

ANALISIS GEN RESEPTOR LIPOPROTEIN BERKETUMPATAN RENDAH (*LDLR*) DALAM KALANGAN PESAKIT HIPERKOLESTEROLEMIA FAMILIAL (FH) DI MALAYSIA: KAJIAN KES

(Analysis of The Low-Density Lipoprotein Receptor (*LDLR*) Gene Among Family
Hypercholesterolemia (FH) Patients in Malaysia: A Case Study)

Zam Zureena Mohd Rani¹, Muhammad-Redha Abdullah-Zawawi¹, Norlaila Mustafa², Izzatul 'Alia Baharuddin³, Siti Aishah Sulaiman¹, Syahidatun Najwa Abu Zahid¹, Yusnita Yakob⁴, Rahman Jamal¹, Azrul Azlan Hamzah⁵, Nor Azian Abdul Murad^{1*} dan Izzatul Aliaa Badaruddin

¹ Institut Biologi Molekul Perubatan UKM (UMBI), Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), 56000 Kuala Lumpur, Malaysia;

² Jabatan Perubatan, ³ Jabatan Patologi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), 56000 Kuala Lumpur, Malaysia;

⁴ Unit Molekular Diagnostik, Institut Penyelidikan Perubatan (IMR), 50588 Kuala Lumpur, Malaysia;

⁵ Insitut Kejuteraan Mikro dan Nanoelektronik (IMEN), Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), 43600 Bangi, Selangor, Malaysia.

*Pengarang koresponden: nor_azian@hctm.ukm.edu.my

Abstrak

Pengenalan: Hiperkolesterolemia Familial (FH) ialah gangguan metabolisme lipoprotein yang menyebabkan peningkatan paras lipoprotein berketumpatan rendah (LDL-C) sejak lahir. Penyakit ini diwarisi melalui mutasi pada gen LDLR, APOB, PCSK9 dan LDLRAP1. Oleh itu, ujian genetik memainkan peranan penting dalam pengesanan diagnosis, penentuan variasi mutasi genetik dan pelaksanaan saringan kaskad atau keluarga. Diagnosis awal FH membolehkan intervensi yang lebih berkesan bagi pengawalan paras LDL-C serta pencegahan penyakit kardiovaskular. Kaedah: Kajian ini melibatkan analisis genetik gen LDLR ke atas tiga individu yang didiagnosis dengan hiperkolesterolemia dan dua daripadanya mengalami penyakit jantung pada usia muda. DNA daripada sampel darah diekstrak menggunakan kaedah isolasi garam dan analisis genetik dijalankan melalui reaksi rantaian polimerase (PCR) bagi mengamplifikasi ekson gen LDLR. Penjujukan DNA dilakukan menggunakan kaedah penjujukan Sanger manakala analisis bioinformatik dijalankan menggunakan perisian SnapGene Viewer dan SeqScape v2.0. Selain itu, analisis in silico digunakan untuk meramal fungsi varian sinonim serta pemodelan struktur protein LDLR bagi mengenal pasti potensi perubahan akibat mutasi. Keputusan: Pesakit pertama menunjukkan tiga varian sinonim (c.1413A>G, c.1617C>T dan c..2232A>G) pada gen LDLR. Pesakit kedua menunjukkan varian c.1413A>G dan c.2253A>G manakala pesakit ketiga mempunyai mutasi penghapusan c.660del' to 'p.(Asp221fs)'. Kesimpulan: Analisis genetik dalam kalangan pesakit FH adalah penting bagi diagnosis peringkat awal dan rawatan dapat diberikan bagi mengurangkan risiko penyakit kardiovaskular.

Kata kunci: Hiperkolesterolemia Familial (FH); penyakit jantung; gen LDLR; ujian kolesterol; ujian genetik; penjujukan Sanger DNA

Abstract

Introduction: Familial Hypercholesterolemia (FH) is a lipoprotein metabolism disorder that causes elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels from birth. This condition is inherited through LDLR, APOB, PCSK9, and LDLRAP1 gene mutations. Therefore, genetic testing is crucial in confirming the diagnosis, identifying genetic mutation variations, and implementing cascade screening. Early diagnosis of FH enables more effective interventions for controlling LDL-C levels and preventing cardiovascular disease. Methods: This study involved genetic analysis of the LDLR gene in three individuals diagnosed with hypercholesterolemia, two of whom developed early-onset heart disease. DNA from blood samples was extracted using salt isolation, and genetic analysis was performed through polymerase chain reaction (PCR) to amplify LDLR exons. DNA sequencing was conducted using the Sanger sequencing method, while bioinformatics analysis was performed using SnapGene Viewer and SeqScape v2.0. Additionally, in silico analysis was used to predict the function of synonymous variants, and LDLR protein structure modelling was conducted to identify potential structural changes caused by mutations. Results: The first patient had three synonymous LDLR variants (c.1413A>G, c.1617C>T dan c..2232A>G). The second had c.1413A>G dan c.2253A>G variants, while the third had a deletion mutation. Conclusion: Genetic analysis in patients with FH is essential for early diagnosis and intervention, ultimately reducing the risk of cardiovascular disease.

Keywords: Familial hypercholesterolemia (FH); heart disease; LDLR gene; cholesterol test; genetic testing; DNA Sanger sequencing

PENGENALAN

Hiperkolesterolemia Familial (FH) ialah gangguan genetik yang menyebabkan paras lipoprotein berketumpatan rendah (LDL-C) tinggi sejak lahir (Brandts & Ray, 2021). Jika tidak dirawat, peningkatan paras LDL-C ini akan meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular yang boleh membawa kepada kematian pramatang (Wiegman et al. 2015). LDL-C merupakan lipid utama dalam peredaran darah yang boleh mendap pada dinding arteri seterusnya berpotensi menyumbang kepada pembentukan plak (Hevonoja et al. 2000). Di peringkat global, dianggarkan 20 juta individu menghidap FH dengan lebih 90% kes tidak menerima rawatan (Zubieliene et al. 2022). Sebanyak 330,000 individu Malaysia dianggarkan menghidap FH (Chua et al. 2021) dengan 45.5% pesakit FH disahkan mengalami penyakit kardiovaskular (Nazli et al., 2022). Adalah dianggarkan sebanyak 25.6% pesakit penyakit kardiovaskular yang dimasukkan ke hospital berusia di bawah 50 tahun (Ahmad, 2024). Oleh itu, pengesanan awal FH diikuti dengan intervensi terapi penurunan paras LDL-C yang berkesan dapat mencegah penyakit kardiovaskular dan seterusnya mengurangkan kadar kematian pramatang dalam kalangan pesakit FH (Packard et al. 2021).

Mutasi autosomal dominan pada gen reseptor LDL (*LDLR*) merupakan punca utama FH diikuti dengan mutasi pada gen apolipoprotein B (*APOB*) (Iacocca et al. 2018). Mutasi pada gen proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (*PCSK9*) menyumbang kurang daripada 5% kes FH (Mabuchi et al. 2014) manakala mutasi autosomal resesif pada gen protein penyesuai reseptor lipoprotein berkepadatan rendah 1 (*LDLRAP1*) dan apolipoprotein E (*APOE*) jarang dilaporkan (Berberich & Hegele, 2019; Nordestgaard et al. 2013). Gen *LDLR* adalah reseptor glikoprotein yang terdapat pada membran sel yang memainkan peranan penting dalam pengawalan metabolisme kolesterol dengan memudahkan pengambilan partikel LDL dari aliran darah ke dalam hati untuk dikitar semula atau dipecahkan (Goldstein & Brown, 1974). Mutasi pada gen *LDLR* menyebabkan disfungsi atau pengurangan ekspresi reseptor LDL yang mengganggu pengambilan kolesterol oleh sel hati. Keadaan ini membawa kepada peningkatan paras LDL-C dalam darah sekali gus meningkatkan risiko hiperkolesterolemia dan penyakit kardiovaskular (Goldstein & Brown, 1973; Goldstein & Brown, 1974). Individu dengan mutasi homozigot *LDLR* mengalami paras LDL-C yang sangat tinggi (>13 mmol/L) sejak lahir yang boleh membawa kepada pemendapan kolesterol di dalam salur darah pada jantung, seterusnya meningkatkan risiko penyakit jantung. Sebaliknya, pembawa mutasi heterozigot *LDLR* mempunyai paras LDL-C antara 5–13 mmol/L dengan risiko penyakit arteri koronari meningkat 2 hingga 3 kali

ganda bergantung pada faktor genetik, gaya hidup dan rawatan yang diterima (Goldstein & Brown, 1973).

