การกลายพันธุ์ในยีน LDL receptor กับ familial hypercholesterolemia

(Mutations in LDL receptor gene with familial hypercholesterolemia)

นันท์นภัส เติมวงศ์*

*สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

ภาวะไขมันในเลือดสูงมีหลายรูปแบบได้แก่ ภาวะระดับคอเลสเทอรอล (total cholesterol : TC) ในเลือดสูง ภาวะระดับไทรกลีเซอไรด์ (triglyceride : TG) ในเลือดสูง ภาวะระดับ low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ในเลือดสูง นอกจากนี้ระดับ high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ในเลือดต่ำยังเป็นภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติอีกแบบหนึ่ง ซึ่งภาวะระดับไขมันผิดปกติอาจเป็นแบบใดแบบหนึ่งหรือร่วมกันตั้งแต่ 2 อย่างขึ้นไป พบว่าระดับคอเลสเทอรอลในเลือดของมนุษย์ถูกควบคุมโดยหลายยีน แต่ยีนที่มีความสำคัญและเป็นตัวหลักคือยีน LDL receptor และยีน apolipoprotein B-100 (apo B-100) ซึ่งถ้ามีความผิดปกติของยีนดังกล่าวจะทำให้ระดับไขมันในเลือดผิดปกติ และเป็นภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติที่มีสาเหตุมาจากพันธุกรรม โรคที่พบบ่อย คือ familial hypercholesterolemia (FH) และ familail defective apolipoprotein B-100 (FDB) ซึ่ง FH จะพบได้มากกว่า (http://ittm.dtam.moph.go.th/data_articles/2548) ในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะ FH เพราะเกิดจากความผิดปกติของยีน LDL receptor

Familial hypercholesterolemia (FH)

เป็นชนิดที่พบได้บ่อยสาเหตุหลักเกิดจากการสร้างยีน LDL receptor ในตับและเนื้อเยื่อนอกตับ (extrahepatic tissue) ผิดปกติ ทำให้เกิดภาวะคอเลสเทอรอลในเลือดสูงตลอดเวลา ซึ่ง LDL-C ที่คั่งอยู่ในเลือดสามารถเกาะหลอดเลือดหัวใจทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Goldstein et al., 1989) นอกจากนี้ยังเกิดพยาธิสภาพคือคอเลสเทอรอลไปสะสมที่เอ็น ข้อ และผิวหนัง เรียกว่า xanthomas คอเลสเทอรอลไปสะสมที่ผนังหลอดเลือดเรียก atheromas และคอเลสเทอรอลไปสะสมที่ตาเรียก arcus cornealis (Lind et al., 1998) ดังนั้น

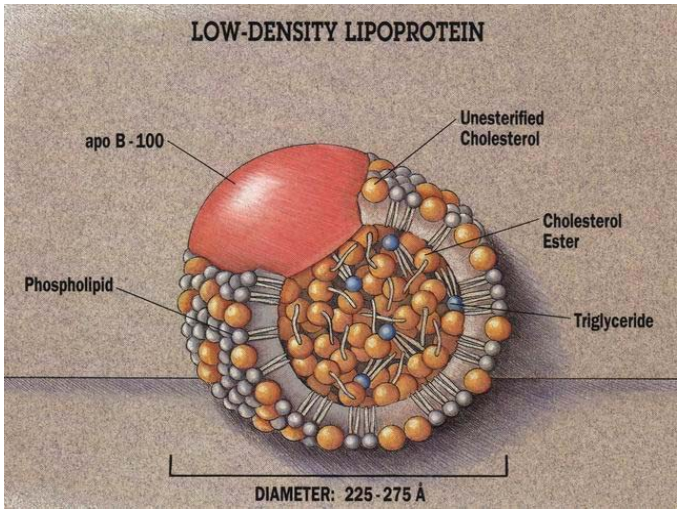
แบบที่ 1 เรียกว่า heterozygous FH เกิดจาก LDL receptor มีการกลายพันธุ์ของยีนเพียงข้างเดียว ทำให้บุคคลนั้นมีระดับคอเลสเทอรอลสูงกว่าคนปกติ 2 เท่า ประมาณ 350-500 mg/dl และมีโอกาสเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน เมื่ออายุเฉลี่ยประมาณ 30-40 ปี โดยทั่วไปพบผู้ป่วย heterozygous FH ประมาณ 1 คน ใน 500 คน

แบบที่ 2 เรียกว่า homozygous FH เกิดจาก LDL receptor มีการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองข้าง ทำให้บุคคลนั้นมีระดับคอเลสเทอรอลสูงกว่าคนปกติ 4 เท่า ประมาณ 600-1,200 mg/dl และมีโอกาสเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันตั้งแต่อายุยังน้อย โดยทั่วไปพบผู้ป่วย homozygous FH ประมาณ 1 คน ใน 1,000,000 คน

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าทั้ง heterozygous FH และ homozygous FH จะเกี่ยวข้องกับการเกิด premature coronary heart disease แต่ผู้ป่วย homozygous FH จะมีระดับคอเลสเทอรอลในเลือดสูงมากและมีความรุนแรงของโรคมากกว่า พบว่ามักจะเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจก่อนอายุครบ 20 ปี (Leitersdorf et al., 1990; Helen et al., 1992; Hoeg et al., 1993; Jensen et al., 1996)

โครงสร้างของ LDL

ลิโพโปรตีนชนิด LDL สังเคราะห์ขึ้นในกระแสเลือดจาก very low density lipoprotein (VLDL) และ intermediate density lipoprotein (IDL) อนุภาคมี apo B-100 และลิพิดประกอบไปด้วยคอเลสเทอรอลทั้งที่อยู่ในรูปของคอเลสเทอรอลอิสระและคอเลสเทอริลเอสเทอร์ ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบมากที่สุด มีไทรกลีเซอไรด์ลดลง (ภาพที่ 1) โดย LDL จะมีปริมาณคอเลสเทอรอลเป็น 2 ใน 3 ของปริมาณคอเลสเทอรอลทั้งหมดในกระแสเลือด ดังนั้น LDL จึงมีบทบาทสำคัญในการขนส่งคอเลสเทอรอลไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย

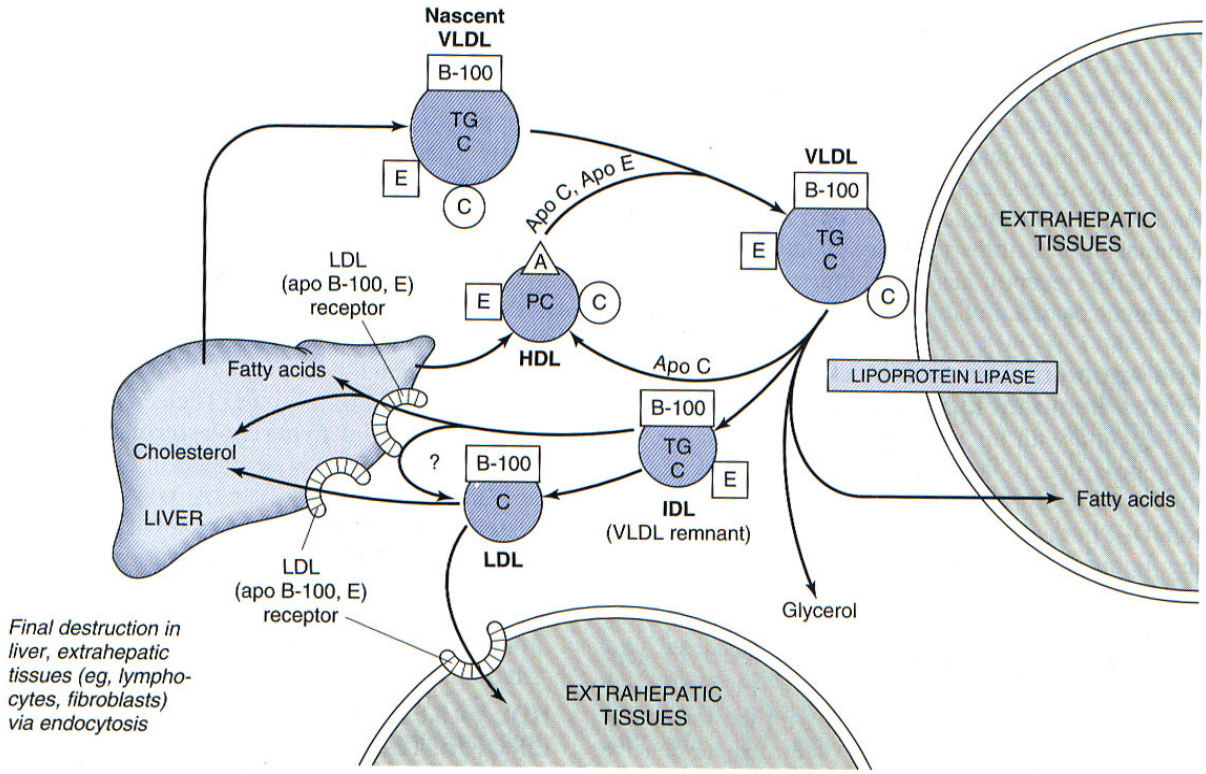


ภาพที่ 1. โครงสร้างของ LDL
ที่มา : (Grundy, 1990)

