนาดตั้งแต่ 2-3 เบสไปจนถึงมากที่สุดประมาณ 600 เบส พบว่า long open reading frames ที่พบในจีโนม (genome) ของโพรแคริโอต (prokaryote) และยูแคริโอต (eukaryote) ชั้นต่ำมีขนาดยาวกว่าที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่ง long open reading frames เกิดจาก exon มารวมกันและเอาตำแหน่งที่เกิด splicing ออก ในยีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบได้น้อยมาก แต่พบว่า exon ที่ 26 ของยีน apo B เป็น long open reading frames ที่ใหญ่ที่สุดที่พบในยีนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ exon ที่ 26 ของ apo B-100 เป็นบริเวณที่ไปจับกับ LDL receptor (Parums, 1996)

ตารางที่ 1. ขนาดและตำแหน่งของ exon และ intron ในยีน apo B ของมนุษย์

Exon	Position in cDNA		Codon interrupted	Amino acid and position	Intron	Size (bp)
	size	base pair				
1	1-210	(210)			1	289
2	211-249	(39)	G$^{\downarrow}$AA	Glu^{1}	2	1050*
3	250-365	(116)	A$^{\downarrow}$AA	Lys^{14}	3	1300*
4	366-511	(146)	AAG$^{\downarrow}$GTT	Lys^{52}-Val^{53}	4	3000*
5	512-665	(154)	AG$^{\downarrow}$G	Arg^{101}	5	723
6	666-821	(156)	CTG$^{\downarrow}$GAT	Leu^{152}-Asp^{153}	6	1560*
7	822-946	(125)	ATG$^{\downarrow}$ACC	Met^{204}-Thr^{206}	7	713
8	947-1032	(86)	AA$^{\downarrow}$G	Lys^{246}(Asn in cDNA)	8	1310*
9	1033-1252	(220)	G$^{\downarrow}$GT	Gly^{275}	9	700*
10	1253-1480	(228)	AG$^{\downarrow}$C	Ser^{348}	10	2380*
11	1481-1598	(118)	AA$^{\downarrow}$C	Asn^{424}	11	112
12	1599-1745	(147)	CGG$^{\downarrow}$GTC	Arg^{463}-Val^{464}	12	1150*
13	1746-1957	(212)	AAG$^{\downarrow}$GAC	Lys^{512}-Asp^{513}	13	263
14	1958-2195	(238)	GA$^{\downarrow}$T	Asp^{583}	14	900*
15	2196-2372	(177)	GAG$^{\downarrow}$ATT	Glu^{662}-Ile^{663}	15	1600*
16	2373-2564	(192)	CAG$^{\downarrow}$GAT	Gln^{721}-Asp^{722}	16	1250*
17	2565-2732	(168)	ATG$^{\downarrow}$ATT	Met^{785}-Ile^{786}	17	484
18	2733-2944	(212)	AAC$^{\downarrow}$ATG	Asn^{841}-Met^{842}	18	2950*
19	2945-3127	(183)	GG$^{\downarrow}$C	Gly^{912}	19	605
20	3128-3249	(122)	AG$^{\downarrow}$A	Arg^{973}	20	2300*
21	3250-3460	(211)	G$^{\downarrow}$GT	Gly^{1014}	21	893
22	3461-3636	(176)	AG$^{\downarrow}$T	Ser^{1064}	22	109
23	3637-3824	(188)	G$^{\downarrow}$AT	Asp^{1143}	23	478
24	3825-3970	(146)	GTT$^{\downarrow}$GCA	Val^{1205}-Ala^{1206}	24	909
25	3971-4344	(374)	AG$^{\downarrow}$C	Ser^{1254}	25	507
26	4345-11916	(7572)	G$^{\downarrow}$GA	Gly^{1379}	26	403
27	11917-12031	(115)	G$^{\downarrow}$TT	Val1^{3903}	27	107
28	12032-12215	(184)	CA$^{\downarrow}$G	Gln^{3941}	28	942
29	12216-14124-1	(1906)	CAG$^{\downarrow}$TCC	Gln^{4002}-Ser^{4003}		

* *Estimate based on restriction map.*

ที่มา : (Knott et al., 1986)



ภาพที่ 4. การกระจายของ intron และ exon ภายในยีน apo B

ที่มา : (Lodish et al., 1995)

