

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46276

MUTATION ANALYSIS OF *MSX1* IN PATIENTS WITH  
SYNDROMIC AND NON-SYNDROMIC HYPODONTIA  
AND OROFACIAL CLEFTS

ONNIDA WATTANARAT

MASTER OF SCIENCE  
IN DENTISTRY

THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
OCTOBER 2010

600256111

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46276



**MUTATION ANALYSIS OF *MSX1* IN PATIENTS WITH  
SYNDROMIC AND NON-SYNDROMIC HYPODONTIA  
AND OROFACIAL CLEFTS**

**ONNIDA WATTANARAT**

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN  
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
IN DENTISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
OCTOBER 2010**

**MUTATION ANALYSIS OF *MSX1* IN PATIENTS WITH  
SYNDROMIC AND NON-SYNDROMIC HYPODONTIA  
AND OROFACIAL CLEFTS**

ONNIDA WATTANARAT

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED  
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN DENTISTRY

**EXAMINING COMMITTEE**

**THESIS ADVISOR**

*Vorasuk Shotelersuk*.....CHAIRPERSON

Prof. Vorasuk Shotelersuk

*D. Jotikasthira*.....

Assoc.Prof. Dhirawat Jotikasthira

*Anak Iamaroon*.....MEMBER

Prof. Dr. Anak Iamaroon

*D. Jotikasthira*.....MEMBER

Assoc.Prof. Dhirawat Jotikasthira

1 October 2010

© Copyright by Chiang Mai University

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep appreciation and sincere gratitude to my advisors, Assoc.Prof. Dhirawat Jotikasthira and Dr.Piranit Kantaputra, for their wisdom, invaluable guidance and professionalism from the beginning to the end of the course of my research.

I would like to appreciate Prof. Vorasuk Shotelersuk, Ms. Siraprapa Tongkobpetch, Mr. Pramuk Amarinthnukrowh and the Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Chulalongkorn University for their invaluable guidance and support.

It should be respected that the success of my thesis was through the cooperation and support of the principals and people who participated in this study. I would like to extend my heartiest thanks to them for their patience and kind involvement in this study. My thankfulness also goes to the staff of Chiang Mai University and all others who have provided support and assistance in one way or another to make this study possible.

I am appreciative to all of my patients and other members of their families for their kind participation in this study. I wish to thank Dr. Arunee Kaewkhampa, Dr. Montalikan Paramee, Dr. Warissara Sripathomsawad, and Dr. Saranya Thawanapong for their help in sample collection. My gratitude also goes to Dr. Metawee Srikumool for training me in genetic laboratory skills.

I would like to recognize the Thailand Research Fund, the European Commission, the Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Faculty of

Dentistry and The Graduate School, Chiang Mai University, for the financial support that makes this research possible.

I would like to acknowledge the Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, and Craniofacial Genetics Laboratory, Chiang Mai University for facilitating my access to equipment and working places.

I also would like to express my gratefulness to Prof.M. Kevin O Carroll, Professor Emeritus of the University of Mississippi School of Dentistry and Faculty Consultant at Chiang Mai University Faculty of Dentistry, for his cordiality and assistance in the preparation of the thesis and manuscript.

Finally, I am thankful to my beloved parents, Mr. Porntep and Assist.Prof. Siwaporn, and my beloved brother, Mr. Nattapong, who love and encourage me. Special thanks are due to my masters, Assist.Prof. Mallika Sookkasem, Assist.Prof. Chompoonuch Kunlertkij, Assist.Prof. Jurairat Kunachaichote, Dr. Papimon Chompuinwai, Assist.Prof. Varisara Sirimaharaj, Dr. Ubonwan Teerapiboon and Dr. Wilawan Prucksathamrongkul for their support and care. I wish to thank my beloved friends, Dr. Arunee Kaewkhampa, Dr. Nattawan Tantawiwat, Dr. Sirichom Riyasarn, Dr. Darin Techachongjintana, Dr. Sathian Suravisankul, Dr. Sinee Chaowarat, Dr. Porntipa Pipatpaitoon, Dr. Monticha Rangjaroen, Dr. Amornrat Suwannachai, Ms. Phirawan Chiranantraphorn, Dr. Suwit Thaithamayanon, Dr. Krit Makonkaewkayoon and Dr. Thongaek Wattanarojanaporn, whose endless support and understanding have been profound throughout the difficult times of this Master's degree course. Without your love and support I am sure that I would not have been able to achieve so much.