การสังเคราะห์และเมแทบอลิซึมของ LDL

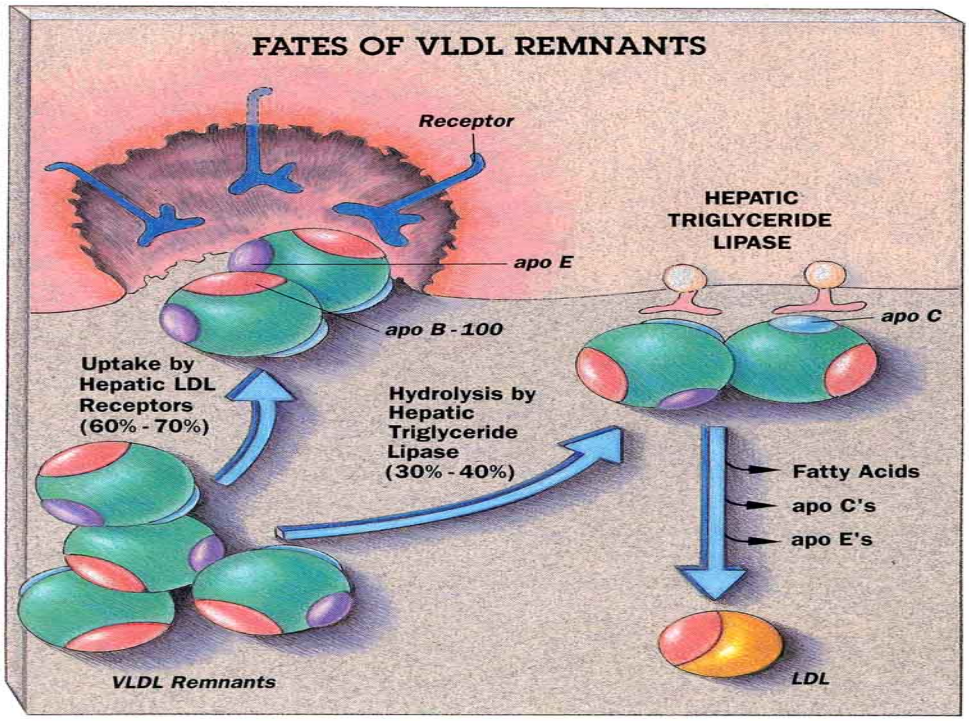
เมื่อตับสังเคราะห์คอเลสเทอรอลและไทร-กลีเซอไรด์แล้วจะส่งออกในรูปของ nascent VLDL โดยมารวมกับโปรตีนที่สังเคราะห์จาก rough endoplasmic reticulum ที่บริเวณ golgi apparatus และส่งออกในลักษณะ exocytosis โดยมี apolipoprotein B-100 เป็นองค์ประกอบหลักและมี apolipoprotein E และ apolipoprotein C อยู่บ้าง จะเห็นได้ว่า VLDL ทำหน้าที่ขนส่งลิพิดที่สังเคราะห์ขึ้นมาภายในร่างกาย (endogenous lipid) ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ

เมื่อ nascent VLDL ล่องลอยเข้าสู่กระแสเลือดจะรับเอา apolipoprotein E และ apolipoprotein C จาก HDL กลายเป็น VLDL และเมื่อไปถึงเซลล์เป้าหมาย apolipoprotein C จะกระตุ้นให้เอนไซม์ lipoprotein lipase ที่บริเวณผนังหลอดเลือดทำงาน ย่อยสลายไทรกลีเซอไรด์ภายใน VLDL จนได้กรดไขมัน (fatty acid) ใช้เวลาประมาณ 15-60 นาที และส่ง apolipoprotein C กลับไปสู่ HDL ในขณะที่มีการแลกเปลี่ยนลิพิดที่เป็นองค์ประกอบใน VLDL ที่เหลือกับ HDL โดย HDL ส่งคอเลสเทอริลเอสเทอร์ (cholesteryl ester) ไปให้ VLDL ในขณะที่ VLDL ส่งไทรกลีเซอไรด์ที่เหลืออยู่และฟอสโฟลิพิดไปให้ HDL ทำให้โมเลกุลของ VLDL มีขนาดเล็กลงและมีความหนาแน่นมากขึ้นอยู่ในรูป VLDL remnant ซึ่งจะเดินทางต่อกลับไปยังตับ โดยในกระแสเลือดพบ VLDL remnant เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามขนาดอนุภาค คือกลุ่มที่มีขนาดใหญ่และกลุ่มที่มีขนาดเล็ก กลุ่มที่มีขนาดเล็กอาจเรียกอีกอย่างว่าลิโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นปานกลาง (intermediate density lipoprotein) หรือ IDL และ IDLจะถูกเอนไซม์ hepatic lipase ย่อยไทรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิพิดที่เหลือจากการแลกเปลี่ยนกับคอเลสเทอริลเอสเทอร์จาก HDL ทำให้ได้เป็น LDL ซึ่งยังล่องลอยอยู่ในกระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ หรือกลับไปยังตับอีกครั้งก็ได้ ในขณะที่กลุ่มของ VLDL remnant ที่มีขนาดใหญ่ (ยังคงมี apolipoprotein E อยู่ที่ผิวเป็นจำนวนมาก) จะจับกับ receptor จำเพาะที่ตับและเข้าสู่ตับโดยวิธี endocytosis แล้วไปรวมกับไลโซโซม (lysosome) จากนั้นจะถูกย่อยสลายเอาส่วนของคอเลสเทอรอล คอเลสเทอริลเอสเทอร์ กรดไขมัน และอื่นๆ (ภาพที่ 2 และ 3) ดังนั้นลิโพโปรตีนที่ยังล่องลอยอยู่ในกระแสเลือดคือ LDL เนื่องจาก VLDL และ VLDL remnant ถูกสลายไปภายในเวลาไม่เกินชั่วโมง ในขณะที่ LDL จะอยู่ในเลือดโดยเฉลี่ยนานถึง 3 วัน LDL จึงเป็นตัวขนส่งคอเลสเทอรอลจากตับไปให้เนื้อเยื่อต่างๆ (วิชัย เอื้อสิยาพันธุ์, 2545; ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์, 2546)



ภาพที่ 2. การสังเคราะห์และเมแทบอลิซึมของ LDL

ที่มา : (Murray et al., 2000)

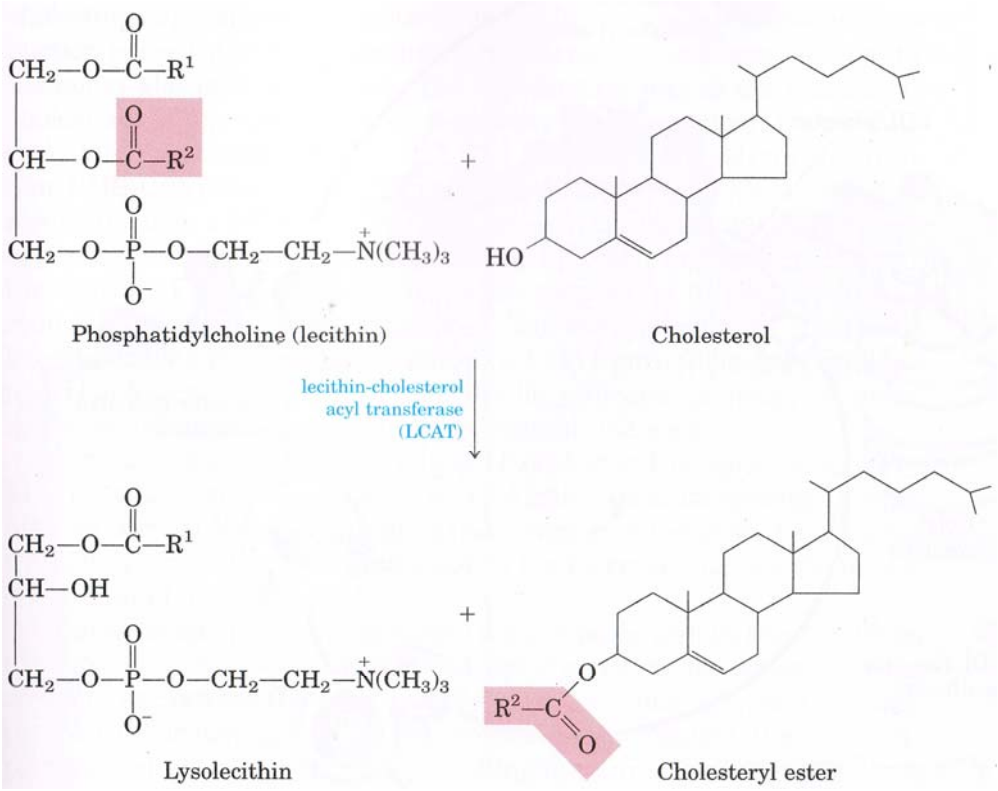


ภาพที่ 3. วิถีของ VLDL remnant

ที่มา : (Grundy, 1990)