Pesakit FH dapat dikenal pasti melalui diagnosis klinikal, sejarah peribadi dan keluarga serta pemeriksaan fizikal manakala ujian genetik digunakan untuk mengesahkan diagnosis (Migliara et al. 2017; Rallidis et al. 2020). Tiga kriteria diagnostik utama yang digunakan secara meluas di peringkat global ialah *Simon Broome* (SB) (Scientific Steering Committee 1999), *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) (Gidding et al. 2022) dan *Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths* (MEDPED) (Kostner, 1994). Namun, masih tiada kriteria diagnostik standard bagi mengenal pasti FH di seluruh dunia (Rallidis et al. 2020). FH menyebabkan gangguan autosomal dominan dengan individu heterozigot FH mempunyai 50% kebarangkalian mewariskan gen mutasi kepada anak manakala individu homozigot FH akan mewariskan satu salinan gen mutasi (McGowan et al. 2019). Oleh itu, saringan kaskad iaitu ujian genetik ke atas ahli keluarga pesakit yang telah disahkan menghidap FH dikenal pasti sebagai strategi saringan yang sistematik dan berkesan dalam pengesanan awal FH (Knowles et al. 2017; Migliara et al. 2017; Vrablik et al. 2020).

Ujian genetik dapat dijalankan dengan menggunakan pelbagai kaedah bagi mengenal pasti mutasi pada jujukan DNA (Futema et al. 2021). Teknologi *Next-Generation Sequencing* (NGS) boleh digunakan untuk penjujukan seluruh genom atau panel gen yang berkaitan hiperkolesterolemia serta metabolisme lipid. Walaubagaimanapun, kaedah NGS ini lebih kompleks, mahal dan menghasilkan data varian yang memerlukan analisis bioinformatik mendalam (Qin, 2019). Oleh itu, penjujukan Sanger digunakan kerana ketepatan tinggi dan kebolehpercayaannya dalam mengesan mutasi (Bruikman et al., 2017). Kajian ini dijalankan pada tiga individu yang didiagnosis dengan hiperkolesterolemia dan dua daripadanya mengalami penyakit jantung pada usia muda. Oleh itu, kajian ini hanya memfokuskan diagnosis FH bagi mengenalpasti variasi *LDLR* dengan menggunakan kaedah penjujukan Sanger.

METODOLOGI

Persampelan dan Pengambilan Darah

Peserta kajian ini terdiri daripada tiga individu ($n=3$; 1 perempuan, 2 lelaki) daripada keluarga berbeza yang didiagnosis dengan berkemungkinan FH (*Possible FH*) dan FH yang pasti (*Definite FH*). Pemilihan saiz sampel ini adalah disebabkan oleh faktor kos kajian yang hanya memungkinkan penglibatan tiga pesakit. Kriteria pemilihan pesakit adalah: (i) diagnosis FH yang disahkan mengikut

kriteria SB, (ii) berusia bawah 50 tahun, (iii) tidak mempunyai penyakit metabolik lain selain penyakit jantung dan (iv) telah menerima rawatan berkaitan FH. Kriteria SB ditunjukkan seperti dalam Rajah 1. Semua pesakit telah menandatangani persetujuan bertulis dan protokol kajian ini mengikuti prinsip etika Deklarasi Helsinki 1975 serta telah diluluskan oleh Lembaga Etika dan Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (Nombor Rujukan: UKM PPI/111/8/JEP-2020-142). Sebanyak 3 ml darah periferai diambil daripada setiap pesakit dan ujian genetik dilakukan menggunakan kaedah penjujukan Sanger.

Kes 1

Pesakit pertama merupakan seorang lelaki Melayu Malaysia berusia 43 tahun telah berkahwin dan mempunyai tiga orang anak lelaki. Pada usia 36 tahun, pesakit didiagnosis dengan penyakit mikrovaskular jantung di Institut Jantung Negara (IJN). Pesakit memulakan rawatan atorvastatin 40 mg pada tahun 2016 dan meneruskannya sehingga kini. Selepas rawatan, paras kolesterol keseluruhan (TC) dan LDL-C pesakit menurun kepada 3.5 mmol/L dan 1.8 mmol/L.

Kes 2

Pesakit kedua merupakan seorang lelaki Melayu Malaysia berusia 40 tahun yang belum berkahwin. Pada tahun 2021, ketika berusia 37 tahun pesakit didiagnosis dengan penyakit kardiovaskular di IJN. Pada tahun 2023, pesakit didapati mempunyai paras TC dan LDL-C yang tinggi iaitu 7.8 mmol/L dan 5.7 mmol/L dan memulakan rawatan dengan atorvastatin 20 mg pada tahun 2024.

Kes 3

Pesakit ketiga adalah seorang wanita Melayu Malaysia berusia 46 tahun yang telah berkahwin dan mempunyai empat orang anak terdiri daripada dua lelaki dan dua perempuan. Pesakit dikenal pasti mempunyai paras TC dan LDL-C yang tinggi pada usia muda iaitu 23 tahun. Namun demikian, nilai paras awal tidak dapat diperolehi kerana rekod pesakit telah dilupakan. Walaubagaimanapun, melalui temubual bersama pesakit paras TC dan LDL-C adalah melebihi 7.5 mmol/L dan 4.9 mmol/L (memenuhi kriteria FH seperti pada sistem SB). Pesakit mula mengambil simvastatin pada usia 23 tahun namun menghentikannya pada usia 26 tahun kerana kebimbangan terhadap kesan sampingan terhadap kesuburan. Pesakit memulakan semula rawatan simvastatin pada usia 37 tahun ketika bacaan paras kolesterol 10 mmol/L. Pada tahun 2017, pesakit menerima rawatan atorvastatin 40mg sehingga kini. Pemeriksaan fizikal pada tahun

2020 menunjukkan tanda-tanda FH iaitu arkus kornea tahap 4 dan xanthoma tahap 2. Gejala ini menunjukkan kehadiran kolesterol yang tinggi dan pengumpulannya di bahagian tertentu tubuh seperti kornea mata dan tendon. Pesakit juga mempunyai sejarah keluarga dengan hiperkolesterolemia iaitu pada ibunya.

Diagnosis FH

Diagnosis pesakit FH dalam kajian ini ditentukan menggunakan sistem SB dari United Kingdom. Kriteria SB merangkumi ciri-ciri klinikal, sejarah keluarga, diagnosis molekul atau genetik serta tahap kolesterol yang kemudian diklasifikasikan sebagai FH yang pasti atau kemungkinan seperti ditunjukkan dalam Rajah 1.

