ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46219

วิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของโรคทางพันธุกรรมบางโรคในประชากรไทย

นายประมุข อัมรินทร์นุเคราะห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00256071

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46219

วิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของโรคทางพันธุกรรมบางโรคในประชากรไทย

นายประมุข อัมรินทร์นุเคราะห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5074796530

PRACTICAL TECHNIQUES OF MUTATION DETECTION FOR PARTICULAR GENETIC DISEASES IN THAI PATIENTS

Mr. Pramuk Amarinthnukrowh

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	Practical techniques of mutation detection for particular genetic diseases in Thai patients
By	Mr. Pramuk Amarinthnukrowh
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Kanya Suphapeetiporn, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

..... Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Kanya Suphapeetiporn, M.D., Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Nipan Isarasena, M.D., Ph.D.)

..... External Examiner

(Nithiwat Vatanavicharn, M.D.)

ประมุข อัมรินทร์นุเคราะห์ : วิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของโรคทางพันธุกรรมบางโรคในประชากรไทย (Pratical techniques of mutation detections for particular genetic diseases in Thai patients) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.พญ.ดร.กัญญา ศุภปีติพร , 73 หน้า

E46219

โรคทางพันธุกรรมคือโรคที่มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ในยีนหรือความผิดปกติในระดับโครโมโซม ซึ่งความผิดปกตินี้สามารถเป็นได้ตั้งแต่ การเปลี่ยนแปลงเพียงเบสเดียวในสายดีเอ็นเอจนถึงลักษณะของโครโมโซมที่ผิดไป โดยวิธีการตรวจสอบความผิดปกตินี้มีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งหนึ่งในวิธีตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ คือ การตรวจสอบในระดับพันธุกรรม ในการศึกษาครั้งนี้จะนำเสนอวิธีการตรวจสอบในระดับพันธุกรรมที่เหมาะสมกับโรคทางพันธุกรรมบางโรคที่พบได้บ่อยในคลินิกพันธุศาสตร์ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเริ่มจากการวิเคราะห์โรค X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) ในยีน *ABCD1* ด้วยวิธี direct sequencing ซึ่งพบมีการกลายพันธุ์แบบที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ 3 แบบ ได้แก่ A646P, E609K, R401W และพบยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนอีก 2 แบบ ได้แก่ L392P และ A247D โรคที่สองที่ทำการศึกษาวิเคราะห์ คือ Pompe disease ในยีน *GAA* ด้วยวิธี PCR-RFLP บนตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยของโรคนี้ (hotspot) และวิธี direct sequencing ใน cDNA ซึ่งพบการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในโรคนี้คือ D645E ในผู้ป่วยทุกราย และพบครอบครัวหนึ่งมีการกลายพันธุ์อื่นร่วมด้วย คือ G576S โรคที่สามที่ได้วิเคราะห์คือ hyper-IgE syndrome (HIE) ในยีน *STAT3* โดยวิธี direct sequencing ครอบคลุมเฉพาะบริเวณ DNA binding และ SH2 ของยีนดังกล่าว ซึ่งผลการวิเคราะห์พบการกลายพันธุ์ R382W ที่เคยมีรายงานมาแล้วบนบริเวณ DNA binding domain โรคต่อมาที่ได้ทำการวิเคราะห์ คือ Holt-Oram syndrome (HOS) ในยีน *TBX5* และ *SALL4* ในผู้ป่วยทั้ง 4 คน ซึ่งไม่พบการกลายพันธุ์ในยีนทั้งสอง นอกจากนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ยีนซึ่งอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับโรค Systemic lupus erythematosus (SLE) คือ *DcR3* โดยทำการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-sequencing และวัดระดับ DcR3 ในซีรั่ม โดยวิธี ELISA พบว่า ผู้ป่วย SLE ที่มีอาการรุนแรง จะมีระดับซีรั่ม DcR3 โดยเฉลี่ย 436.35 pg/µl (±433.71) ผู้ป่วย SLE ที่มีอาการไม่รุนแรง จะมีระดับซีรั่ม DcR3 โดยเฉลี่ย 68.04 pg/µl (±158.52) และ คนที่ไม่เป็นโรค SLE จะมีระดับซีรั่ม DcR3 โดยเฉลี่ย 222.9141pg/µl (±194.8946) จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าระดับ DcR3 ไม่มีความแตกต่างในผู้ป่วย SLE กลุ่มรุนแรงกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค SLE แต่ระดับ DcR3 ในผู้ป่วย SLE ที่มีอาการรุนแรง มีระดับที่สูงกว่าในผู้ป่วย SLE ที่มีอาการไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การตรวจการกลายพันธุ์โดย PCR-sequencing พบมีการกลายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงาน คือ H122Y อยู่บนบริเวณ Fas binding domain ในผู้ป่วย SLE หนึ่งราย ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดเป็น SLE ขึ้นได้ การตรวจการกลายพันธุ์มีหลายวิธี การเลือกใช้ให้เหมาะสมเพื่อได้วิธีที่เชื่อถือได้ ถูกต้อง รวดเร็วขึ้นอยู่กับลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในแต่ละโรค เช่น ขนาด การแสดงออกในเม็ดเลือดขาว ลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบมาก่อนหน้านี้ ช่วยให้ได้การทดสอบทางพันธุกรรมที่เหมาะสมในแต่ละโรคและแต่ละประชากร