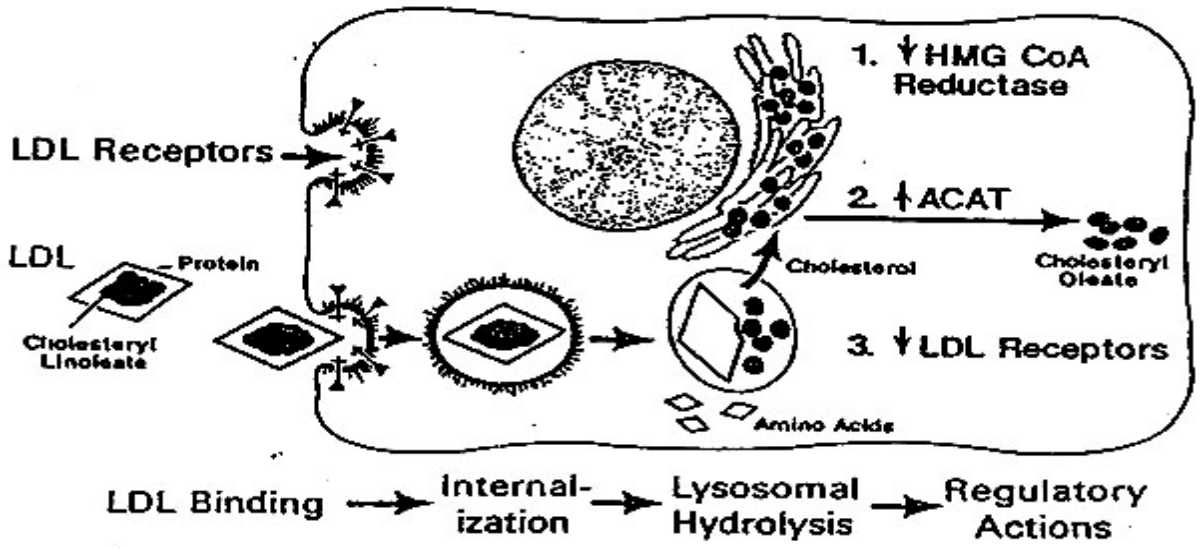
การขนส่งและการใช้คอเลสเทอรอล

LDL มีคอเลสเทอรอลทั้งที่อยู่ในรูปของคอเลสเทอรอลอิสระและคอเลสเทอริลเอสเทอร์ ซึ่งคอเลสเทอริลเอสเทอร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ (esterification) ระหว่างคอเลสเทอรอลกับกรดไขมัน โดยกรดไขมันส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ดังกล่าวเกิดขึ้นในกระแสเลือดและอาศัยเอนไซม์ lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) ที่หลั่งมาจากตับเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีฟอสฟาทิดิลโคลีน (phosphatidylcholine) หรือที่รู้จักในชื่อ lecithin เป็นตัวให้กรดไขมันหรือหมู่เอซิล (acyl group) กับคอเลสเทอรอล โดยคอเลสเทอริลเอสเทอร์ที่ได้มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำมากกว่าคอเลสเทอรอลอิสระ (ภาพที่ 4) นอกจากนี้คอเลสเทอริลเอสเทอร์ยังสามารถสังเคราะห์ได้ที่ตับโดยอาศัยเอนไซม์ acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และ fatty acyl-CoA เป็นตัวให้หมู่เอซิลหรือกรดไขมัน



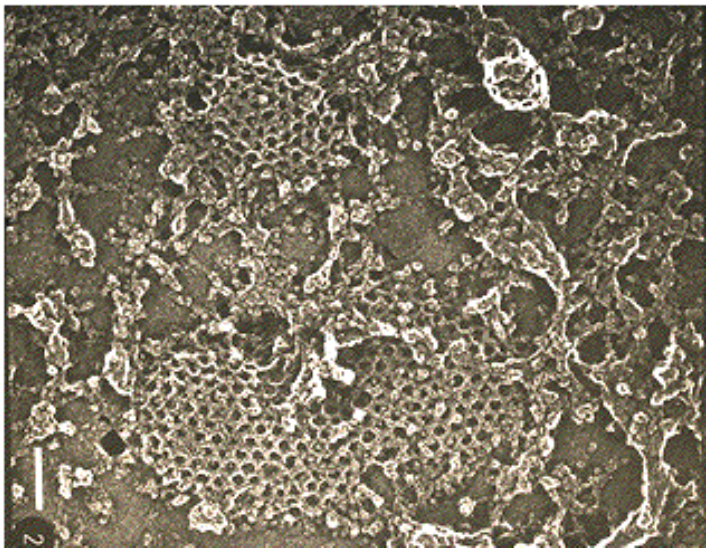
ภาพที่ 4. ปฏิกิริยาเอสเทอร์สำหรับการสังเคราะห์คอเลสเทอริลเอสเทอร์ในกระแสเลือด
ที่มา : (Nelson et al., 2000)

LDL จะเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ได้โดยจับกับ LDL receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่ง LDL receptor สังเคราะห์ที่บริเวณ rough endoplasmic reticulum (RER) มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีมวลโมเลกุล 120 KDa หลังจากนั้นส่งผ่านไปยัง golgi apparatus และเกิดกระบวนการ post translational modification ภายในโมเลกุล ทำให้เกิดเป็น LDL receptor ที่สมบูรณ์ โดยภายในโครงสร้างประกอบด้วย 2 สายของ asparagines-linked (N-linked) oligosaccharide และประมาณ 18 สายของ serine/threonine-linked (O-linked) oligosaccharide ทำให้มีมวลโมเลกุลเป็น 160 KDa (http://nobelprize.org/medicine/laureates/1985/brown-goldstein-lecture.pdf; http://www.umd.necker.fr/ldlr/gene.htm.) ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากการสังเคราะห์ LDL receptor ที่สมบูรณ์จะพบ LDL receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Kreisberg et al., 1992) บริเวณ LDL receptor ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นกรดและมีประจุลบ (negative-charge acidic amino acids) ได้แก่กรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) และแอสพาร์ทิก (aspartic acid) ทำให้สามารถจับจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นเบสและมีประจุบวก (positive-charge basic amino acids) ได้แก่กรดอะมิโนไลซีน (lysine) อาร์จินีน (arginine) และฮีสติดีน (histidine) ของ apolipoprotein B-100 ของ LDL และ apolipoprotein E ของ IDL ได้ (Kreisberg et al., 1992; Poledne et al., 1993) แล้วนำเอา LDL เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยวิธีการที่เรียกว่า receptor-mediated endocytosis (ภาพที่ 5) โดย receptor จะรวมกลุ่มกันที่เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณโครงสร้างลักษณะเป็นหลุมที่เรียกว่า coated pit โดยบริเวณนี้มีโปรตีนชื่อคลาธริน (clathrin) เป็นจำนวนมากซึ่งสามารถจัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างคล้ายกรงตาข่าย (cagelike structure) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5. การนำ LDL เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี receptor-mediated endocytosis โดย LDL receptor จับอย่างจำเพาะกับ apo B-100 ของ LDL

ที่มา : (http://www.chanteclair.com.au/scientific/_data/page/49/Lipo_Fig_06_Sequential_steps.gif)



ภาพที่ 6. โครงสร้างคล้ายกรงตาข่าย (cagelike structure) ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของโปรตีน clathrin ที่บริเวณ coated pit

ที่มา : (http://www.blc.arizona.edu/INTERACTIVE/LDL3.95/life.html)