Onnida Wattanarat

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน MSX1 ในผู้ป่วยที่มีภาวะฟันหายแต่กำเนิดและรอยแยกบริเวณช่องปากและใบหน้าที่เกิดร่วมและไม่ร่วมกับกลุ่มอาการ
ผู้เขียน	นางสาวอรนิตา วัฒนรัตน์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ทันตแพทยศาสตร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ทพ. ชีระวัฒน์ โชติกเสถียร

### บทคัดย่อ

**E46276**

เอ็มเอสเอ็กซ์วัน โปรตีนเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสทางพันธุกรรม พบแสดงออกในโครงสร้างหลายส่วนของตัวอ่อนรวมทั้งในเนื้อเยื่อมิเซนไคม์ของฟันและเพดานปาก ยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วันมีหน้าที่สำคัญในปฏิกิริยาที่มีต่อกันระหว่างเนื้อเยื่ออีพิทีเลียลกับมิเซนไคม์ ที่เกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาของส่วนกะโหลกใบหน้าและฟัน เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่าการกลายพันธุ์ของยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วันเป็นสาเหตุให้เกิดฟันหายแต่กำเนิดและปากแหว่งเพดานโหว่ ที่เกิดร่วมและไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาการกลายพันธุ์ของยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วันในผู้ป่วยไทยที่มีภาวะฟันหายแต่กำเนิดและปากแหว่งเพดานโหว่ที่เกิดร่วมและไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ ทำการวิเคราะห์การกลายพันธุ์โดยครอบคลุมเบสส่วนที่จะถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนทั้งหมด ศึกษาในผู้ป่วยที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันที่มีภาวะฟันหายแต่กำเนิดที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ 30 คน ผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ 28 คน เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ 2 คนและกลุ่มควบคุม 100 คน ผลการวิเคราะห์พบการเปลี่ยนแปลงของเบสชนิดเฮเทอโรไซกัสมิสเซ็นแวลริเอชัน 2 ตำแหน่งที่ไม่เคยถูกรายงานมาก่อนในส่วนของเอ็กซ์อนที่ 2 การเปลี่ยนแปลงแรกคือตำแหน่งที่ 721 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจากโพรลีนเป็นเซอร์ริน (p.P241S) พบในผู้ป่วยที่มีอาการร่วมของปากแหว่งเพดานโหว่ ฟันหายแต่กำเนิดและนิ้วเกิน การเปลี่ยนแปลงของเบสนี้ยังพบในบิดาที่มีฟันหายแต่กำเนิดกับพี่ชายที่มีฟันหายแต่กำเนิดและฟันขนาดเล็กกว่าปกติด้วย การเปลี่ยนแปลงที่พบอีกก็คือ

**E46276**

ตำแหน่งที่ 589 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจากอลานีนเป็นธรีโอนีน (p.A197T) โดยพบในผู้ป่วยปากแห้ง เพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการ มาร์คาที่มีฟันขนาดเล็กกว่าปกติและพี่สาวที่มีภาวะฟันหาย แต่กำเนิด จากผลการศึกษาเสนอแนะว่าการกลายพันธุ์แบบ p.P241S และ p.A197T อาจมีความสัมพันธ์กับภาวะปากแห้งเพดานโหว่ที่เกิดร่วมกับกลุ่มอาการในผู้ป่วยไทย การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่รายงานว่า การกลายพันธุ์ของยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วันอาจมีความสัมพันธ์กับปากแห้งเพดานโหว่ภาวะฟันหายแต่กำเนิดและความผิดปกติของระยางค์บนในมนุษย์