ความหลากหลายของยีน apo B

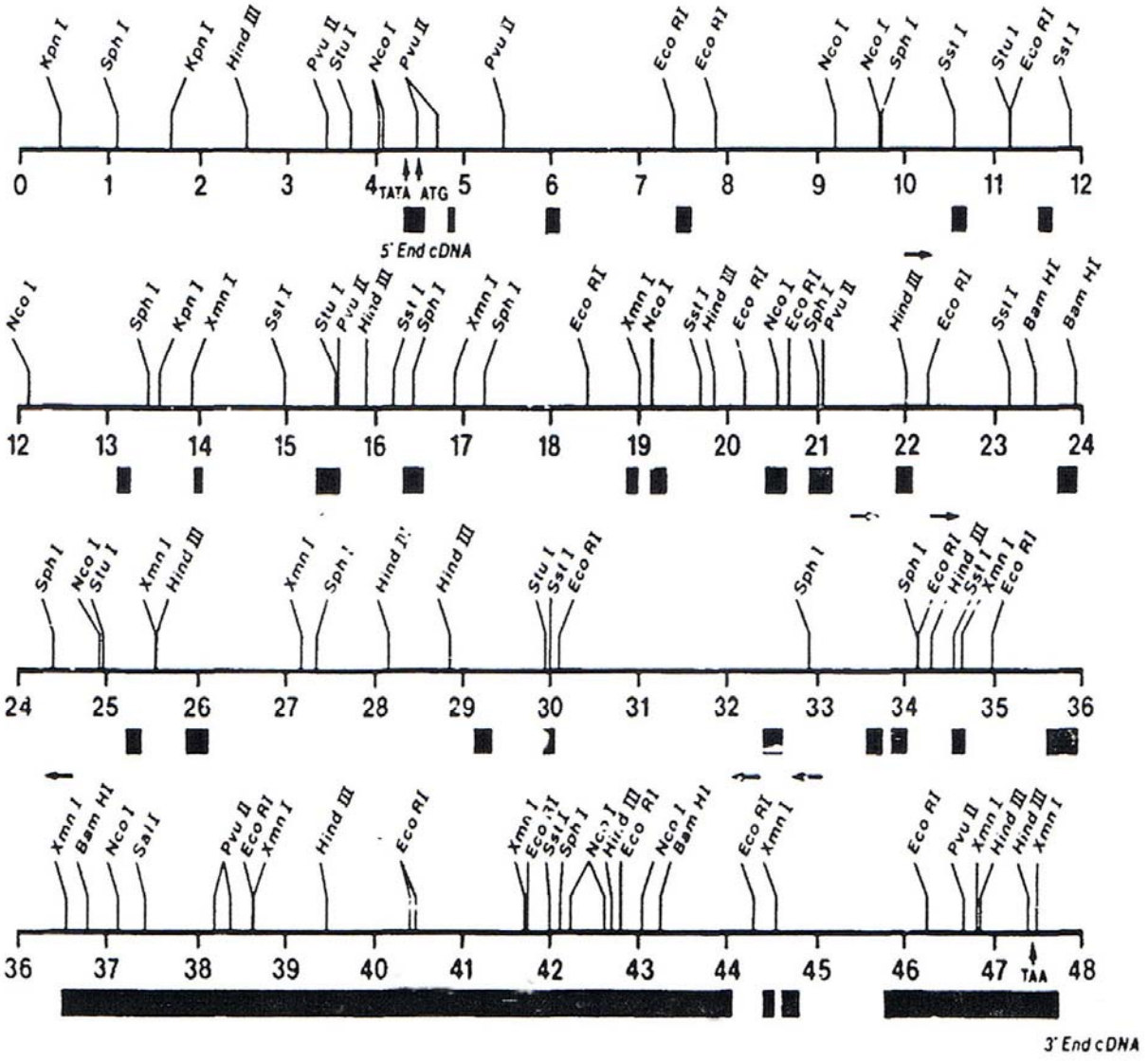
จากการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ apo B มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของ apo B ดังนั้นจึงมีผลต่อระดับคอเลสเทอรอล ไทรกลีเซอไรด์ และ apo B ในกระแสเลือด ซึ่งมีผลก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Talmud et al., 1987; Aburatani et al., 1988; Galton et al., 1997; Ozturk et al., 1999) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและตำแหน่งของยีน apo B มีผลทำให้ความสามารถในการจับกับ LDL receptor ลดลง ส่งผลให้เกิดภาวะคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดสูง (hypercholesterolemia) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Levy, 1981) จากการศึกษาความหลากหลายของยีน apo B โดยการเปรียบเทียบระหว่าง apo B gene sequence และ apo B cDNA พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง (single base substitution หรือ point mutation) อยู่ 13 ตำแหน่ง ซึ่ง 4 ตำแหน่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสตัวที่ 3 ของ codon (silent mutation) ทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนและอีก 8 ตำแหน่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น(Knott et al., 1986) ดังแสดงในตารางที่ 2

Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) ส่วนใหญ่เกิดจากการแทนที่เบส ทำให้เกิดการสร้างหรือทำลายตรงตำแหน่งการตัดที่ตำแหน่งเฉพาะของเอนไซม์ restriction endonuclease เทคนิคนี้ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง apo B RFLPs และระดับไขมันในกระแสเลือด (Berk, 1986; Law et al., 1986; Genest et al., 1990; Hansen et al., 1994; Stepanor et al., 1998) ดังแผนที่ของตำแหน่ง restriction ของยีน apo B-100 ในมนุษย์ (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 2. ความแตกต่างระหว่าง cDNA และ gene sequence

Position	Codons				Restriction endonuclease site affected
	cDNA		Gene		
947	AAC	Asn	AAG	Lys	
1661	CTC	Leu	CTG	Leu	
6402	GTG	Val	CTG	Leu	*RsaI*
7064	GAT	Asp	GAC	Asp	*MaeII*
7221	ACC	Thr	GCC	Ala	*HindII, HaeIII, AsuI*
7331	GTG	Val	GTC	Val	
7673	ACT	Thr	ACC	Thr	*XbaI, HinfI, EcoPI*
8126	GTC	Val	GTA	Val	*TaqI*
8167	CAG	Gln	CTG	Leu	*BbvI*
11323	ACT	Thr	ATT	Ile	*SecI*
11973	CTT	Leu	TTT	Phe	
12019	TTT	Phe	TAT	Tyr	
12669	AAA	Lys	GAA	Glu	*EcoRI*