LDL จะถูกนำเข้าไปในเซลล์ทั้งโมเลกุล โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีโปรตีนคลาธรินเป็นจำนวนมากล้อมรอบเป็นถุงเล็กๆ เรียกว่า endocytotic vesicle โดยถุงเล็กๆ เหล่านี้จะหลอมรวมกันเกิดเป็น endosome ขึ้น ซึ่งจะเป็นการกระตุ้นให้โปรตอนปัมพ์ที่อาศัยพลังงาน (ATP-driven proton pump) ทำงาน ทำให้ภายใน endosome มี pH ลดลงเป็น 6.5 ภายใต้สภาวะนี้ทำให้ LDL แยกออกจาก LDL receptor และ LDL receptor สามารถนำกลับไปใช้ใหม่สำหรับจับกับ LDL ตัวใหม่ได้หลายร้อยครั้งก่อนจะสลายไป และในแต่ละรอบใช้เวลาประมาณ 10 นาที จากนั้น endosome จะไปหลอมรวมกับ lysosome ซึ่งมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนและลิพิด โดย apolipoprotein B-100 จะถูกย่อยจนได้กรดอะมิโน และคอเลสเทอริลเอสเทอร์จะถูกย่อยจนได้คอเลสเทอรอลอิสระและกรดไขมัน (Brown et al., 1986; Health et al., 2001) สำหรับคอเลสเทอรอลอิสระจะเคลื่อนที่ไปยัง endoplasmic reticulum ซึ่งปกติจะใช้คอเลสเทอรอลไปในการสังเคราะห์เยื่อหุ้มชนิดต่างๆ (Goldstein et al., 1989; Marks et al., 1996; Montgomery et al., 1996; http://www..ipekrabi.ac.th/Elearning/sumon/lipid.doc) นอกจากนี้ปริมาณคอเลสเทอรอลที่เพิ่มขึ้นในเซลล์จะมีผลต่อระบบต่างๆ ภายในเซลล์ดังนี้

1. มีผลยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในเซลล์ โดยคอเลสเทอรอลที่เพิ่มขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์คอเลสเทอรอล นอกจากนี้คอเลสเทอรอลยังไปกดการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ HMG-CoA reductase รวมทั้งไปกระตุ้นให้มีการทำลายเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นด้วย

2. มีผลกระตุ้นเอนไซม์ acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) เพื่อเร่งให้มีการสะสมคอเลสเทอรอลส่วนเกินในรูปของคอเลสเทอริลเอสเทอร์

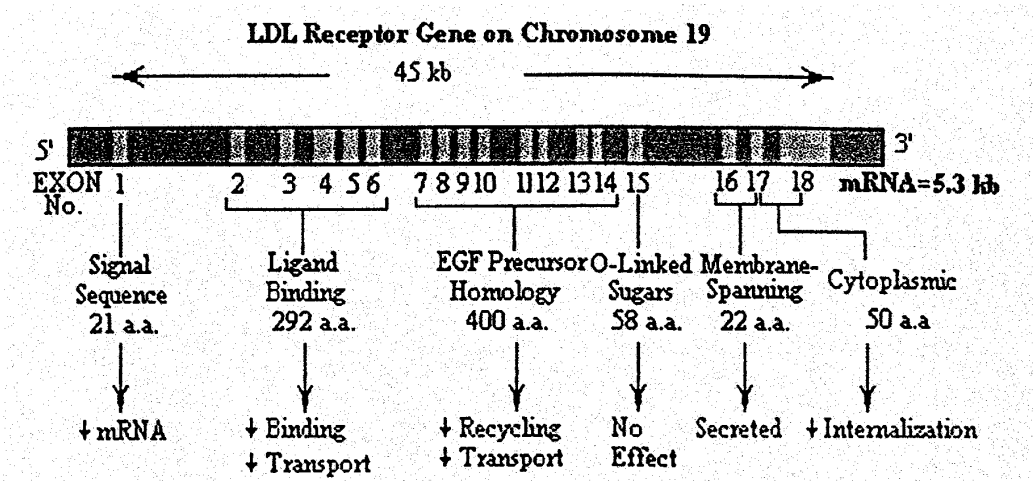
3. มีผลควบคุมการสังเคราะห์ LDL receptor โดยไปลดปริมาณ mRNA ที่ใช้สำหรับ

เป็นที่ทราบกันดีว่าคอเลสเทอรอลมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ซึ่งมักจะเป็นสาเหตุของการเกิดอาการหัวใจวาย (heart attack) โดยปกติ LDL ค่อนข้างจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ซึ่งการเกิดออกซิเดชันของ LDL จะหมายถึงการเกิด peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว การเกิด hydroxylation ของคอเลสเทอรอล และการเกิดออกซิเดชันของกรดอะมิโนใน apolipoprotein ที่เป็นองค์ประกอบของ LDL ทำให้มี LDL อยู่ในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized LDL) ในกระแสเลือด

เซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ จะนำเอา LDL เข้าสู่เซลล์ในปริมาณจำกัดเท่าที่เซลล์ต้องการเท่านั้น ดังนั้นถ้ามี LDL สูงในกระแสเลือดจะทำให้มี LDL ส่วนเกินสะสมอยู่ในกระแสเลือดมากขึ้น จึงมีโอกาสเกิด oxidized LDL เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง oxidized LDL นี้จะถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ (macrophage) ซึ่งจะนำเอา oxidized LDL เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวรับที่เรียกว่า scavenger receptor ซึ่ง scavenger receptor สามารถนำเอา oxidized LDL เข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่จำกัดปริมาณ ทำให้สามารถพบเม็ดเลือดขาวที่กิน oxidized LDL เข้าไปมากๆ ได้ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวที่กิน oxidized LDL เข้าไปมากๆ จะมีคอเลสเทอรอลมากมายในเซลล์ จึงเห็นเซลล์มีลักษณะเหมือนมีฟองเต็มเซลล์ เรียกเซลล์ที่มีลักษณะดังกล่าวว่า foam cell ซึ่งเซลล์เหล่านี้มักจะไปเกาะที่ผนังเส้นเลือดฝอยและสะสมเกิดเป็นแผ่นคราบ (plaque) เกาะที่ผนังเส้นเลือดฝอย ทำให้เกิด atherosclerosis และถ้าสะสมมากจนอุดตันเส้นเลือดฝอยที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจจะทำให้เกิดอาการหัวใจวายได้

ยีนของ LDL receptor

ยีนของ LDL receptor ในมนุษย์อยู่บนปลายแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 19 (p13.1-p13.3) มีความยาว 45 kb ประกอบด้วย 18 exon กับ 17 intron และ mRNA มีความยาว 5.3 kb ประกอบด้วยกรดอะมิโน 860 ตัว (ภาพที่ 7) (Vuorio et al., 1995)



ภาพที่ 7. โครงสร้างยีนของ LDL receptor

ที่มา : (http://www.ucl.ac.uk/fh/mutab.html.)

Exon 1 ประกอบด้วยบริเวณ 5′ untranslated และกรดอะมิโนที่เป็น signal peptide ซึ่งมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) จำนวน 21 ตัว โดย signal peptide นี้จะถูกตัดออกจากโมเลกุลในระหว่างที่ LDL receptor เคลื่อนไปยัง rough endoplasmic reticulum ทำให้ LDL receptor ที่สมบูรณ์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 839 ตัว (Soutar et al., 1989) จากโครงสร้างของ LDL receptor protein (ภาพที่ 8 ก และ ข) พบว่าประกอบด้วย 5 domain ดังนี้

Domain ที่ 1 คือ exon 2–exon 6 อยู่บริเวณ NH_2-terminal เป็นส่วน ligand-binding domain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 292 ตัว มี 7 หน่วยซ้ำคือ exon 2 (หน่วยซ้ำที่ 1) exon 3 (หน่วยซ้ำที่ 2) exon 4 (หน่วยซ้ำที่ 3,4 และ 5) exon 5 (หน่วยซ้ำที่ 6) และ exon 6 (หน่วยซ้ำที่ 7) แต่ละหน่วยประกอบด้วยกรดอะมิโน 40 ตัว และมี 6 cysteine residue ซึ่งจะเกิดพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะภายในโมเลกุลที่บริเวณ carboxyl-terminal ของแต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นกรดและมีประจุลบ Asp-X-Ser-Asp-Glu (DXSDE) ซึ่งมีความสำคัญในการจับกับกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นเบสและมีประจุบวกของ apolipoprotein B-100 และ apolipoprotein E (Soutar et al., 1998; Loubser et al., 1999; http://www.ucl.ac.uk/fh/mutab.html.)