KRITERIA DIAGNOSTIK SIMON BROOME BAGI FH	
Mata	Kriteria
	<i>Total cholesterol</i> > 290mg/dL (7.5 mmol/L) or LDL-C > 190mg/dL (4.9mmol/L) pada dewasa
1	<i>Total cholesterol</i> > 290mg/dL (6.7 mmol/L) or LDL-C > 155mg/dL (4.0mmol/L) pada kanak-kanak
2	<i>Tendon xanthomas</i> pada pesakit ATAU keluarga peringkat pertama dan kedua
3	<i>Analisis molekul mutasi pada LDLR, APOB-100 dan PCSK9</i>
4	Sejarah keluarga dengan infarksi miokardium sebelum berumur 50 tahun pada keluarga peringkat kedua dan sebelum 60 tahun pada keluarga peringkat pertama.
	Sejarah keluarga dengan kolesterol jumlah (<i>total cholesterol</i>) > 250 mg/dL (7.5 mmol/L) pada ahli keluarga dewasa sama ada peringkat pertama atau kedua
5	Sejarah keluarga dengan kolesterol jumlah (<i>total cholesterol</i>) > 260 mg/dL (6.7 mmol/L) pada kanak-kanak, abang atau kakak berumur 16 tahun atau lebih muda.
DIAGNOSIS	
Definite FH= 1+2 or 3	
Possible FH= 1+4 or 5	

Rajah 1. Kriteria diagnostik Simon Broome (SB) bagi mendiagnosis FH

GENOTIPING

Pengekstrakan DNA

Pengekstrakan DNA dari sampel tiub darah EDTA dilakukan dengan menggunakan kaedah konvensional iaitu teknik pengekstrakan garam. Kepekatan dan ketulenan sampel DNA diukur dengan menggunakan Spektrofotometer NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat). DNA yang tulen mempunyai nisbah A260/A280 di antara 1.8 - 2.2. Kepekatan DNA yang diperlukan untuk Penjujukan Sanger adalah sebanyak 50 ng/ul.

Reaksi rantaian polimerase (PCR) dan Penjujukan Sanger

Amplifikasi kesemua ekson gen *LDLR* dilakukan melalui kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR). Pencetus khusus bagi amplifikasi gen *LDLR* seperti yang dinyatakan dalam Jadual 1. Prosedur ini menggunakan 50 ng sampel DNA bersama campuran Master HotStarTaq (Qiagen, Jerman)

dan reaksi reagen PCR dan syarat suhu termokitar PCR adalah seperti yang dinyatakan dalam Jadual 2. Produk PCR yang telah diamplifikasi dianalisis menggunakan elektroforesis gel agaros. Sampel yang menghasilkan produk PCR bersaiz tepat seperti yang dinyatakan dalam Jadual 1 seterusnya dilakukan penjujukan dengan menggunakan penjujukan DNA Sanger. Produk PCR kemudiannya ditulen dengan menggunakan kit Penulenan PCR QIAquick (Qiagen, Jerman) mengikut saranan

pembekal sebelum menjalani penjujukan Sanger dengan kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystem, USA) menggunakan alat penjujukan 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA). Turutan DNA dianalisis dengan menggunakan perisian *SnapGene Viewer* dan perisian *SeqScape v2.0* (Thermo Fisher Scientific) dengan merujuk kepada Nucleotida ID: NG009060.

Jadual 1. Turutan pencetus bagi setiap ekson pada gen *LDLR*

Gen <i>LDLR</i>	Pencetus	Turutan DNA Pencetus 5' - 3'	Saiz produk (bp)
Ekson 1	pencetus ke hadapan	CCCAAATACAACAAATCAAGTCG	650
	pencetus ke belakang	AGATGCGGTCCCTCACCT	
Ekson 2	pencetus ke hadapan	TTAGTTGGCAGGAAATAGACA	590
	pencetus ke belakang	AACAAGATAGAGGTGGTGGC	
Ekson 3	pencetus ke hadapan	GCCTCAGTGGGTCTTTCCT	370
	pencetus ke belakang	TTGTAATGCCTCCTGGTCAA	
Ekson 4	pencetus ke hadapan	GTTGGGAGACTTCACACGGTGATGG	480
	pencetus ke belakang	GGGGGAGCCAGGGACAGGTGATAG	
Ekson 5	pencetus ke hadapan	GCCTCAGTGGGTCTTTCCT	370
	pencetus ke belakang	TTGTAATGCCTCCTGGTCAA	
Ekson 6	pencetus ke hadapan	TGAATCCATTGCGATGCGTTCT	346
	pencetus ke belakang	CCTTTGCACAGGGTGGGC	
Ekson 7	pencetus ke hadapan	AGATCGTGCCATTACACTCCA	480
	pencetus ke belakang	GCAAGCCGCCTGCACCGAGACTCAC	
Ekson 8	pencetus ke hadapan	CATTGGGGAAGAGCCTCCCC	200
	pencetus ke belakang	GCCTGCAAGGGGTGAGGCCG	
Ekson 9-10	pencetus ke hadapan	TCCATCGACGGGTCCCCTCTGACCC	590
	pencetus ke belakang	AGCCCTCAGCGTCGTGGATACGCAC	
Ekson 11	pencetus ke hadapan	AAAACCCAAACAAGCCACAT	370
	pencetus ke belakang	GGGAAACCTTCAGGGAGCAG	
Ekson 12	pencetus ke hadapan	GACCCTCTGGGACTGGCATCA	370
	pencetus ke belakang	CCTCCAGCCTGGGAAACGAG	
Ekson 13-14	pencetus ke hadapan	CCCAGTGTTTAACGGGATTT	590
	pencetus ke belakang	TACCCATTGACAGATGAGCAG	
Ekson 15	pencetus ke hadapan	GAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACT	200
	pencetus ke belakang	GTGTGGTGGCGGGCCAGTCTTT	
Ekson 16	pencetus ke hadapan	CCTTCCTTTAGACCTGGGCCT	180
	pencetus ke belakang	CATAGCGGGAGGCTGTGACC	
Ekson 17	pencetus ke hadapan	TGGCTCAACCTCGGCTCACT	680
	pencetus ke belakang	AGCGCACAGAAGCATTACCTA	
Ekson 18-1	pencetus ke hadapan	CAGGAGGTGAGAAGTAGGTGGC	761
	pencetus ke belakang	AAGTGGCATCATTTGGTGAATGAG	
Ekson 18-2	pencetus ke hadapan	TGATCTGGCTGAATCCGTGG	877
	pencetus ke belakang	AGGCCATGGGCTGCTGAT	
Ekson 18-3	pencetus ke hadapan	TCGTCTTTATGTCCGCCAC	983
	pencetus ke belakang	GTCTCTCCGACATCAGTGC	
Ekson 18-4	pencetus ke hadapan	TCGTTTGACGGGACTTCAGG	370
	pencetus ke belakang	TACACAGGGCCCCGAGAATA	
Ekson 18-5	pencetus ke hadapan	TGTTTGCACTTTGTATATTGGTTGA	385
	pencetus ke belakang	GCGCGCAACAGAAGA	

Jadual 2. Reaksi Reagen PCR dan Kitaran Suhu Bagi Kitar PCR

PCR telah dijalankan dalam jumlah reaksi sebanyak 25 µl yang mengandungi:

Reagen	Kepekatan akhir	1 x tindak balas (µl)
Pencetus ke hadapan (10 µM)	0.4 µM	1.0
Pencetus ke belakang (10 µM)	0.4 µM	1.0
Templat DNA (50 ng/ µl)	50 ng/ µl	1.0
Hot Star Taq Master mix – Qiagen (5X)	1X	12.5
dH ₂ O	-	9.5
Jumlah		25

Protokol kitaran PCR yang digunakan adalah seperti berikut:

Tindak balas	Suhu (°C)	Masa
Penyahhasilan awal	95	15 minit
Penyahhasilan	95	1 minit
Penyepuhan	60	1 minit
Pemanjangan	72	1 minit
Pemanjangan akhir	72	10 minit
Suhu akhir	4	∞

} 35 kitar

Analisis in siliko bagi meramal fungsi varian sinonimus

Bagi kajian kes 1 dan kes 2, carian skor kepatogenesis transkrip telah dijalankan menggunakan skor TraP (<https://trap-score.org/>) untuk menilai keupayaan varian nukleotida tunggal (SNP) sinonimus dalam memudaratkan transkrip akhir seterusnya menyebabkan penyakit (Gelfman et al. 2017). Maklumat kedudukan setiap varian *LDLR* telah diperolehi daripada pangkalan data NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Benson et al. 2013) dan diikuti dengan carian kepatogenesis menggunakan skor TraP. Skor TraP adalah di antara 0 hingga 1 yang meramalkan peluang untuk sesuatu varian menjadi patogenik. Semakin tinggi skornya semakin besar kerosakan yang diramalkan akibat varian tersebut. Bagi ambang peratusan, skor yang melebihi 90% (0.221) dianggap mungkin memudarat manakala skor di atas 97.5% (0.416) dianggap mungkin sangat memudaratkan (Gelfman et al. 2017).