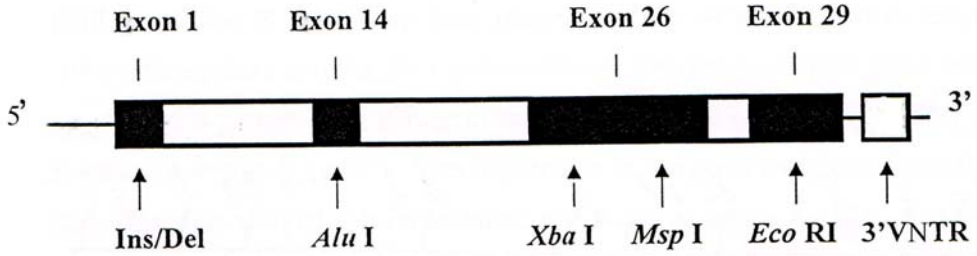
ที่มา : (Knott et al., 1986)



ภาพที่ 5. แผนที่ของตำแหน่ง restriction ของยีน apo B-100 ในมนุษย์

ที่มา : (Blackhart et al., 1986)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาตำแหน่งความหลากหลายของยีน apo B โดยใช้ RFLPs ตรงตำแหน่ง insertion/deletion, AluI, XbaI, MspI, EcoRI และ 3′VNTR (ภาพที่ 6) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้



ภาพที่ 6. ตำแหน่งความหลากหลายของยีน apo B

ที่มา : (Ludwig et al., 1990)

1. Insertion/deletion polymorphism

จากการศึกษาพบว่าการเกิดความหลากหลายของการเพิ่มขึ้นหรือลดลง (insertion/deletion) ของกรดอะมิโน 3 ตัว คือ leucine-alanine-leucine ตรงบริเวณ signal peptide ภายใน exon ที่ 1 ของ apo B ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 ตัว หรือ 27 ตัว โดย signal peptide นี้จะควบคุมการเคลื่อนที่พอลิเพปไทด์ (polypeptide) ของ apo B ไปบริเวณเยื่อหุ้ม endoplasmic reticulum ในกระบวนการสร้างยีนของ apo B ดังนั้น ถ้าเกิดความหลากหลายของยีน apo B ภายในบริเวณ signal peptide จะส่งผลต่อการเคลื่อนที่พอลิเพปไทด์ของ apo B ไปยังบริเวณเยื่อหุ้มของ endoplasmic reticulum และมีผลต่อกระบวนการ post-translational modification ของ apo B (Boerwinkle et al., 1989; Hansen et al., 1994) จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความหลากหลายตรงตำแหน่ง insertion/deletion มีผลทำให้ระดับไขมันในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Monsaly et al., 1988; Renges et al., 1991; Wu et al., 1994; Anderson et al., 1997)

2. AluI polymorphism

ความหลากหลายที่ตำแหน่ง AluI เกิดจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอะลานีน (alanine) ไปเป็นเวลีน (valine) ที่ตำแหน่ง codon 591 ($Ala^{591} \longrightarrow Val; GCT \longrightarrow GTT$) ในบริเวณ exon ที่ 14 ของยีน apo B (Wu et al., 1993) ซึ่งอยู่บริเวณพื้นผิวของ apo B และมีบทบาทสำคัญในการรักษาเสถียรภาพของ apo B-100 บน LDL และทำให้เกิดโครงสร้าง glubular ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ nascent VLDL และการขนส่งจากบริเวณ endoplasmic reticulum ไปยังบริเวณ golgi apparatus ฉะนั้นจึงมีผลต่อการหลั่งของ nascent VLDL ออกจากตับ (Marcel et al., 1982; Lodish et al., 1995) ยังมีการวิจัยน้อยมากเกี่ยวกับความหลากหลายตรงตำแหน่ง AluI แต่พบว่าการเกิดความหลากหลายตรงตำแหน่ง AluI มีผลทำให้ระดับไขมันในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Ludwig et al., 1989; Wu et al., 1993)

3. XbaI polymorphism

ความหลากหลายที่ตำแหน่ง XbaI เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตัวที่ 3 ของ codon จาก ACC $\longrightarrow$ ACT ของกรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ตำแหน่ง XbaI ตั้งอยู่บริเวณน้อยกว่า 1 kb ทาง 5′upstream ตรง codon ที่ 2488 ใน exon ที่ 26 ซึ่งเป็นบริเวณที่ไปจับกับ LDL receptor ถึงแม้ว่าจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน แต่มีสมมติฐานว่าแอลลีล (allele) ของตำแหน่ง XbaI จะเกิด linkage disequilibrium กับอย่างน้อย 1 การกลายพันธุ์ (mutation) ตรงบริเวณภายในยีน apo B หรือบริเวณที่ใกล้กับยีน apo B จึงทำให้ความสามารถในการจับของ apo B-100 กับ LDL receptor ลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Berg et al., 1986; Carlsson et al., 1986; Dunnig et al., 1988; Monsalve et al., 1991)