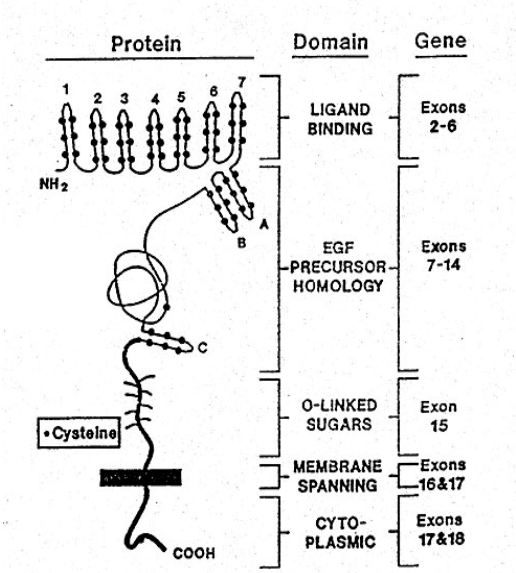
Domain ที่ 2 คือ exon 7–exon 14 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 400 ตัว มีลักษณะเหมือนยีนของ epidermal growth factor (EGF) precursor ที่พบในมนุษย์ 33 เปอร์เซ็นต์จึงเรียกว่า epidermal growth factor (EGF) precursor homology domain การเปลี่ยนแปลงใน EGF precursor homology domain มีผลทำให้การขนส่ง LDL receptor ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลงหรือ LDL receptor ไม่สามารถจับกับ ligand หรือไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ domain นี้ประกอบด้วย 3 growth factor แต่ละ growth factor ประกอบด้วยกรดอะมิโน 40 ตัว และมี cysteine residue เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก แต่จะแตกต่างจาก cysteine residue ที่พบที่บริเวณ ligand binding domain โดย 2 growth factor แรกติดกันเรียกว่า A (exon 7) และ B (exon 8) แยกออกจากส่วน C (exon 14) โดยกรดอะมิโน 280 ตัว ซึ่งประกอบด้วย 5 ชุดของ motif ที่อนุรักษ์ไว้คือ Try-Trp-Thr-Asp (YWTD) แต่ละชุดประกอบด้วยกรดอะมิโน 40-60 ตัว (Soutar et al., 1989) domain นี้มีความสำคัญในการแยก LDL จาก LDL receptor ภายใน endosome ภายใต้ pH เป็น 6.5 รวมทั้งทำให้ LDL receptor ไม่สลายตัวเร็ว สามารถนำกลับไปใช้ใหม่สำหรับจับกับ LDL ตัวใหม่ได้ และทำหน้าที่เป็น ligand-binding domain สำหรับจับกับ LDL บนเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าถ้าเกิดการกลายพันธุ์บริเวณ domain นี้ LDL receptor จะไม่สามารถปล่อย ligand และไม่เกิดการนำ LDL receptor กลับไปใช้ใหม่ ดังนั้น LDL receptor จะสลายไปและส่งผลให้คอเลสเทอรอลในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น (Davis et al., 1987; Cearro et al., 1996)

Domain ที่ 3 คือ exon 15 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 58 ตัว และมีกรดอะมิโนเซรีน (serine) และทรีโอนีน (threonine) เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก บริเวณนี้เป็นตำแหน่งที่จับของสาย O-linked sugar (http://www.ucl.ac.uk/fh/mutab.html.)

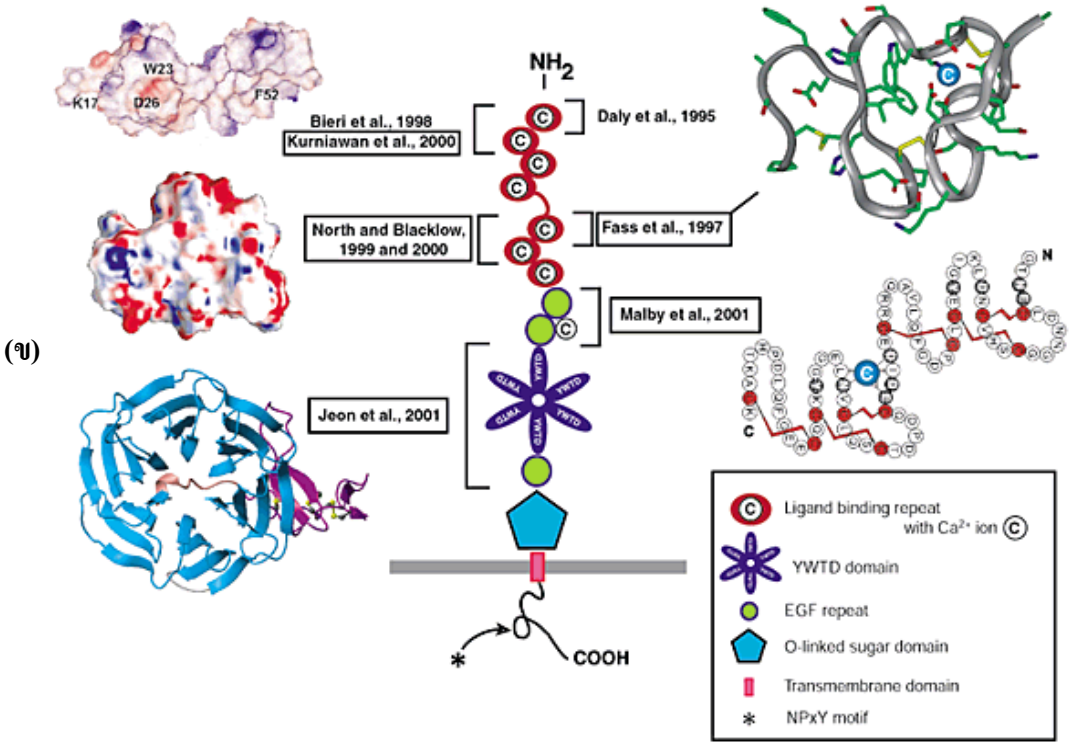
Domain ที่ 4 คือ exon 16 และบริเวณปลาย 5′ ของ exon 17 ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกจำนวน 22 ตัว เชื่อมติดกับ residue ที่มีประจุ ซึ่งประกอบเป็นmembrane-spanning domian ทำหน้าที่ยึด LDL receptor ไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Soutar et al., 1989; http://www.ucl.ac.uk/fh/mutab.html.)

Domain ที่ 5 และ cytoplasmic domain ของ LDL receptor คือ carboxyl-terminal cytoplasmic tail ประกอบด้วยกรดอะมิโน 50 ตัว domain นี้คือส่วนที่เหลือของ exon 17 และบริเวณปลาย 5′ ของ exon 18 (Soutar et al., 1989) มีความสำคัญในการเคลื่อนที่ของ LDL receptor ในกระบวนการ endocytosis (coated pits) บนเยื่อหุ้มเซลล์ (Lehrman et al., 1985) พบว่าการขาดหายไปหรือการแทนที่ของกรดอะมิโนที่บริเวณ cytoplasmic tail มีผลทำให้ LDL receptor ไม่เคลื่อนที่ใน clathrin-coated pits และไม่เกิดกระบวนการ internalization ส่วนที่เหลือของ exon 18 เป็นบริเวณ 3′ untranslated มีความยาว 2.6 kb (Athanikar et al., 1998)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 8. โครงสร้างของ LDL receptor domain

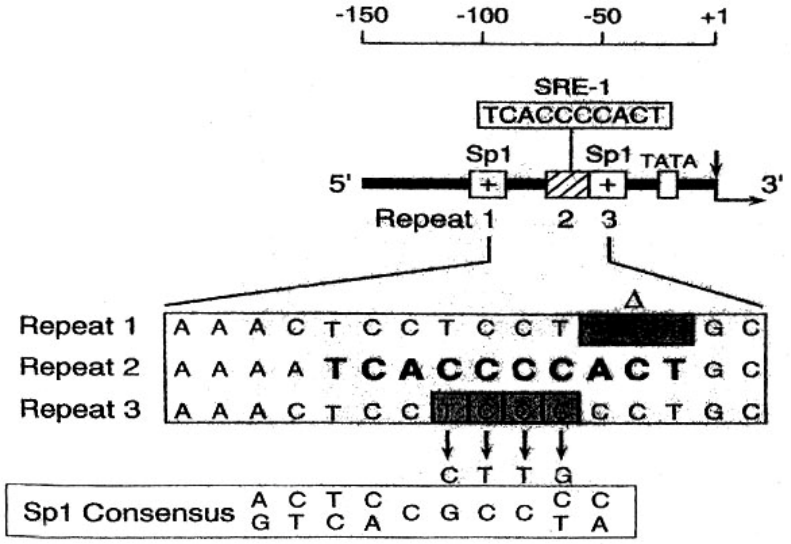
ที่มา : (ก) http://www.umd.necker.fr/ LDLR/gene.htm (ข) Jeon et al., 2001

กระบวนการควบคุมการสังเคราะห์ LDL receptor

การสังเคราะห์ LDL receptor ภายในเซลล์ขึ้นอยู่กับปริมาณของคอเลสเทอรอลในเซลล์ ถ้าปริมาณคอเลสเทอรอลในเซลล์ลดลง จะมีการกระตุ้นยีนของ LDL receptor เพื่อให้มีการสังเคราะห์ LDL receptor เพิ่มขึ้น สำหรับจับกับ LDL และทำให้ปริมาณคอเลสเทอรอลในเซลล์เพิ่มขึ้น (Edwards et al., 2000)