Pemodelan struktur LDLR protein

Bagi kajian kes 3, pemodelan struktur untuk mutasi penghapusan 'c.660del' pada gen *LDLR* telah dijalankan bagi mengenal pasti kesannya terhadap pembentukan protein *LDLR*. Jujukan ekson 4 gen *LDLR* yang dikenali sebagai jujukan jenis liar

(*wild-type*) telah diperolehi daripada pangkalan data *European Nucleotide Archive (ENA)* (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/L00338>) dengan identiti jujukan L00338.1 (Burgin et al. 2023). Oleh itu, nukleotida C iaitu sitosin pada kedudukan ke-606 telah dibuang secara manual daripada jujukan asal (*wild-type*) untuk menghasilkan jujukan mutasi penghapusan c.660del. Jujukan nukleotida *LDLR* kemudiannya ditranslasikan kepada jujukan protein menggunakan perisian ExPasy Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) (Gasteiger et al. 2003). Struktur protein bagi kedua-dua *LDLR WT* dan mutan telah dimodelkan menggunakan SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) (Schwede et al. 2003). SWISS-MODEL ialah perisian yang menggunakan algoritma pembelajaran mesin yang diselia (SVM) yang menggabungkan pemuliharaan antara muka, pengelompokan struktur dan ciri-ciri tambahan templat untuk menghasilkan skor Anggaran Kualiti Struktur Kuarternari (QSQE) dan Anggaran Kualiti Model Sejagat (GMQE) bagi ramalan struktur protein (Schwede et al. 2003). Bagi mengkaji kesan mutasi penghapusan pada domain protein *LDLR*, anotasi domain pada jujukan protein dilakukan menggunakan pangkalan data InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Paysan-Lafosse et al. 2023). Akhir sekali, struktur protein WT dan mutan *LDLR* divisualisasikan menggunakan perisian UCSF Chimera untuk mengenalpasti perubahan struktur protein yang berlaku akibat daripada mutasi penghapusan c.660del pada gen *LDLR* (Chen et al. 2015).

HASIL KAJIAN

Kajian kes 1

Keputusan penjujukan Sanger DNA pesakit kes 1 dan anak-anaknya ditunjukkan dalam Rajah 2. Analisis mengesahkan kehadiran tiga varian sinonimus dalam gen *LDLR* pesakit iaitu c.1413A>G pada ekson 10, c.1617C>T pada ekson 11 dan c.2232A>G pada ekson 15 yang dikaitkan dengan FH. Dalam kalangan anak pesakit, anak pertama dan anak kedua membawa varian c.2232A>G pada ekson 15 manakala anak ketiga memiliki dua varian sinonimus iaitu c.A1413G pada ekson 10 dan c.2232A>G pada ekson 15. Isteri pesakit menunjukkan paras TC dan LDL-C yang normal dan tiada sejarah keluarga penyakit jantung serta menunjukkan ketiadaan variasi pada gen *LDLR*. Penemuan ini menunjukkan pola pewarisan varian sinonim daripada pesakit kepada anak-anak.

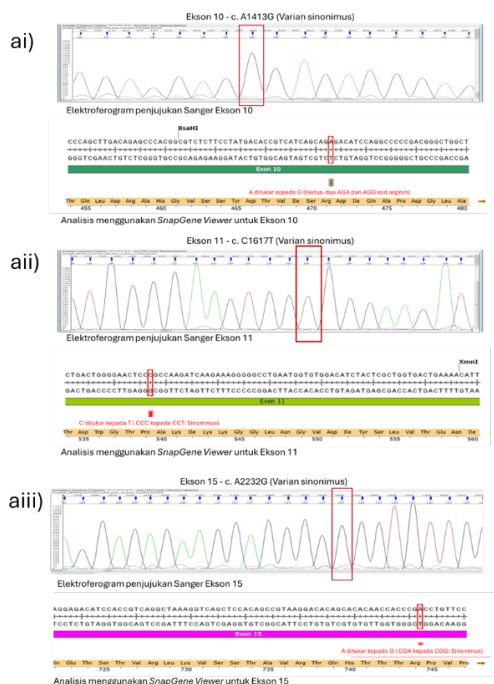
Analisis kepatogenesis menunjukkan bahawa varian sinonimus c.1413A>G (ekson 10) dan c.1617C>T (ekson 11) masing-masing mempunyai skor TraP sebanyak 0.324 dan 0.348 menunjukkan potensi sebagai varian memudaratkan. Manakala,

c.2232A>G (ekson 15) diramal sebagai benign dengan skor TraP 0.088. Berdasarkan pengkelasan Franklin ACMG, c.A1413>G dikategorikan sebagai varian mungkin patogenik manakala c.1617C>T dan c.2232A>G diklasifikasikan sebagai varian tidak diketahui signifikannya (VUS). Analisis impak fungsi menggunakan MutationTaster, DANN dan MetaLR menunjukkan bahawa c.1413A>G adalah mutasi mudarat dengan skor masing-masing 1.0, 0.99 dan 0.77. Selain itu, analisis MVP, FATHMM-MKL dan M-CAP turut menyokong kepatogenan varian ini dengan skor 0.998, 0.972 dan 0.543. Walaupun c.1617C>T diklasifikasikan sebagai VUS oleh Franklin ACMG ia diramal sebagai mudarat oleh MutationTaster (1.00), DANN (0.96), MetaLR (0.61), MVP (0.99) dan M-CAP (0.37). Manakala c.2232A>G walaupun dianggap VUS turut diramal sebagai mudarat berdasarkan Revel (0.67), MutationTaster (1.00), DANN (0.99), MetaLR (0.78), MVP (0.99) dan M-CAP (0.36).

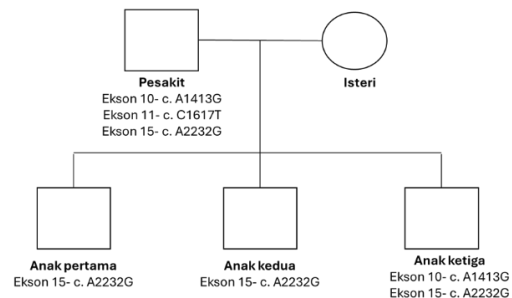
Varian sinonim yang memudaratkan (c.1617C>T, c.2232A>G, c.1413A>G) dikesan

pada pesakit berpotensi menjejaskan fungsi *LDLR* seterusnya mempengaruhi tahap LDL-C dan meningkatkan risiko hiperkolesterolemia serta penyakit kardiovaskular pada usia muda. Oleh itu, pesakit diberikan atorvastatin 40 mg iaitu perencat *HMG-CoA reductase* yang berfungsi mengurangkan sintesis kolesterol hepatic dan meningkatkan ekspresi reseptor *LDLR* bagi menyingkirkan LDL-C dari darah. Rawatan ini menunjukkan keberkesanan yang signifikan dengan penurunan paras LDL-C pesakit secara ketara.