4. MspI polymorphism

ความหลากหลายที่ตำแหน่ง MspI เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตัวที่ 2 ของ codon จาก CGG ไปเป็น CAG ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโนอาร์จินีนไปเป็นกลูตามีน ตำแหน่งของ MspI อยู่ใน exon ที่ 26 ซึ่งเป็นบริเวณที่ไปจับกับ LDL receptor (Huang et al., 1988) ยังมีการวิจัยน้อยมากเกี่ยวกับความหลากหลายตรงตำแหน่ง MspI แต่พบว่าการเกิดความหลากหลายตรงตำแหน่ง MspI มีผลต่อระดับไขมันในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Delghandi et al., 1999; Rantala et al., 2000)

5. EcoRI polymorphism

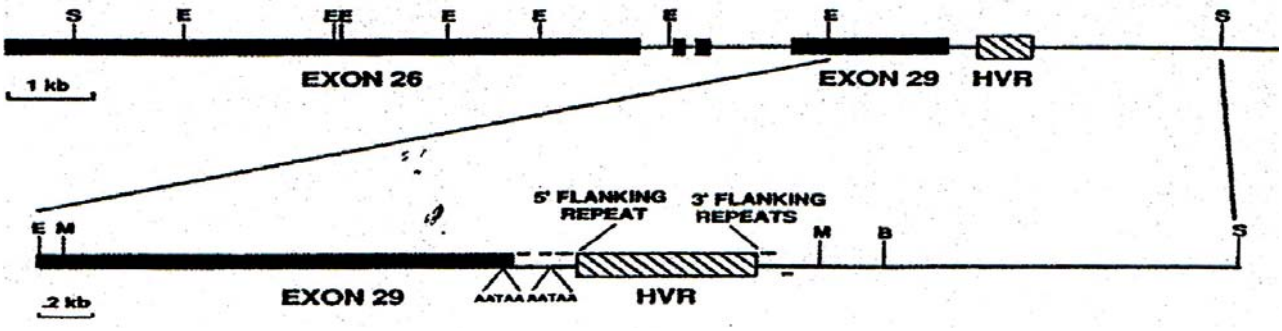
ความหลากหลายที่ตำแหน่ง EcoRI เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก GAA $\rightarrow$ AAA ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ไปเป็นกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) ตรงตำแหน่ง codon ที่ 4154 ใน exon ที่ 29 ของยีน apo B ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ตรง carboxyl-terminal ของ apo B ใกล้กับตำแหน่งที่ไปจับกับ LDL receptor โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรด อะมิโนไลซีนที่มีประจุบวกไปเป็นกรดอะมิโนกลูตามิกที่มีประจุลบ ทำให้ความสามารถในการจับกับกรดอะมิโนที่มีประจุลบบน LDL receptor ลดลง มีผลทำให้ระดับไขมันในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Knott et al., 1985; Hegele et al., 1986; Krul et al., 1988; Williams et al., 1988)

6. 3′ Variable Number of Tandem Repeat (VNTRs)

การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอภายในจีโนมมนุษย์ (human genome) พบว่ามีความหลากหลายของจำนวนเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 10-100 คู่เบส กระจายโดยตลอดจีโนมมนุษย์ โดยปกติจะพบเบสที่มีรูปแบบหลากหลายได้ประมาณ 1 เบสทุกๆ 100 เบสเรียกความหลากหลายนี้ว่า genetic variation และ ถ้าพบได้บ่อยๆ ในคนทั่วไป (มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์) อาจเรียกว่ามีความหลากหลาย (polymorphism) ซึ่งเป็นกลไกที่ก่อให้เกิดรูปแบบต่างๆ ของแอลลีล (allele) ในแต่ละตำแหน่งของยีน (Nakamura et al., 1987)