LDL receptor ถูกควบคุมโดยทางลำดับ promoter ของยีนใน LDL receptor และ SREBP เป็น transcription factor (Goldstein et al., 1989) promoter เป็นลำดับที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนใน LDL receptor ลำดับนี้จะอยู่ที่ตำแหน่ง 250 คู่เบสทาง upstream ของรหัสเริ่มต้น คือ AUG ซึ่ง promoter ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ TATA box และ Sterol Regulatory Element (SRE) โดย TATA box เป็นตำแหน่งของการจับกับเอนไซม์ RNA polymerase สำหรับการเริ่มต้นของกระบวนการถอดรหัสของยีน ส่วน SRE ประกอบด้วย 3 หน่วยซ้ำเรียกว่า repeat 1, repeat 2 และ repeat 3 แต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วย 16 นิวคลีโอไทด์ โดย repeat 1 และ repeat 3 ทำอันตรกิริยากับ transcription factor Sp1 เพื่อที่จะเกิดการถอดรหัสของยีนใน LDL receptor ส่วน repeat 2 ประกอบด้วย SRE-1 ซึ่งมีความยาว 10 คู่เบส (ภาพที่ 9)

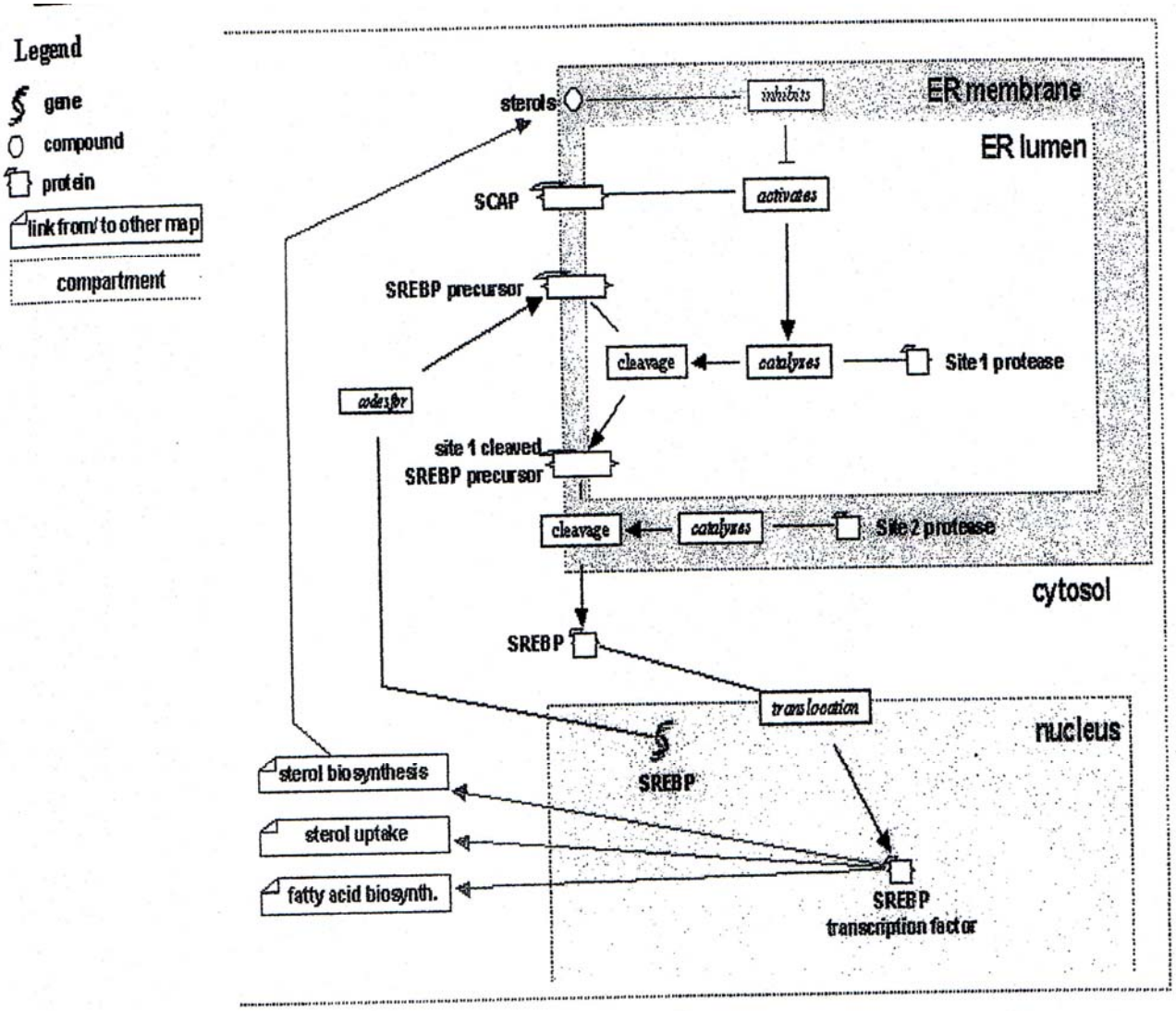
SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) precursor เริ่มสังเคราะห์ที่ rough endoplasmic reticulum มีมวลโมเลกุลเป็น 125 KDa หลังจากนั้นส่งผ่านไปยัง golgi apparatus โดยโปรตีนที่ชื่อ chaperone ถ้าความเข้มข้นของ sterol ในเซลล์ลดลง เอนไซม์ protease จะย่อย SREBP precursor โดยการควบคุมของ SREBP cleavage-activating protein (SCAP) ซึ่งจะเกิดสารประกอบกับ SREBPs ในเยื่อหุ้มของ rough endoplasmic reticulum



ภาพที่ 9. ลำดับ promoter ของยีนใน LDL receptor

ที่มา : (Makar et al., 1998)

SCAP จะขนส่ง SREBP precursor ไปที่ golgi apparatus ซึ่งมีเอนไซม์ protease S1P และ protease S2P ย่อย SREBP เพื่อที่จะปล่อย NH_2-terminal ของ SREBP ออกมา หลังจากย่อย SREBP เสร็จ SREBP จะถูกปล่อยออกจาก RER ดังนั้น NH_2-terminal ของ SREBP จะเคลื่อนตัวไปที่นิวเคลียส ซึ่งจะมีผลไปกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสของยีนใน LDL receptor โดยการจับไปที่ repeat 2 ของ SRE ภายในยีนนี้ เมื่อระดับคอเลสเทอรอลภายในเซลล์มากเกินไป SCAP ไม่ทำงาน และ SREBP จะอยู่ที่เยื่อหุ้มของ RER (ภาพที่ 10) ถ้าไม่มี sterol ภายในเซลล์กระบวนการถอดรหัสของยีนใน LDL receptor เพิ่มขึ้น ในขณะที่ถ้ามีคอเลสเทอรอล กระบวนการถอดรหัสของยีนใน LDL receptor ลด ลง (Goldstein et al., 1989; Makar et al., 1998; Edwards et al., 2000) ดังนั้นเมื่อระดับคอเลสเทอรอลภายในเซลล์เพิ่มขึ้นการสร้าง LDL receptor ภายในเซลล์ลดลง ในทางกลับกันถ้าระดับคอเลสเทอรอลภายในเซลล์ลดลงการสร้าง LDL receptor ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 10. วิถีของ SREBP

ที่มา : (Goldstein et al., 1989)

การแบ่งประเภทของการกลายพันธุ์ในยีนของ LDL receptor

ลักษณะปรากฏ (phenotype) อันเนื่องมาจากมีความผิดปกติของยีนในการสังเคราะห์ LDL receptor แบ่งได้ 5 ประเภท (ภาพที่ 11) (Brown et al., 1986; Goldstein et al., 1989; Soutar et al., 1998)