Varian sinonim yang sama pada pesakit turut dikesan pada ketiga-tiga anak. Oleh itu, ujian profil lipid secara berkala adalah perlu bagi anak-anak pesakit bagi mengenalpasti hiperkolesterolemia dan rawatan awal dapat dimulakan. Selain itu, saringan kaskad dalam kalangan ibu bapa dan adik-beradik pesakit perlu dilakukan untuk menentukan corak pewarisan varian sinonim serta menilai risiko genetik FH.



b) Pokok keluarga pesakit dengan varian sinonim yang dikenalpasti



c) Jadual varian sinonim di dalam populasi lain di dunia

Ekson	Perubahan nukleotida / asid amino		Jenis mutasi	Kejadian dalam populasi lain	Dilaporkan pertama kali
Ekson 10	c. A1413G	p. (Arg471Arg)	Sinonimus	Afrika Selatan, Jepun, Rusia, Maghribi dan lain-lain lagi	1991, Populasi Afrika Selatan (Warnich et al., 1991)
Ekson 11	c. C1617T	p. (Pro539Pro)	Sinonimus	Maghribi, China, Rusia dan lain-lain lagi	1992, Populasi China (Wu et al, 2001)
Ekson 15	c. A2232G	p. (Arg744Arg)	Sinonimus	Jerman, China, Jepun dan lain-lain lagi	1993, Populasi Jepun (Yamakawa, 2013)

Rajah 2. Keputusan penjujukan DNA pesakit pertama dan anak-anaknya menggunakan kaedah penjujukan Sanger. ai-iii) Elektroferogram menunjukkan perubahan nukleotida c.1413A>G pada ekson 10, c.1617C>T pada ekson 11 dan c.2232A>G pada ekson 15 gen *LDLR* iaitu varian sinonim yang tidak menyebabkan perubahan asid amino pada jujukan DNA. b) Pokok keluarga pesakit (*Family tree*) dan varian sinonim yang dikenalpasti pada pesakit dan anak-anak. c) Jadual penemuan varian sinonim yang sama dan dikenalpasti di dalam populasi lain di dunia.

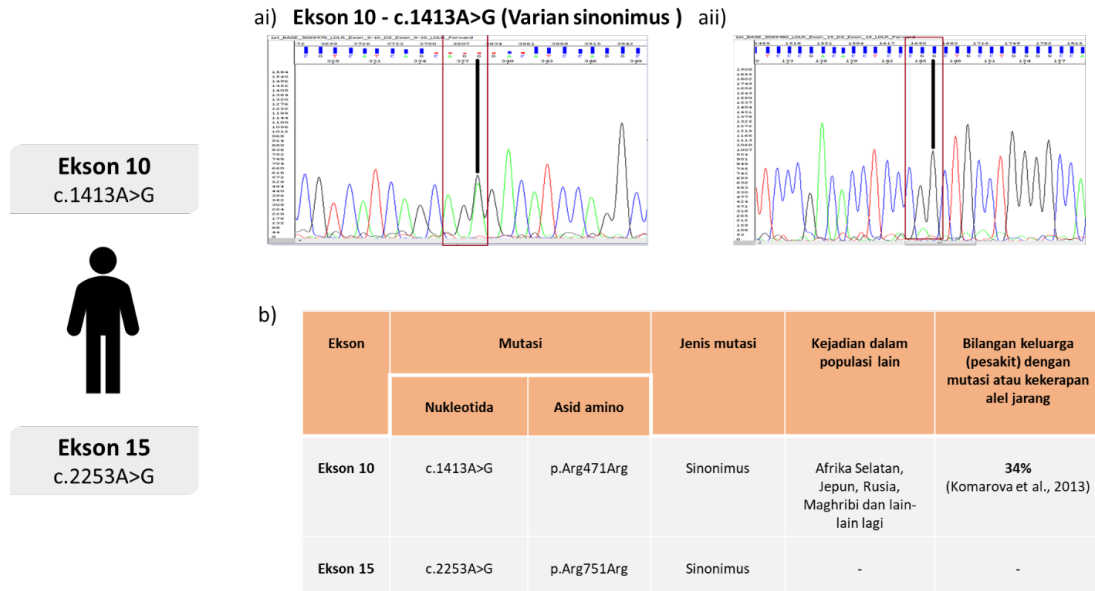
Kajian kes 2

Keputusan penjujukan Sanger DNA pesakit kajian kes 2 ditunjukkan dalam Rajah 3. Analisis mendapati bahawa pesakit membawa varian sinonim c.1413A>G yang diramal sebagai memudaratkan berdasarkan penilaian bioinformatik. Selain itu,

varian sinonim kedua yang dikenalpasti ialah c.2253A>G pada ekson 15 berdasarkan analisis TraP dan analisis *in siliko* diklasifikasikan sebagai benign (tidak memudaratkan) namun laporan klinikal daripada *Academisch Medisch Centrum* dalam ClinVar menyatakan bahawa varian sinonim c.2253A>G ini dikategorikan sebagai patogenik.

Pesakit dengan varian sinonim memudaratkan c.1413A>G dan varian patogenik c.2253A>G berkemungkinan mengalami disfungsi gen *LDLR* yang menyebabkan peningkatan paras LDL-C dan menjadi faktor utama perkembangan penyakit kardiovaskular pada usia muda. Oleh itu, pesakit

diberikan atorvastatin 20 mg yang menunjukkan penurunan paras LDL-C selepas rawatan. Namun, kajian lanjut diperlukan untuk menentukan sama ada pesakit dengan varian sinonim ini memerlukan pemantauan berkala bagi menilai keberkesanan rawatan dan risiko jangka panjang.

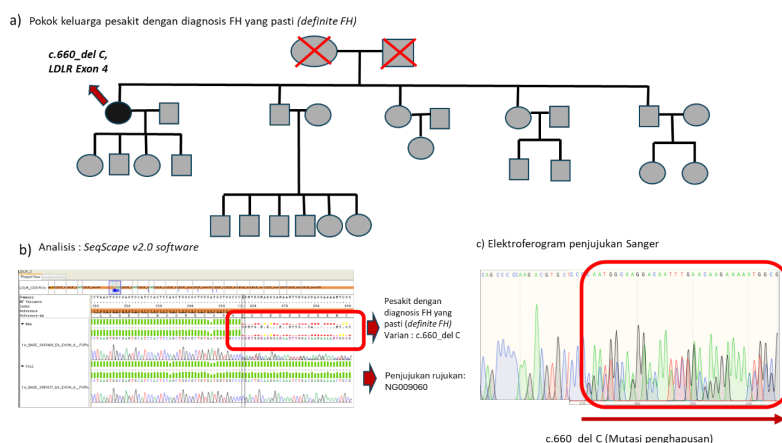


Rajah 3. Keputusan penjujukan DNA pesakit kedua menggunakan kaedah penjujukan Sanger. ai-ii) Elektroferogram menunjukkan perubahan nukleotida c.1413A>G pada ekson 10 dan c.2253A>G pada ekson 15 gen *LDLR* iaitu varian sinonimis yang tidak menyebabkan perubahan asid amino pada jujukan DNA. b) Jadual penemuan varian sinonimis yang sama dan dikenalpasti di dalam populasi lain di dunia.

Kajian kes 3

Analisis penjujukan Sanger DNA bagi pesakit kes 3 (Rajah 3) mengesahkan mutasi c.660del iaitu mutasi penghapusan dalam gen *LDLR* yang diklasifikasikan sebagai patogenik. Mutasi ini menyebabkan pesakit mengalami paras LDL-C yang tinggi sejak usia

muda dan mempunyai arkus kornea tahap 4 serta xanthoma tahap 2. Selain itu, pesakit mempunyai sejarah keluarga dengan hiperkolesterolemia dan penyakit kardiovaskular yang mengukuhkan diagnosis FH berdasarkan faktor genetik dan klinikal.