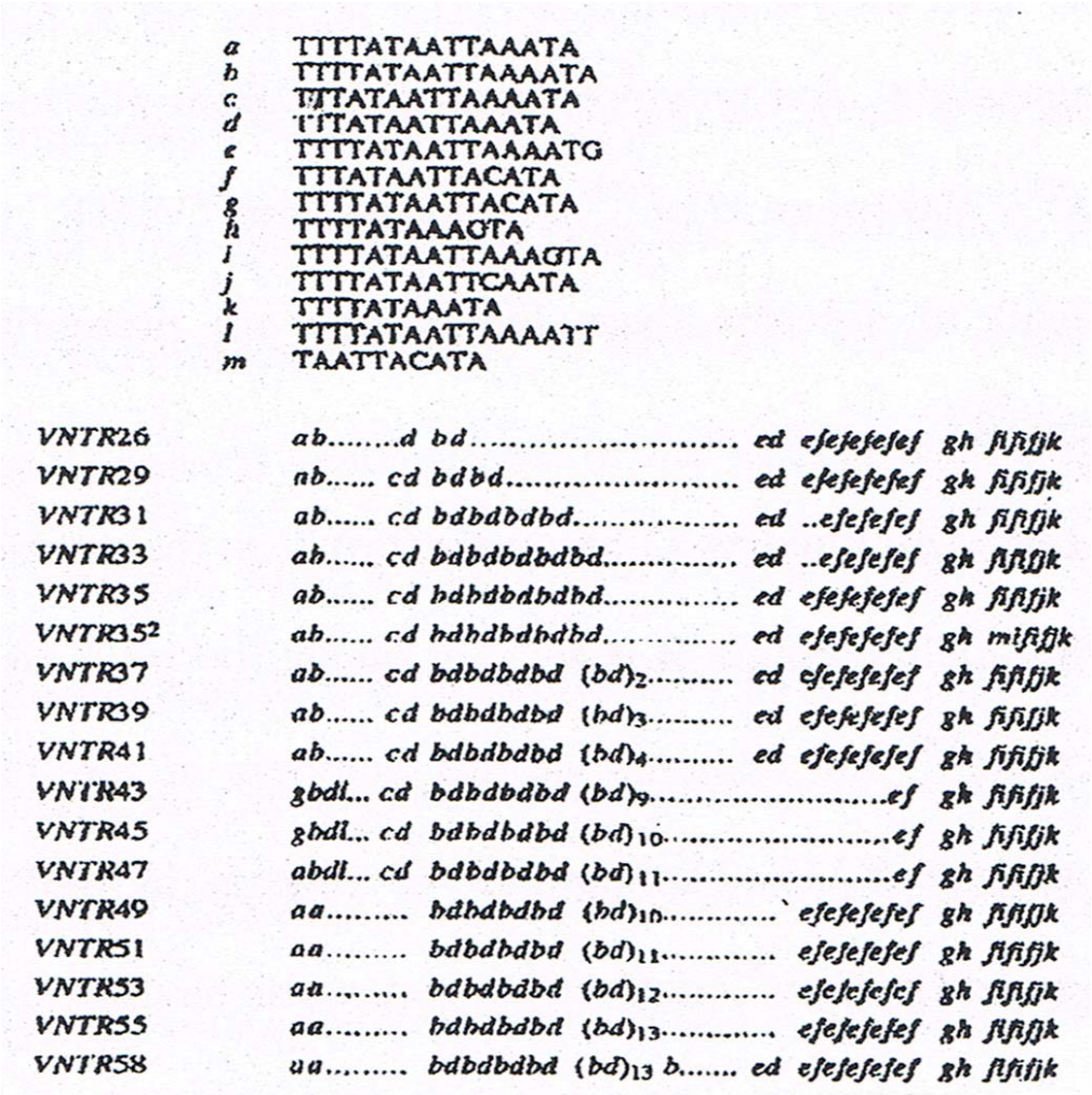
VNTR พบทาง 3′ untranslated ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนตัวสุดท้ายถัดไปอีก 500 คู่เบสของยีน apo B (Griese et al., 1991) และประกอบด้วยลำดับคู่เบสที่ซ้ำของ A-T ระหว่าง 11-16 คู่เบส (ภาพที่ 7) จำนวนคู่เบสที่ซ้ำในแอลลีลส่วนใหญ่เป็นเลขคี่ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอลลีล VNTR ในยีน apo B มีลักษณะหลากหลาย

จากการศึกษาในประชากรไต้หวันสามารถแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอลลีล VNTR ในยีน apo B ได้ 16 นิวคลีโอไทด์ (Wu et al., 1995) เพื่อให้เข้าใจง่ายได้มีการใช้ระบบการเรียกชื่อของ Knott โดยตัวอักษร a ถึง m แสดงนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำระหว่าง 11-16 นิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ซ้ำแสดงในรูปแบบที่เข้าใจง่ายคือ 5′-abcd(bd)$_n$ed(ef)$_5$ghfiifik-3′ (ภาพที่ 8) (Knott et al., 1986)



ภาพที่ 7. โครงสร้างของบริเวณปลาย 3′ untranslated ของยีน apo B

ที่มา : (Ludwig et al., 1989)



ภาพที่ 8. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอลลีล VNTR ในยีน apo B

ที่มา : (Knott et al., 1986)

จากภาพที่ 8 แบ่งประเภทของ VNTR ในยีน apo B ได้ 3 ประเภทคือ

1. VNTR 26-41 เกิดจากการเพิ่ม bd กับบางครั้งมีการหายไปของ ef

2. VNTR 43-47 เกิดจากการหายไปของ ed, ef และการเพิ่มของ bd พร้อมทั้งมีการเพิ่ม dl ระหว่าง ab และ cd

3. VNTR 49-58 เกิดจากการที่ aa แทนที่ abcd ตรงจุดเริ่มต้นที่ซ้ำ การหายไปของ ed ยกเว้นใน VNTR 58 และการเพิ่มของ bd

ยกเว้นใน VNTR 35[2] ซึ่งมาจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน พบว่าบริเวณ 3′ghfififik มีการแทนที่ของ m แทน f เป็น 3′ghmifififik

จากภาพที่ 8 พบว่า VNTR 26, VNTR 43 และ VNTR 49 เป็นโครงสร้างพื้นฐานของแอลลีล VNTR ในยีน apo B ความหลากหลายของแอลลีลใน VNTR เกิดจากการเพิ่มหรือการลดจำนวนของ bd ที่แตกต่างกัน (Wu et al., 1995)