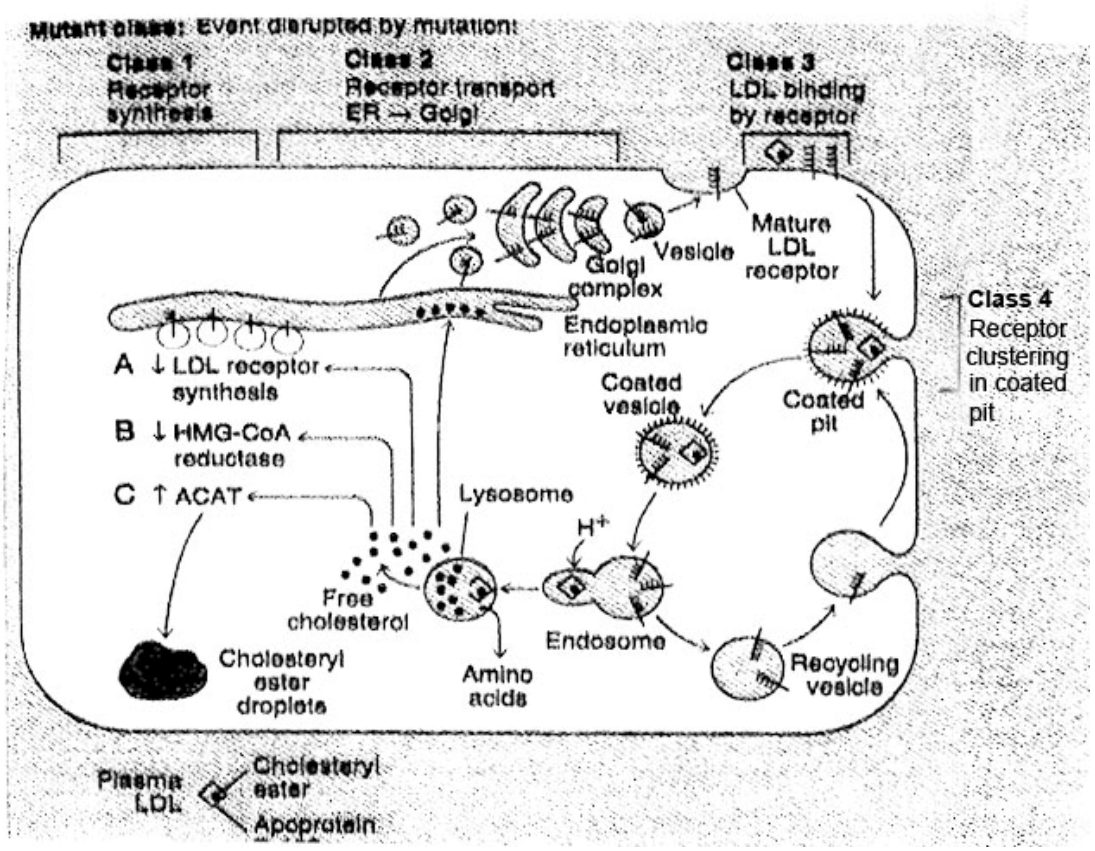
1. Class ที่ 1 เรียกว่า null allele สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ nonsense หรือ frameshif พบว่ากระจายแบบ random ระหว่าง exon ของยีน แล้วทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ receptor ที่ rough endoplasmic reticulum ได้ การที่ไม่มี truncated protein อาจบอกถึงความไม่มีเสถียรภาพและการสลายตัวอย่างรวดเร็วของ mRNA ที่กลายพันธุ์หรือเกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดปกติ การกลายพันธุ์ของ class ที่ 1 ถ้าพบอยู่ในบริเวณ promoter จะไม่เกิดการสังเคราะห์ mRNA หรือโปรตีน

2. Class ที่ 2 เรียกว่า transport defective allele แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ Class 2A (completely) สังเคราะห์โปรตีนซึ่งไม่สามารถขนส่งออกจาก rough endoplasmic reticulum ได้ ดังนั้นจึงไม่พบ LDL receptor ที่สมบูรณ์ ที่มีมวลโมเลกุลเป็น 160 KDa และ Class 2B (partially) สังเคราะห์โปรตีนซึ่งสามารถขนส่งจาก rough endoplasmic reticulum ไปยัง golgi apparatus ในจำนวนที่ลดลง Class ที่ 2 พบที่บริเวณ EGF precursor homology domain

3. Class ที่ 3 เรียกว่า binding defective allele มีผลทำให้การจับกันระหว่าง LDL receptor และ LDL ผิดปกติแต่การสังเคราะห์และการขนส่ง LDL receptor เป็นปกติ สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ insertion หรือ deletion ในบริเวณ ligand binding domain หรือ EGF precursor homology domain การขาดหายไปของหน่วยซ้ำ cysteine residue ส่งผลทำให้ความสามารถในการจับกันระหว่าง LDL receptor และ LDL ลดลง

4. Class ที่ 4 เรียกว่า internalization defective allele พบว่า LDL receptor เคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์และจับ LDL ได้ปกติแต่ไม่สามารถรวมกลุ่มกันที่เยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบ clathrin-coated pit ได้ ดังนั้นจึงไม่เกิดกระบวนการ internalization

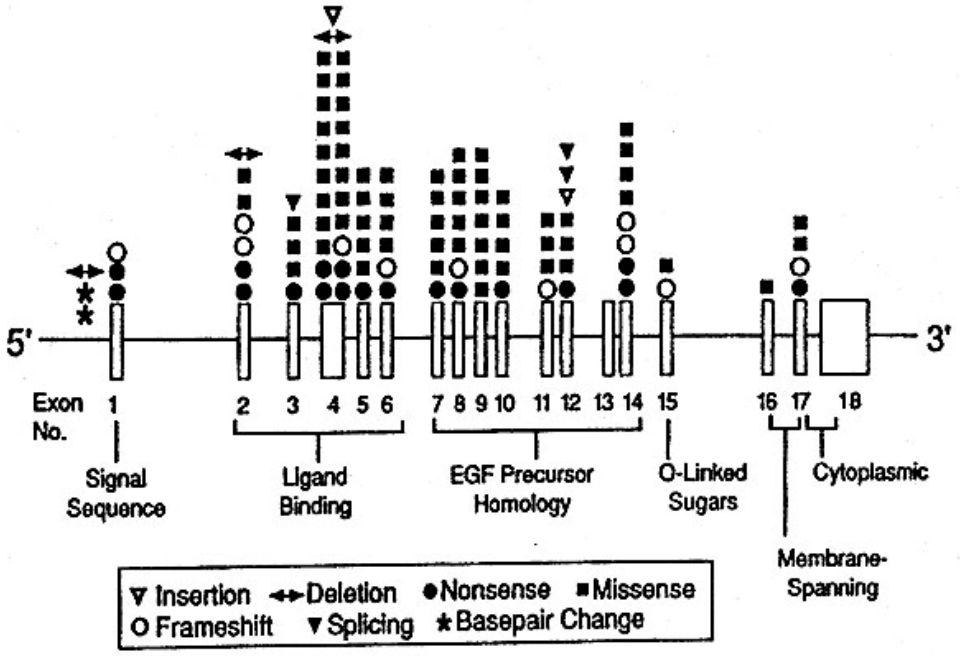
5. Class ที่ 5 เรียกว่า recycling defective allele พบว่า LDL receptor สามารถรวมกลุ่มกันที่เยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบ clathrin-coated pit และเกิดกระบวนการ internalization ได้แต่ LDL receptor จะไม่สามารถปล่อย ligand ใน endosome ดังนั้นจึงไม่เกิดการนำ LDL receptor กลับไปใช้ใหม่ การกลายพันธุ์ใน class ที่ 5 พบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ EGF precursor homology domain ถ้า ligand ไม่สามารถแยกจาก LDL receptor ได้ สารประกอบของ receptor-ligand จะเกิดการสลายตัวทำให้ไม่เกิดการนำ LDL receptor กลับไปใช้ใหม่



ภาพที่ 11. การแบ่งประเภทของการกลายพันธุ์ในยีนของ LDL receptor

ที่มา : (Makar et al., 1998)

ปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ของยีนในการสังเคราะห์ LDL receptor มีมากกว่า 920 การกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นแบบ point mutation แบ่งได้เป็น substitution 610 ตำแหน่ง small deletion 121 ตำแหน่ง small insertion หรือ duplication 53 ตำแหน่ง (Villeges et al., 2002) การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่พบบริเวณ ligand-binding domain (42 เปอร์เซ็นต์) พบมากที่ exon 4 โดยเฉพาะอย่างยิ่งหน่วยซ้ำที่ 5 ซึ่งพบว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะปรากฏที่รุนแรงของผู้ป่วย FH และ EGF precursor homology domain (47 เปอร์เซ็นต์) (Health et al., 2001) บริเวณ cytoplasmic tail พบการกลายพันธุ์ 3.4 เปอร์เซ็นต์ (พบใน exon ที่ 17 เป็น 3.2 เปอร์เซ็นต์ และ exon ที่ 18 เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์) บริเวณ membrane spanning domain และ promoter พบการกลายพันธุ์ 1.7 เปอร์เซ็นต์ และ O-linked sugar domain พบการกลายพันธุ์ 1.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) ส่วนการเกิดแบบ rearrangement พบบ่อยใน intron ที่ 1 ถึง intron ที่ 8 และ intron ที่ 12 ถึงบริเวณ 3′ untranslated ซึ่งจะพบลำดับที่ซ้ำเป็น Alu บ่อย จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์บริเวณ ligand-binding domain พบว่าเกิดที่บริเวณกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ 74 เปอร์เซ็นต์ และจะอยู่บริเวณ carboxyl-terminal ของแต่ละหน่วยซ้ำ ในขณะที่การกลายพันธุ์บริเวณ EGF precursor homology domain พบว่าเกิดที่บริเวณกรดอะมิโนที่ไม่ได้อนุรักษ์ 64 เปอร์เซ็นต์ และจะอยู่บริเวณ NH_2-terminal ของแต่ละหน่วยซ้ำ (Goldstein et al., 1989; Health et al., 2001)