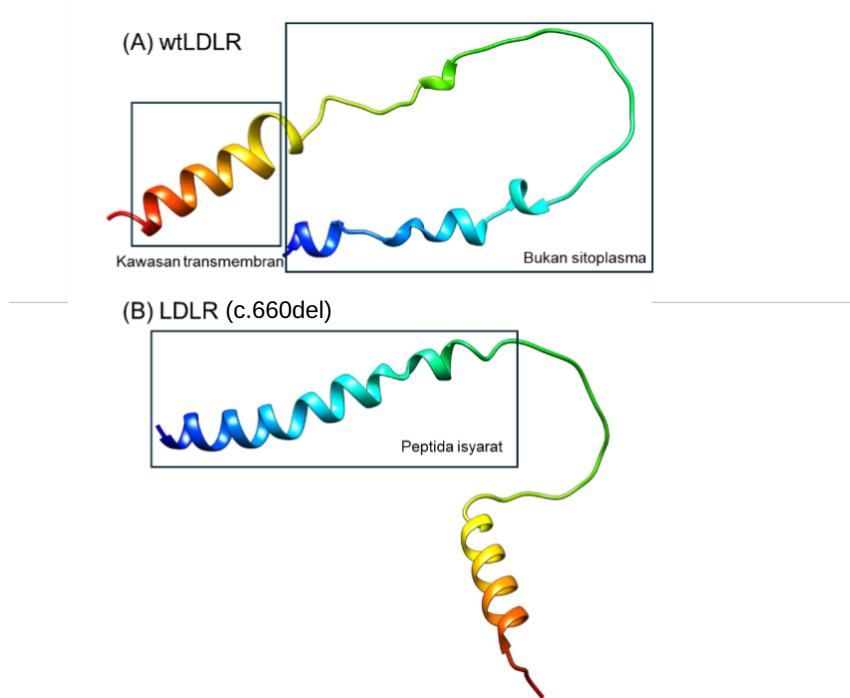


RAJAH 4: Pokok keluarga pesakit ketiga dan keputusan penjujukan DNA menggunakan kaedah penjujukan Sanger. a) Pokok keluarga pesakit dengan diagnosis FH yang pasti (*definite FH*). Pesakit mempunyai mutasi c.660del pada gen *LDLR* yang menyebabkan mutasi penghapusan yang seterusnya mengganggu pembentukan protein *LDLR*. Pesakit mempunyai 2 adik lelaki dan 2 adik Perempuan dan 11 orang anak saudara. b) Analisis data penjujukan Sanger menggunakan perisian SeqScape v2.0 menunjukkan mutasi c.660del. c) Elektroferogram menunjukkan kehadiran mutasi c.660del sekaligus mengesahkan analisis mutasi menggunakan perisian SeqScape v2.0

Struktur tiga dimensi (3D) LDLR jenis liar (wtLDLR) dan LDLR mutan (c.660del) telah diperoleh melalui pemodelan protein untuk memahami heterogeniti struktur yang disebabkan oleh kehilangan nukleotida sitosin (C) pada kedudukan 660. Model untuk jujukan wtLDLR (templat: G7Q234.1.A) mempunyai identiti jujukan 73.13% dan GMQE 0.07 manakala jujukan LDLR mutan (templat: A0A7N9D7V8.1.A) menunjukkan identiti jujukan sebanyak 71.01% dan GMQE 0.07. Superimposisi model LDLR WT dan mutan menunjukkan perbezaan struktur yang ketara mencadangkan bahawa perubahan fungsi LDLR mungkin disebabkan oleh mutasi c.660del (Rajah 5). Hipotesis ini disokong oleh analisis pencarian domain protein yang mana domain bukan sitoplasma dan kawasan transmembran dikenalpasti dalam LDLR WT namun tidak dikenalpasti dalam LDLR mutan c.660del. Analisis ini mencadangkan bahawa mutasi c.660del telah menyebabkan perubahan

struktur protein LDLR yang boleh mengakibatkan perubahan konformasi dan seterusnya menjejaskan fungsinya.

Mutasi patogenik c.660del C menjejaskan fungsi LDLR secara signifikan serta mengurangkan keberkesanan penyingkiran LDL-C dari darah dan menyumbang kepada paras LDL-C yang tinggi. Oleh itu, rawatan atorvastatin 40 mg yang diberikan kepada pesakit menunjukkan respons separa yang menurunkan paras LDL-C daripada 10 mmol/L kepada sekitar 6 mmol/L. Dengan itu, pemantauan lipid secara berkala dan terapi kombinasi mungkin diperlukan untuk mencapai penurunan LDL-C yang lebih efektif sekali gus mengurangkan risiko penyakit kardiovaskular. Pesakit dengan mutasi patogenik mempunyai 50% kebarangkalian mewariskan mutasi ini kepada anak. Oleh itu, saringan kaskad penting untuk mengenal pasti corak pewarisan dan menilai risiko genetik FH.



RAJAH 5. Model struktur protein bagi *LDLR* jenis liar (wtLDLR) dan *LDLR* mutan (c.660del). a) Domain bukan sitoplasma dan kawasan transmembran telah dikenalpasti dalam wtLDLR. b) *LDLR* mutan menunjukkan perubahan struktur *LDLR* dan hanya peptida isyarat dikenalpasti dalam jujukan protein menunjukkan kemungkinan kehilangan fungsi *LDLR* disebabkan oleh c.660del.

PERBINCANGAN

Mutasi dalam gen *LDLR* merupakan penyebab utama FH dengan anggaran 80-85% kes melibatkan mutasi yang dapat dikesan dalam gen ini (Benito-Vicente et al. 2018). Sehingga kini, lebih daripada 2,600 varian *LDLR* telah dikenal pasti berdasarkan pangkalan data ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (Iacocca et al. 2018). Di Malaysia, kajian genetik FH masih terhad namun ia menunjukkan bahawa mutasi dalam gen *LDLR* adalah yang paling

kerap ditemui dalam kalangan pesakit FH. Kajian menggunakan NGS oleh Razman et al. mengenal pasti 40 varian patogenik dalam 372 subjek FH termasuk 18 varian dalam gen *LDLR* (Razman et al. 2022).

Varian sinonimus dalam gen *LDLR* yang dikenal pasti dalam kajian ini turut dilaporkan dalam populasi global (Komarova et al. 2013; Hu et al. 2021). Walaupun varian sinonimus dianggap tidak mempengaruhi fungsi protein namun kajian terkini menunjukkan ia boleh mempengaruhi

kestabilan *messenger RNA* (mRNA) dan kecakapan translasi bagi proses penyambungan gen (Bailey et al. 2021; Oelschlaeger, 2024). Kajian terdahulu menunjukkan bahawa varian sinonimus seperti rs688 (c.1773C>T) dan rs5925 (c.1959T>C) dikaitkan dengan peningkatan tahap LDL-C dalam populasi Eropah namun tidak menunjukkan perubahan fenotip ketara dalam populasi Afrika Selatan (Rafiq et al. 2011). Selain itu, varian rs688 juga dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit arteri koronari dalam populasi British, Jerman dan India (Samani et al. 2007; Jha et al. 2018). Oleh itu, analisis varian sinonimus tidak boleh diabaikan dalam penilaian genetik FH dan kajian fungsional diperlukan untuk mengesahkan impak klinikalnya.

Kajian ini turut melaporkan penemuan mutasi penghapusan c.660del (rs875989905) pada ekson 4 gen LDLR pada pesakit ketiga. Mutasi ini menyebabkan pemansuhan satu nukleotida (delC) pada posisi 221 yang mengakibatkan perubahan rangka bacaan kodon dan menghasilkan protein terubah p.(Asp221fs). Kerosakan struktur protein LDLR ini berpotensi mengurangkan fungsinya dalam penyerapan kolesterol dalam darah sekali gus meningkatkan paras LDL-C yang menyumbang kepada fenotip FH yang lebih teruk seperti arkus kornea dan xanthoma tendon dan risiko kardiovaskular yang lebih tinggi (Goldstein & Brown 1987; Kamal et al. 2023). Penemuan ini menekankan keperluan rawatan intensif kerana mutasi c.660del mempunyai implikasi klinikal yang teruk (Walton 1973; Fernández et al. 2006; Crispin 2002; Basavaraj et al. 2006).