ใน mRNA ของยูแคริโอตบริเวณ 3′ VNTR ถอดแบบจากแบบพิมพ์ (template) แต่ไม่เกิดการแปลรหัสไปที่ลำดับกรดอะมิโน ความหลากหลายของ 3′ VNTRนี้ไม่มีผลกระทบต่อหน้าที่ของ mRNA ในการสังเคราะห์โปรตีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายใน 3′ VNTR พบว่าจะควบคุม mRNA ให้มีเสถียรภาพและมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีน เนื่องจาก 3′ VNTR ประกอบด้วยหน่วยเบสที่ซ้ำกันมีลักษณะเป็นมินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) (Wu et al., 1996) เป็นผลทำให้เกิดแอลลีลที่แตกต่างกันในจำนวนเบสที่ซ้ำดังแสดงในตารางที่ 3 จากคุณสมบัตินี้ของ 3′ VNTR จึงมีการนำ 3′ VNTRเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) เนื่องจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ 3′ VNTR ประกอบด้วย 2 แอลลีล โดยแต่ละแอลลีลได้มาจากพ่อและแม่ ข้อดีที่สำคัญของ 3′ VNTR คือการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากรุ่นสู่รุ่นจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาด 3′ VNTR ดังนั้นจึงสามารถนำ 3′ VNTRมาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความเป็นพ่อแม่และลูก นอกจากนี้ยังใช้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ในการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ (Wyman et al., 1980; Nakamura et al., 1987) จากการวิจัยพบว่าแอลลีลของ 3′ VNTR ที่มีจำนวนซ้ำที่สูงจะพบในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันสูงกว่าคนปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าบุคคลที่มีแอลลีลของ 3′ VNTR ที่มีจำนวนซ้ำที่สูงจะมีปริมาณของคอเลสเทอรอล ไทรกลีเซอไรด์ และapo B เพิ่มมากขึ้น สำหรับกลไกของ 3′ VNTRที่มีความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่มีผลต่อปริมาณไขมันในกระแสเลือดยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามความหลากหลายนี้เป็น linkage disequillibrium ร่วมกับความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดอื่นของยีน apo B (Jeffreys et al., 1985)

ตารางที่ 3. ชนิดแอลลีลและขนาดของ VNTR

แอลลีลของ VNTR	ขนาดคู่เบส
25	510
26	525
29	570
31	600
33	630
35	660
37	690
39	720
41	750
43	780
45	810
47	840
49	870
51	900
53	930
55	960
58	1005
60	1065

ที่มา : (Wu et al., 1996)

บทสรุป

ภาวะไขมันในเลือดสูงเกิดจากความผิดปกติของการสังเคราะห์และ/หรือกำจัดลิโพโปรตีนโดยเฉพาะ LDL ออกจากกระแสเลือด และยังเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ apolipoprotein เนื่องจาก apolipoprotein B-100 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ LDL และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของลิพิด โดยเฉพาะการกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือด ดังนั้นถ้าเกิดมีความหลากหลายของยีนใน apolipoprotein B-100 อาจส่งผลให้การกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือดลดลง ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงและก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันในที่สุด ฉะนั้นการตรวจหาความหลากหลายของยีนใน apolipoprotein B-100 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในประชากร ใช้ในการพยากรณ์โอกาส และความรุนแรงของโรค สำหรับบุคคลที่เป็นกลุ่มเสี่ยง

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ โล่ห์เลขา. (2536). **ไลโปโปรตีนและภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ.

นีโลบล เนื่องตัน. (2542). **ชีวเคมี 1 คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล** (พิมพ์ครั้งที่ 5). กรุงเทพฯ: ธรรมสาร.

Aburatani, H., Matsumoto, A., and Itoh, H. (1988). A study of DNA polymorphism in the apolipoprotein B gene in a Japanese population. **Atherosclerosis.** 72(1): 71-76.

Anderson, J.L., Bunker, C.H., Aston, C.E., and Kamboh, I.M. (1997). Relationship of two apolipoprotein B polymorphisms with serum lipoprotein and lipid levels in African Blacks. **Hum Biol**. 69(6): 793-808.

Berg, K., Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R., Knott, T.J., and Scott, J. (1986). Genetic linkage between the antigenic group (Ag) variation and the apolipoprotein B gene: assignment of the Ag locus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83(19): 7367-7370.

Berk, K. (1986). DNA polymorphism at the apolipoprotein B locus associated with lipoprotein levels. **Clin Genet.** 30(6): 515-520**.**

Bhagaven, N.V. (1992). **Medical biochemistry** (2nd ed.). London: Jones and Bartlett Publishers.

Blackhart, B.D., Ludwig, E.M., Pierotti, V.R., Calati, L., Onasch, M.A., and Wallis, S.C. (1986). Structure of the human apolipoprotein B gene. **The Journal of Biological chemistry.** 261(33): 15364-15367

Boerwinkle, E., Xiong, W., Fourest, E., and Chan, L. (1989). Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3′ hypervariable region. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86(1): 212-216.

Brooks, A.R., Blackhart, B.D., Haubold, K., and Wilson, B.L. (1991). Characterization of tissue-specific enhancer elements in the second intron of the human apolipoprotein B gene. **The Journal of Biological Chemistry.** 266(12): 7848-7859.

Carlsson, P.C., Darnfors, S.D., and Biursell, G. (1986). Analysis of the human apolipoprotein B gene; complete structure of the B-74 region. **Gene.** 49(1): 29-51.

Chen, S.H., Yang, C.Y., and Chen, P.F. (1986). The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. **J Biol Chem.** 261(28): 12918-12921.

Chen, S.W., Habib, G., Yang, C.Y., Gu, Z.W., Lee, B.R., and Weng, S.A. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in frame stop codon. **Science.** 238(4825): 363-366.

Cladaras, C., Hadzopoulou-Cladaras, M., Nolte, R.T., Alkin-Son, D., and Zannis, V.I. (1986). The complete sequence and structure analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apo B-100 and apo B-48 forms. **EMBO J.** 5(13): 3495-3507.