**Thesis Title** Mutation Analysis of *MSX1* in Patients with Syndromic and Non-syndromic Hypodontia and Orofacial Clefts

**Author** Ms. Onnida Wattanarat

**Degree** Master of Science (Dentistry)

**Thesis Advisor** Assoc.Prof. Dhirawat Jotikasthira

## ABSTRACT

**E46276**

*MSX1* is a transcription factor expressed in numerous embryonic structures. *Msx1* has an important role in epithelial-mesenchymal interactions during craniofacial and tooth development. Mutations of *MSX1* are known to be the causes of non-syndromic hypodontia and orofacial clefts. This research aimed to find *MSX1* mutations in Thai patients with syndromic and non-syndromic hypodontia and orofacial clefts in the Thai population. Mutation analysis was performed covering all the coding regions of *MSX1* in 30 Thai unrelated patients with non-syndromic hypodontia, 28 unrelated patients with non-syndromic orofacial clefts, two with syndromic orofacial cleft and 100 Thai controls. Mutation analysis revealed two novel heterozygous missense mutations located in exon 2. The first one was c.721C>T, which results in p.P241S, in a patient with cleft lip and palate, hypodontia and preaxial-polydactyly of the left thumb. This mutation was also present in his father with hypodontia, and in his brother with hypodontia and microdontia. The second mutation was c.589G>A, which results

**E46276**

in p.A197T, in a patient with cleft lip and palate, in her mother with microdontia, and in her sister with hypodontia. These findings suggest that p.P241S and p.A197T mutations may be associated with syndromic orofacial clefts in the Thai population. This is the first report in humans suggesting that *MSX1* mutation may be associated with cleft lip and palate, hypodontia and upper limb anomalies.

**TABLE OF CONTENTS**

	<b>Page</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b>	iii
<b>ABSTRACT (THAI)</b>	v
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b>	vii
<b>LIST OF TABLES</b>	xi
<b>LIST OF FIGURES</b>	xiii
<b>CHAPTER I INTRODUCTION</b>	1
1.1 Rationale	1
1.2 Objectives	2
1.3 Hypothesis	2
<b>CHAPTER II REVIEW OF THE LITERATURE</b>	3
2.1 <i>MSX1</i> and its structure and functions	6
2.2 Tooth development	48
2.3 Hypodontia (Tooth agenesis)	56
2.4 Facial and palate development	59
2.5 Orofacial clefts	65
2.6 <i>Msx1</i> -associated human syndromic malformations	68

	<b>Page</b>
2.7 <i>Msx1</i> -associated human non-syndromic malformations	73
2.8 Previously reported <i>MSX1</i> mutations	75
<b>CHAPTER III MATERIALS AND METHODS</b>	<b>78</b>
3.1 Materials	78
3.1.1 Sample collection	78
3.1.2 PCR materials	79
3.2 Methods	80
3.2.1 Mutation analysis	80
3.2.2 Data analysis	83
<b>CHAPTER IV RESULTS</b>	<b>85</b>
<b>CHAPTER V DISCUSSION</b>	<b>96</b>
<b>CHAPTER VI CONCLUSIONS</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAPHY</b>	<b>109</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>127</b>
Appendix A List of patients in this study	128
Appendix B Coding sequence of <i>MSX1</i> (Exon 1 and 2)	132
Appendix C <i>MSX1</i> amino acid sequence	135
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>136</b>

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
2.1 Animal species names	14
2.2 Candidate genes for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate	67
2.3 Previous mutations of human <i>MSX1</i>	75
3.1 The phenotypes of patients with orofacial clefts in this study	79
3.2 The phenotypes of patients with hypodontia in this study	79
3.3 Oligonucleotides and polymerase chain reaction (PCR) conditions for <i>MSX1</i> mutation analysis	80
3.4 Reagents and concentration used in PCRs of exon 1	81
3.5 PCR conditions of exon 1	82
3.6 Reagents and concentration used in PCRs of exon 2	82
3.7 PCR conditions of exon 2	83
4.1 <i>MSX1</i> single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this study	93