ภาพที่ 12. point mutation และ small deletions/insertions ใน LDL receptor

ที่มา : (Goldstein et al., 1989)

จากการศึกษาพบว่าโอกาสเกิด FH มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติเรียกว่า founder's effect เป็นปรากฏการณ์ที่พบในประชากรที่แยกตัวออกมาเป็นเวลานานซึ่งขึ้นอยู่กับภูมิประเทศ ศาสนา เชื้อชาติ การเมือง พบใน French Canadians, Christian Lebanese, Finns และ Afrikaners เป็นต้น เช่นในประชากร Afrikaners จะพบผู้ป่วย FH บ่อยมาก โดยพบผู้ป่วย heterozygous FH ประมาณ 1 คน ใน 100 คนและ ผู้ป่วย homozygous FH ประมาณ 1 คน ใน 30,000 คน และพบการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งที่พบบ่อยมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ป่วย FH ของประชากร Afrikaners โดยพบ point mutation 2 ตำแหน่ง ใน exon ที่ 4 และ point mutation 1 ตำแหน่ง ใน exon ที่ 9 ของยีนใน LDL receptor (Leitersdorf et al., 1989)

สรุป

Familial hypercholesterolemia (FH) สาเหตุหลักเกิดจากการสร้างยีน LDL receptor ในตับและเนื้อเยื่อนอกตับ (extrahepatic tissue) ผิดปกติ ซึ่งเป็นถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal dominant ผู้ป่วยจะมีความผิดปกติในระดับยีน โดยยีนเกิดการกลายพันธุ์และส่งผลให้ไม่มีการสังเคราะห์ หรือสังเคราะห์ LDL receptor ที่มีความผิดปกติ ทำให้การกำจัด LDL-C ในกระแสเลือดลดลง LDL-C คั่งอยู่ในกระแสเลือดและก่อให้เกิดภาวะคอเลสเทอรอลในเลือดสูงตลอดเวลาจนสามารถเกาะหลอดเลือดหัวใจทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันได้ ลักษณะปรากฏ (phenotypes) อันเนื่องมาจากมีความผิดปกติของยีนที่พบในผู้ป่วย FH แบ่งได้เป็น 5 ประเภทได้แก่ Class ที่ 1 มีการสังเคราะห์ LDL receptor ลดลง เนื่องจากการกลายพันธุ์แบบ

เอกสารอ้างอิง

ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์. (2546). **ชีวเคมีทางการแพทย์** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพ: บุ๊คเน็ท

วิชัย เอื้อสิยาพันธุ์. (2545). **ชีวเคมีทางการแพทย์** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพ: บุ๊คเน็ท

Athanikar, J.N., and Osborne, T.F. (1998). Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95(suppl)(9): 4930-4935.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science** 232(4746): 34-47.

Cearro, A., Jensen, H.K., Casao, E., Civera, F., Bonillo, J.G., and Pocovi, M. (1996). Identification of a novel mutations in exon 13 of the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in two Spanish families. **Biochim Biophys Acta** 1316(1): 1-4.

Davis C.G., Goldstein J.L., Sudhof T.C., Anderson R.G.W., Russell D.W., and Brown M.S. (1987). Acid dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. **Nature** 326: 760-765.

Edwards, P.A., Tabor, D., Kast, H.R., and Venkateswaran, A. (2000). Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. **Biochemica Biophysica Acta** 1529(1-3): 103-113.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1989). **The metabolic and molecular bases of inherited disease** (6th ed.). New York: Mc Graw-Hill.

Grundy, S.M. (1990). **Cholesterol and atherosclerosis: diagnosis and treatment**. New York: Lippincott

Health, K.E., Gahan, M., Whittall, R.A., and Humpries, S.E. (2001). Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial

hypercholesterolemia: update, new features and mutations analysis. **Atherosclerosis** 154(1): 243-246.

Helen, H., Hobbs, H.H., Michael, S., and Brown, J.L.G (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene and their use in diagnosis of familial hypercholesterolemia. **Human mutation** 1: 445-466.

Hoeg, J.M. (1993). Homozygous familial hypercholesterolemia: a paradigm for phenotypic variation. **Am J Cardiol** 72(10):11D-14D.

Jensen, H.K., Jensen, L.G., Health, F., Hansen, P.S., and Meinertz H. (1996). Phenotypic characterization of patient homozygous for the D558N LDL receptor gene mutation. **Clin Genet** 50(5): 388-392.

Jeon, H., Meng, W., Takagi, J., Eck, M.J., Springer, T., and Stephen, C.B. (2001). Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. **Nat Struc Biol** 8(6): 499-504.

Kreisberg, R.A., Segrest, J.P., and Oram, J.F. (1992). **Plasma lipoproteins and coronary heart disease** (1st ed.). London: Backwell scientific.

Lehrman, M.A., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Russel, D.W., and Schneideer, W.J. (1985). Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and framshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. **Cell** 41(3): 735-743.

Leitersdorf, E., Van der Westhuyzen, D.R., Coetzee, G.A., and Hobbs, H.H. (1989). Two common low-density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. **J Clin Invest** 84(3): 954-961.

Leitersdorf, E., Tobin, E.J., Davignon, J., and Hobbs, H.H. (1990). Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. **J Clin Invest** 85(4): 1014-1023.

Lind, S., Eriksson, M., Rystedt, E., Wikilund, O., and Eggertsen, G. (1998). Low frequency of the common Norwegian and Finnish LDL-receptor mutations in Swedish patients with familial hypercholesterolemia. **J Intern Med** 244(1): 19-25.

Loubser, O., Marais, A.D., Kotze, M.J., Godenir, N., Thiart, R., and Scholtz, C.L. (1999). Founder mutations in the LDL receptor gene contribute significantly to the familial hypercholesterolemia phenotype in the indigenous South African population of mixed ancestry. **Clin Genet** 55(5): 340-345.

Makar, R.S.J., Lipsky, P.E., and Cuthbert, J.A. (1998). Sterol-independent, sterol response element-dependent, regulation of low density lipoprotein receptor gene expression. **J Lipid Res** 39(8): 1647-1653.

Marks, D.B., Marks, A.D., and Smith, C.M. (1996). **Basic medical biochemistry: a clinical approach**. Baltimore: Willams&Wilkins.

Montgomery, R., Conway, T.W., and Spector, A.A. (1996). **Biochemistry: a clinical approach** (6th ed.). Baltimore: Mosby.

Murray, K.R., Granner, D.K., Mayes, P.A., and Rodwell, V.W. (2000). **Harper's Biochemistry** (25th ed). Stamford: Appleton&Lange.

Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2000). **Lehninger Principles of Biochemistry** (3rd ed). New York: Worth Publishers.

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.

Soutar, A.K., Knight, B.L., and Patel, D.D. (1989). Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein-receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia that affects ligand binding and intracellular movement of receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86(11): 4166-4170.

Soutar, A.K. (1998). Update on low density lipoprotein receptor mutations. **Curr Opin Lipid** 9(2):141-147.

Villeges, L., Abifadel, M., Allard, D., Rabes, J.P., Thiart, R., and Kotze, M.J. (2002). The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. **Hum mutat** 20(2): 81-87.

Vuorio, A.F., Ojala, J.P., Sarna, S., Turtila, H., Tikkanen, M.J., and Kontula, K. (1995). Heterozygous familial hypercholesterolemia : the influence of the mutation type of the low-density lipoprotein receptor gene and PvuII polymorphism of the normal allele on serum lipid levels and response to lovastatin treatment. **J Intern Med** 237(1): 43-48.

http://ittm.dtam.moph.go.th/data_articles/2548

http://nobelprize.org/medicine/laureates/1985/brown-goldstein-lecture.pdf

http://www.blc.arizona.edu/INTERACTIVE/LDL3.95/life.html

http://www.chanteclair.com.au/scientific/__data/page/49/Lipo_Fig_06_Sequential_steps.gif

http://www..ipekrabi.ac.th/Elearning/sumon/lipid.doc

http://www.ucl.ac.uk/fh/mutab.html.

http://www.umd.necker.fr/LDLR/gene.htm