Davis, R.A. (1990). Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. **Biochimica Biophysica Acta.** 1440(1): 1-31.

Deeb, S.S., Disteche, C., Motulsky, A.G., Lebo, R.V., and Kan, Y.W. (1986). Chromosomal localization of the human apolipoprotein B gene and detection of homologous RNA in monkey intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83(2): 419-422.

Delghandi, M., Thangarajah, R., Nilsen, M., Grimsgaard, S., Bonaa, K.H., Tonstad, S., and Jorgensen, L. (1999). DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene (XbaI, EcoRI, and MspI RFLPs) in Norwegians at risk of atherosclerosis and healthy controls. **Acta cardiologica.** 54(4): 215-225.

DeLoof, H., Rosseneu, M., Brasseur, R., and Roysschaert, J.M. (1986). Use of hydrophobicity profiles to predict receptor binding domains on apolipoprotein E and low density lipoprotein apolipoprotein B-E receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83(8): 2295-2299.

Dunning, A.M., Duriez, P., Dac, N.V., Fruchart, J.C., and Humpheries, S.E. (1988). Association between epitopes detected by monoclonal antibody BIP-45 and XbaI polymorphism of apolipoprotein B. **Clin Gent.** 33(3): 181-188.

Durrington, P.N. (1995). **Hyperlipidemia diagnosis and management** (2nd ed.). Oxford: Butterworth-Heinemann.

Galton, D.J. (1997). Genetic determinants of atherosclerosis-releated dyslipidemias and their clinical implications. **Clin Chim Acta.** 257(2): 181-197.

Garnier, J., Osguthorpe, D.J., and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. **J Mol Biol.** 120(1): 97-120.

Genest, J.L., Ordovas, J.M., and McNamara, J.R. (1990). DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary heart disease. **Atherosclerosis.** 82(1-2): 7-17.

Goldstein, J.L., Brown, M.S., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Frederickson, D.S. (1982). **Basis of iInherited disease** (5th ed.). New York: McGraw-Hill.

Griese, J.S., and Greding, J.T. (1991). DNA length polymorphism of the apo B 3′ region : Frequency distribution of the alleles in the German population. **Forensic Science International.** 51(2): 173-178.

Grundy, S.M. (1990). **Cholesterol and atherosclerosis.** New York: JB Lipincott.

Hansen, B., Klausen, I.C., Lemming, L., Gerder, L.U., Gregersen, N., and Faergeman ,O. (1994). Apolipoprotein B gene polymorphisms in ischemic heart disease and hypercholesterolemia: effects of age and sex. **Clin Gent.** 45(2): 78-83.

Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T., and Hayakama, T. (2005). Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B-100 using LC/ESI MS/MS. **Glycobiology.** 15(5): 447-462.

Hegele, R.A., Huang, L.S., and Herbert, P.N. (1986). Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. **New Engl J Med.** 315(24): 1509-1515.

Herbert, P.N., Assmann, G., Gotto, A.M., and Frederickson, D.S. (1982). **The metabolic basis of inherited disease.** New York: McGraw-Hill.

Huang, L.S., Graaf, J., and Breslow, J.L. (1988). Apo B gene MspI RFLP in exon 26 changes amino acid 3611 from Arg to Gln. **J Lipid Res.** 29(1): 63-67.

Innerarity, T.L., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Bersot, T.P., Krauss, R.M., and Vega,G.L. (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. **J Lipid Res.** 31(8): 1337-1349.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., and Thein, S.L. (1985). Hyper-variable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature.** 314(6006): 67-73.

Jorde, L.B., Carey, J.C., and White, R.L. (1995). **Medical genetics.** Missouri: Mosby.

Kane, J.P., Hardman, D.A., and Paulus, H.E. (1980). Heterogeneity of apolipoprotein B: Isolation of a new species from human

chylomicrons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77(5): 2465-2469.

Kane, J.P. (1983). Apolipoprotein B: structure and metabolic heterogeneity. **Annu Rev Physiol.** 45: 637-650.

Knott, T.J., Rall, S.C., Innerarity, T.L., Jacobson, S.F., Urdea, M.S., and Wilson-Levy, B. (1985). Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. **Science.** 230(4721): 37-43.

Knott, T.J., Pease, R.J., and Powell, L.M. (1986). Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. **Nature.** 323: 734-738.

Krul, E., Kleinman, Y., and Konishita, M. (1988). Regional specificities of monoclonal anti-human apolipoprotein B antibodies. **J Lipid Res.** 29(7): 937-947.

Law, S.W., Grant, S.M., Higuchi, K., Hospattankar, A., Lackner, K., and Lee, N. (1986). Human liver apolipoprotein B-100 cDNA: complete nucleic acid and derived amino acid sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83(21): 8142-8146.

Levy, R.I. (1981). Cholesterol lipoproteins and heart disease: present status and future prospects. **Clin Chem.** 27(5): 653-662.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995). **Molecular cell biology** (3rd ed.). New York: WH. Freeman and Company.

Ludwig, E.H., Friedl, W., and McCarthy, B.J. (1989). High-resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene. **Am J Hum Genet.** 45(3): 458-464.

Ludwig, E.H., and McCarthy, B.J. (1990). Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B-100. **Am J Hum Genet.** 47(4): 712-720.