	<b>Page</b>
A.1 Craniofacial genetics laboratory (CGL) DNA number and phenotype of all patients in this study	128

**LIST OF FIGURES**

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
2.1 Structure of the <i>MSX1</i> gene	8
2.2 Seven Msx Homology (MH) domains	9
2.3 The amino acid sequences of the homeodomain and a C-terminal flanking region of the Msx1 protein	13
2.4 The mutations map to the conserved domains	15
2.5 The Msx1 homeodomain-DNA complex	16
2.6 MSX1 protein domains and amino acid sequences in each domain	17
2.7 Histone H1b and PIAS1 interact with Msx1 protein	18
2.8 Comparison of Msx and Dlx proteins	22
2.9 Odontogenesis in mice	24
2.10 Palates of wild type and mutant mice	25
2.11 Skeletal stain of the maxillary and palatine shelves of wild type and mutant mice	26

	<b>Page</b>
2.12 Palate development in wild type and mutant mice	26
2.13 Skeletal stain of the heads of wild type and mutant mice	27
2.14 Mandibles of wild type and mutant mice	28
2.15 Skulls of wild type and mutant mice	29
2.16 Bones of the middle ear of wild type and mutant mice	30
2.17 <i>Bmp4</i> and <i>Fgf8</i> signaling pathways	40
2.18 <i>Msx1</i> is expressed in the neural fold and works upstream of <i>Ednra</i>	41
2.19 <i>Endothelin-HAND-Msx1</i> pathway	42
2.20 Genetic pathway regulating <i>Ptc</i> expression in the early odontogenesis	43
2.21 Sumoylation of a target protein	46
2.22 Lysine residues (Lys9 and Lys127 of MSX1) that are covalently attached to SUMO	47
2.23 Stages of tooth development	49
2.24 Different gene expression in early tooth development	51
2.25 Molecular signaling in tooth development	52
2.26 <i>Msx1</i> , <i>Bmp4</i> and <i>Lef1</i> into a genetic pathway in early tooth formation	55

	<b>Page</b>
2.27 Frontal view of facial development during the 4 <sup>th</sup> week	59
2.28 Frontal view of facial development during the 5 <sup>th</sup> and 6 <sup>th</sup> week	60
2.29 Hard palate formation during the 6 <sup>th</sup> gestational week	61
2.30 Mandibular formation	61
2.31 Craniofacial development during the 7 <sup>th</sup> and 8 <sup>th</sup> week	62
2.32 Hard palate formation during the 7 <sup>th</sup> gestational week	62
2.33 Hard palate formation during the 8 <sup>th</sup> week	63
2.34 Hard palate formation at the end of the 8 <sup>th</sup> gestational week	63
2.35 Congenitally missing teeth in Witkop syndrome patient	69
2.36 Toenail dysplasia in Witkop syndrome patient	70
2.37 Wolf-Hirschhorn syndrome phenotypes	72
2.38 Schematic view of human <i>MSX1</i> mutations	76
3.1 Gel electrophoresis of exon 1 and exon 2	83
4.1 Pedigree of the family with p.P241S	86
4.2 Clinical and radiographic findings of proband I	87
4.3 Panoramic radiographs of the members of family I	87

	<b>Page</b>
4.4 Mutation analysis of proband I	88
4.5 Pedigree of the family with p.A197T	89
4.6 Clinical and radiographic findings of proband II	90
4.7 Panoramic radiographs of the members of family II	90
4.8 Mutation analysis of proband II	91
4.9 Sequence alignment of the Msx1 protein across various species	92
4.10 SNPs in coding regions compared with those in a normal sequence	94
4.11 Clinical findings of the patient with p.P147Q	95
5.1 Comparison of proline and serine structure models	98
5.2 Comparison of alanine and threonine structure models	101
5.3 p.A197T mutation in the helix II of the homeodomain	103