Keterbatasan utama kajian ini adalah saiz sampel yang kecil (n=3) mengehadkan kebolehgeneralisasian penemuan. Oleh itu, kajian lanjutan dengan saiz sampel yang lebih besar diperlukan bagi mengukuhkan dapatan serta menilai corak pewarisan varian dengan lebih tepat. Kajian berskala besar juga dapat memperjelas hubungan antara varian sinonimus dan risiko penyakit kardiovaskular. Selain itu, kajian fungsional terhadap varian yang dikenal pasti perlu dijalankan untuk memahami mekanisme molekular yang terlibat dalam patogenesis FH termasuk kesannya terhadap ekspresi dan fungsi protein. Walaupun terdapat keterbatasan, penemuan kajian ini tetap bernilai dalam mengenal pasti mutasi LDLR pada ahli keluarga dan diagnosis serta rawatan awal dapat dimulakan. Selain itu, intervensi gaya hidup termasuk pengubahsuaian diet dan peningkatan aktiviti fizikal adalah strategi penting dalam pengurusan FH. Dari perspektif kesihatan awam, penemuan ini memberi implikasi penting terhadap dasar saringan genetik dan pengurusan FH. Integrasi ujian genetik dalam program saringan kebangsaan dapat meningkatkan kadar pengesanan awal serta membolehkan pesakit menerima intervensi lebih

awal dan seterusnya mengurangkan beban penyakit kardiovaskular. Selain itu, garis panduan klinikal berkaitan saringan dan rawatan FH perlu diperhalusi bagi memastikan pesakit berisiko tinggi diberikan rawatan yang lebih intensif sekali gus menurunkan paras LDL-C secara lebih berkesan.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, empat varian sinonimus dalam gen LDLR telah dikenal pasti iaitu c.1413A>G pada ekson 10, c.1617C>T pada ekson 11 serta c.2232A>G dan c.2253A>G pada ekson 15 bersama satu mutasi penghapusan varian patogenik c.660del (rs875989905) pada ekson 4. Penemuan ini menekankan kepentingan saringan genetik untuk mengenal pasti mutasi pada pesakit hiperkolesterolemia bagi membolehkan saringan kaskad atau ahli keluarga dilakukan sekaligus membolehkan diagnosis awal dilakukan dan rawatan menggunakan statin untuk menurunkan kadar LDL-C boleh dimulakan.

PENGHARGAAN

Manuskrip ini di bawah tajaan Geran Penyelidikan Universiti (GUP 2019-069).

RUJUKAN

- Bailey, S.F., Alonso Morales, L.A. & Kassen, R. 2021. Effects of Synonymous Mutations beyond Codon Bias: The Evidence for Adaptive Synonymous Substitutions from Microbial Evolution Experiments. *Genome Biol Evol* 13(9):evab141.
- Basavaraj, A., Jadhav, S. & Dhadwad, J. 2006. Familial hypercholesterolemia presenting as intracranial xanthoma. *J Assoc Physicians India* 54: 330–332.25.
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H. & Martin, C. (2018). Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 19(11), 3426. <https://doi.org/10.3390/ijms19113426>
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. & Sayers, E.W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D36–42. doi: 10.1093/nar/gks1195. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23193287; PMCID: PMC3531190.
- Berberich, A.J. & Hegele, R.A. 2019. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nature Reviews Cardiology* 16: 9–20.
- Brandts, J. & Ray K.K. 2021. Familial Hypercholesterolemia: JACC Focus Seminar 4/4. *Journal of the American College of Cardiology* 78: 1831–1843.
- Bruikman, C.S., Hovingh, G.K. & Kastelein, J.J. 2017. Molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Current Opinion in*

- Cardiology* 32, 262–266.
- Burgin, J., Ahamed, A., Cummins, C., Devraj, R., Gueye, K., Gupta, D., Gupta, V., Haseeb, M., Ihsan, M., Ivanov, E., Jayathilaka, S., Balavenkataraman Kadhivelu, V., Kumar, M., Lathi, A., Leinonen, R., Mansurova, M., McKinnon, J., O’Cathail, C., Paupério, J., Pesant, S., Rahman, N., Rinck, G., Selvakumar, S., Suman, S., Vijayaraja, S., Waheed, Z., Woollard, P., Yuan, D., Zyoude, A., Burdett, T. & Cochrane, G. 2023. The European Nucleotide Archive in 2022. *Nucleic Acids Res.* 6;51(D1):D121-D125. doi: 10.1093/nar/gkac1051. PMID: 36399492; PMCID: PMC9825583.
- Chen, J.E., Huang, C.C. & Ferrin, T.E. 2015. RRDistMaps: a UCSF Chimera tool for viewing and comparing protein distance maps. *Bioinformatics* 1;31(9):1484-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btu841. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25540183; PMCID: PMC4410660.
- Chua, Y.A., Razman, A.Z., Ramli, A.S., Mohd Kasim, N.A. & Nawawi, H. 2021. Familial hypercholesterolaemia in the Malaysian community: Prevalence, under-detection and under-treatment. *J Atheroscler Thromb* 28: 1095-107.
- Crispin, S. 2002. Ocular lipid deposition and hyperlipoproteinemia. *Progress in Retinal and Eye Research* 21(2):169–224.
- Fernández, A., Sorokin, A. & Thompson, P.D. 2006. Corneal arcus as coronary artery disease risk factor. *Atherosclerosis* 193(2):235–40.
- Futema, M., Taylor-Beadling, A., Williams, M. & Humphries, S.E. (2021). Genetic testing for familial hypercholesterolemia—past, present, and future. *Journal of Lipid Research* 62(n/a), n/a. DOI: 10.1016/J.JLR.2021.100139.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 1;31(13):3784-8. doi: 10.1093/nar/gkg563. PMID: 12824418; PMCID: PMC168970.
- Gelfman, S., Wang, Q., McSweeney, K.M., Ren, Z., La Carpio, F., Halvorsen, M., Schoch, K., Ratson, F., Heinzen, E.L., Boland, M.J., Petrovski, S. & Goldstein, D.B. 2017. Annotating pathogenic non-coding variants in genic regions. *Nat Commun.* 9;8(1):236. doi: 10.1038/s41467-017-00141-2. PMID: 28794409; PMCID: PMC5550444.
- Gidding, S.S., Champagne, M.A., de Ferranti, S.D., Defesche, J., Ito, M.K., Knowles, J.W., McCrindle, B., Raal, F., Rader, D., Santos, R.D., Lopes-Virella, M., Watts, G.F., Wierzbicki, A.S., American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Young Committee of Council on Cardiovascular Disease in Young, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Functional Genomics and Translational Biology, and Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health. 2015. The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 132(22):2167-92.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1973). Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(10), 2804–8. DOI: 10.1073/pnas.70.10.2804.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1974). Binding and degradation of low-density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of Biological Chemistry* 249(16), 5153–62. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)42341-7.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. 1987. Regulation of low-density lipoprotein receptors: Implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76: 504-7.
- Hevonoja, T., Pentikäinen, M.O., Hyvönen, M.T., Kovanen, P.T. and Ala-Korpela, M. (2000). Structure of low-density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488(3), 189–210. DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00123-2.
- Hu, H., Shu, T., Ma, J., Chen, R., Wang, J., Wang, S., Lin, S. & Chen, X. 2021. Two Novel Disease-Causing Mutations in the *LDLR* of Familial Hypercholesterolemia. *Frontiers in Genetics* 12: 762587.
- Iacocca, M.A., Chora, J.R., Carrié, A., Freiburger, T., Leigh, S.E., Defesche, J.C. and ClinGen FH Variant Curation Expert Panel. (2018). ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. *Human Mutation* 39(11), 1631–1640. DOI: 10.1002/humu.23634.
- Jha, C.K., Mir, R., Khullar, N., Shaheena Banu, S. & Chahal, S.M.S. 2018. *LDLR* rs688 TT Genotype and T Allele Are Associated with Increased Susceptibility to Coronary Artery Disease—A Case-Control Study. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 5, 31.
- Kamal, A., Kanchau, J.D., Shahuri, N.S., Mohamed-Yassin, M.S., Baharudin, N., Abdul Razak, S., Badlishah-Sham, S.F., Abdul-Hamid, H., Abdul Aziz, A.F., Al-Khateeb A., Chua, Y.A., Mohd Kasim, N.A., Sheikh Abdul Kadir, S.H., Nawawi, H., Qureshi, N. & Ramli, A.S. 2023. Case Series of Genetically Confirmed Index Cases of Familial Hypercholesterolemia in Primary Care. *American Journal of Case Reports* 24:e939489-1–e939489-12.
- Knowles, J. W., Rader, D. J. & Khoury, M. J. 2017. Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia and the Use of Genetic Testing. *JAMA* 318(4): 381-382.
- Komarova, T.Y., Korneva, V.A., Kuznetsova, T.Y., Golovina, A.S., Vasilyev, V.B. & Mandelshtam, M.Y. 2013. Familial hypercholesterolemia mutations in Petrozavodsk: no similarity to St. Petersburg