Marcel, Y.L., Hogue, M., Theolis, R., and Miline, R.W. (1982). Mapping of antigenic determinants of human apolipoprotein B using monoclonal antibodies against low density lipoproteins. **J Biol Chem.** 257(22): 1365-1368.

Meisenberg, G., and Simmons, W.H. (1998). **Principles of medical biochemistry.** Missouri: Mosby.

Monsalve, M.V., Robinson, D., and Woolcock, N.E. (1991). Within-individual variation in serum cholesterol levels: association with DNA polymorphisms at the apolipoprotein B and AI-CIII-AIV loci in patients with peripheral arterial disease. **Clin Genet.** 39(4): 260-273.

Monsaly, M.V., Young, R., Jobsis, J., Wiseman, S.A., Dharmu, S., and Powell, J.T. (1988). DNA polymorphism of gene for apolipoprotein B in patients with

peripheral and coronary artery disease. **Atherosclerosis.** 70(1-2): 123-129.

Nakamura, Y., Leppert, M.O., Connell, P., Wolff, P., Holm, T., and Culver, M. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science.** 235(4796): 1616-1622.

Ozturk, I.C., and Killeen ,A.A. (1999). An overview of genetic factors influencing plasma lipid levels and coronary artery disease risk. **Arch Pathol Lab Med.** 123(12): 1219-1222.

Parums, D.V. (1996). **Essential clinical pathology.** Massachusetts: Blackwell Science.

Phillips, M.L., and Schumaker, V.N. (1989). Conformation of apolipoprotein B after lipid extraction of low density lipoprotein attacked to an electron microscope grid. **J Lipid Res.** 30(3): 415-422.

Poledne, R., Pisa, Z., and Berg, K. (1993). Normal genetic variation at the low density lipoprotein receptor (LDLR) locus influences cholesterol levels in children. **Clin Genet.** 43(3): 122-126.

Rantala, M., Rantala, T.T., Savolainen, M., Friedlander, Y., and Kesaniemi, Y.A. (2000). Apolipoprotein B gene polymorphisms and serum lipids: meta-analysis of the role of genetic variation in responsiveness to diet. **Am J Clin Nutr.** 71(3): 713-724.

Renges, H.H., Wile, D.B., McCeigue, P.M., Marmot, M.G., and Humphries, S.E. (1991). Apoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. **Atherosclerosis.** 91(3): 267-275.

Schuttz, R.M., and Liebman, M.N. (1997). **Text book of biochemistry with clinical correlations** (4th ed.). New York: Wiley-Liss.

Stein, E.A. (1987). **Fundamentals of clinical chemistry** (3rd ed.). Philadelphia: W.B. Saunders.

Stepanor, V.A., Puzyrer, V.P., Kasper, R.S., and Kutmin, A.I. (1998). Genetic markers in coronary artery disease in a Russian population. **Hum Biol.** 70(1): 47-57.

Talmud, P.J., Barni, N., and Kessling, A.M. (1987). Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of serum cholesterol levels: a study in normo-and hyperlipidemic individual. **Atherosclerosis.** 67: 81-89.

Visvikis, S., Chan, L., Sitest, G., Drourin, P., and Boerwinkle, E. (1990). An insertion deletion polymorphism in the signal peptide of the human apolipoprotein B gene. **Hum Genet.** 84(4): 373-375.

Williams, J.R., Knott, T.J., and Wallis, S.C. (1988). Variation of apolipoprotein B is associated with obesity, high blood cholesterol levels, and increased risk of coronary heart

disease. **Lancet.** 24(8626-8627): 1442-1446.

Wu, J.H., Wen, M.S., Lo, S.K., and Wu, D. (1993). DNA polymorphisms of apolipoprotein B in the population of Taiwan. **J Formos Med Assoc.** 92: 330-335.

Wu, X., Sakata, N., Dixon, J., and Ginsberg, H.N. (1994). Exogenous VLDL stimulates apolipoprotein B secretion from HepG2 cells by both pre-and post-translational mechanism. **J Lipid Res.** 35(7): 1200-1210.

Wu, J.H. (1995). Sequence of apolipoprotein B 3′ hypervariable alleles. **Gene.** 159: 235-237.

Wu, J.H., Chern, M.S., Lo, S.K., Wen, M.S., and Kao, J.T. (1996). Apolipoprotein B 3′ hypervariable repeat genotype: association with plasma lipid concentration, coronary heart disease, and other restriction fragment polymorphisms. **Clin Chem.** 42(6): 927-932.

Wyman, A.R., and White, R. (1980). A high polymorphic locus in human DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77(11): 6754-6758.

Yamamoto, T., Bishop, R.W., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Russell, D.W. (1986). Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHI rabit. **Science.** 232(4755): 1230-1237.

Yang, C.Y., Chen, S.H., and Gianturco, S.H. (1986). Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. **Nature.** 323: 738-742.

Yang, C.Y., Gu, Z.W., Weng, S.A., Kim, T.W., and Chen, S.H. (1989). Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins. **Arteriosclerosis.** 9: 96-108.

Young, S.G., Bertics, S.J., Scott, T.M., Dubois, B.W., Curtiss, L.K., Witztum, J.L. (1986). Parallel expression of the MB 19 genetic polymorphism in apoprotein B-100 and apoprotein B-48. **J Biol Chem**. 261(7): 2995-2998.

http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RNA_editing2.gif

http://www.navy.mi.th/navylady/content/article712.htm.