- mutation spectrum. *BMC Medical Genetics* 14:128.
- Kostner, G.M. 1994. MED-PED: Make Early Diagnosis-Prevent Early Death [MED-PED: make early diagnosis--prevent early death]. *Wien Med Wochenschr* 144(12-13):317-9. German. PMID: 8650936.
- Mabuchi, H., Nohara, A., Noguchi, T., Kobayashi, J., Kawashiri, M., Inoue, T., Mori, M., Tada, H., Nakanishi, C., Yagi, K., Yamagishi, M., Ueda, K., Takegoshi, T., Miyamoto, S., Inazu, A., Koizumi, J. & Hokuriku FH Study Group. 2014. Genotypic and phenotypic features in homozygous familial hypercholesterolemia caused by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutation. *Atherosclerosis* 236: 54-61.
- McGowan, M.P., Hosseini Dehkordi, S.H., Moriarty, P.M. & Duell, P.B. (2019). Diagnosis and treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of the American Heart Association* 8(24), e013225. DOI: 10.1161/JAHA.119.013225
- Migliara, G., Baccolini, V., Rosso, A., D'Andrea, E., Massimi, A., Villari, P. & De Vito, C. (2017). Familial hypercholesterolemia: a systematic review of guidelines on genetic testing and patient management. *Frontiers in Public Health* 5(n/a), 252. DOI: 10.3389/fpubh.2017.00252.
- Nazli, S.A., Chua, Y.A., Mohd Kasim, N.A., Ismail Z., Md Radzi, A.B., Ibrahim, K.S., Kasim, S.S., Rosman, A. & Nawawi, H. 2022. Familial hypercholesterolaemia and coronary risk factors among patients with angiogram-proven premature coronary artery disease in an Asian cohort. *PLoS One* 17(9): e0273896.
- Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Humphries, S.E., Ginsberg, H.N., Masana, L., Descamps, O.S., Wiklund, O., Hegele, R.A., Raal, F.J., Defesche, J.C., Wiegman, A., Santos, R.D., Watts, G. F., Parhofer, K. G., Hovingh, G. K., Kovanen, P. T., Boileau, C., Aversa, M., Bore'n, J., Bruckert, E., Catapano, A.L., Kuivenhoven, J.A., Pajukanta, P., Ray, K., Stalenhoef, A.F.H., Stroes, E., Taskinen, M.-R. & Tybjærg-Hansen, A. 2013. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal* 34: 3478-90a.
- Oelschlaeger, P. 2024. Molecular Mechanisms and the Significance of Synonymous Mutations. *Biomolecules* 14, 132.
- Packard, C., Chapman, M.J., Sibartie, M., Laufs, U. & Masana, L. (2021). Intensive low-density lipoprotein cholesterol lowering in cardiovascular disease prevention: opportunities and challenges. *Heart* 107(17), 1369-75.
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B.L., Salazar, G.A., Bileschi, M.L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D.H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Orengo, C.A., Pandurangan, A.P., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H. & Bateman, A. 2023. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 51(D1):D418-D427. doi: 10.1093/nar/gkac993. PMID: 36350672; PMCID: PMC9825450.
- Qin, D. 2019. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine* 16(1), 4. DOI:10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055
- Rafiq, S., Ahmed, N., Soutar, A. & Qamar, R. 2011. The genetic characterization of familial hypercholesterolemia in Pakistan. *Journal of Basic & Applied Sciences* 7, 21-25.
- Rallidis, L.S., Iordanidis, D. & Iliodromitis, E. (2020). The value of physical signs in identifying patients with familial hypercholesterolemia in the era of genetic testing. *Journal of Cardiology* 76(6), 568-72. DOI: 10.1016/j.jjcc.2020.07.005.
- Razman, A.Z., Chua, Y.-A., Mohd Kasim, N.A., Al-Khateeb, A., Sheikh Abdul Kadir, S.H., Jusoh, S.A. & Nawawi, H. 2022. Genetic Spectrum of Familial Hypercholesterolaemia in the Malaysian Community: Identification of Pathogenic Gene Variants Using Targeted Next-Generation Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 14971.
- Samani, N.J., Erdmann, J., Hall, A.S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R.J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.E., Barrett, J.E., König, I.R., Stevens, S.E., Szymczak, S., Tregouet, D.-A., Iles, M.M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., Cambien, F., Fischer, M., Ouwehand, W., Blankenberg, S., Balmforth, A.J., Baessler, A., Ball, S.G., Strom, T.M., Brænne, I., Gieger, C., Deloukas, P., Tobin, M.D., Ziegler, A., Thompson, J.R & Schunkert, H. 2007. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 357, 443-453.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M.C. 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3381-5. doi: 10.1093/nar/gkg520. PMID: 12824332; PMCID: PMC168927.
- Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. 1999. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis* 142(1): 105-12.
- Sun, D., Zhou, B.-Y., Li, S., Sun, N.-L., Hua, Q., Wu, S.-L., Cao, Y.-S., Guo, Y.-L., Wu, N.-Q., Zhu, C.-G., Gao, Y., Cui, C.-J., Liu, G. & Li, J.-L. 2018. Genetic basis of index patients with familial hypercholesterolemia in Chinese population: Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation. *Lipids in Health and Disease* 17, 252.
- Walton, K.W. 1973. Studies on the pathogenesis of corneal arcus formation. I. The human corneal arcus and its relation to atherosclerosis as studied by immunofluorescence. *Journal Pathology* 111(4): 263-274.
- Wan Ahmad, W.A. 2024. Annual Report of the NCVLD-ACS Registry, 2020-2021. Kuala

- Lumpur, Malaysia: National Cardiovascular Disease Database. [Retrieved 2024 November 12]. Available at: <https://www.malaysianheart.org/management.file/doc/202405117557113419.pdf>
- Wiegman, A., Gidding, S.S., Watts, G.F., Chapman, M.J., Ginsberg, H.N., Cuchel, M., Ose, L., Averna, M., Boileau, C., Borén, J., Bruckert, E., Catapano A.L., Defesche, J.E., Olivier S Descamps, O.S., Hegele, R.A., G Kees Hovingh, G.K., Humphries S.E., Kovanen, P.T., Kuivenhoven J.A., Masana, L., Nordestgaard, B.G., Päivi Pajukanta, P., Parhofer, K.G., Raal, F.J., Ray, K.K., Santos, R.D., Stalenhoef, A.F.H., Steinhagen-Thiessen, E., Stroes, E.S., Taskinen, M-R., Tybjærg-Hansen, A. & Olov Wiklund, O. 2015. Familial Hypercholesterolaemia in Children and Adolescents: Gaining Decades of Life by Optimizing Detection and Treatment. *European Heart Journal* 36, 2425–2437.
- Vrablik, M., Tichý, L., Freiburger, T., Blaha, V., Satny, M. & Hubacek, J.A. (2020). Genetics of familial hypercholesterolemia: new insights. *Frontiers in Genetics* 11(n/a), 574474. DOI: 10.3389/fgene.2020.574474
- Zubielienė, K., Valterytė, G., Jonaitienė, N., Žaliaduonytė, D. & Zabiela, V. (2022). Familial hypercholesterolemia and its current diagnostics and treatment possibilities: a literature analysis. *Medicina* 58(11), 1665. DOI: 10.3390/medicina58111665.