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่อ อ .ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ลายมือชื่อ อ .ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

##507 47965 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: GENETIC DISORDER/ GENETIC TESTING/ MUTATION/ ADRENOLEUKODYSTROPHY/ POMPE DISEASE/ HYPER-IgE SYNDROME/ HOLT-ORAM SYNDROME/ SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS/

PRAMUK AMARINTHNUKROWH: PRATICAL TECHNIQUES OF MUTATION DETECTIONS FOR PARTICULAR GENETIC DISEASES IN THAI PATIENTS. THESIS ADVISOR: PROF. VORASUK SHOTELERSUK, M.D. THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. KANYA SUPHAPEETIPORN, M.D., Ph.D., 73 pp

E 46219

Genetic disorders are caused by mutations in genes or abnormalities of chromosomes. The abnormality can range from a discrete mutation in a single base in the DNA to a gross chromosome abnormality. There are several methods for mutation detection. In this study, we demonstrated some of methods to properly characterize genetic diseases that were identified at Pediatric Clinic of the King Chulalongkorn Memorial Hospital. We have collected 9 patients with X-Adrenoleukodystrophy (X-ALD) and performed PCR-sequencing of entire coding region of the *ABCD1* gene. Three known mutations, A646P, E609K, R401W and two novel mutations, L392P and A247D were detected. We also analyzed the *GAA* gene causing Pompe disease by PCR-RFLP or direct sequencing on the previously reported mutations in the Chinese population. The possible founder effect mutation, D645E was found in all families and G576S known mutation in one family. A recently identified gene responsible for hyper-IgE syndrome (HIE) was also studied in one patient. Direct sequencing covering the region coding for the DNA binding and SH2 domains in the *STAT3* gene was performed and revealed the known mutation, R382W on the DNA binding domain. We also found 4 patients with clinical features consistent with Holt-Oram syndrome. However, PCR-direct sequencing could not identify disease-causing mutations in the *TBX5* and *SALL4* genes. Finally, a possible candidate gene, *DcR3*, for SLE was characterized. ELISA was used to detect the level of DcR3 in serum of 52 SLE patients and 25 controls who were unaffected with SLE. The DcR3 levels were significantly higher in the active group compared to the inactive SLE patients. However, there was no difference between the SLE patients and the unaffected controls. Interesting, a novel mutation, H122Y, was detected in the *DcR3* gene in one SLE patient. The mutation was on the Fas binding domain. Further studies are required to elucidate its functional significance.

Field of Study : Medical Science

Academic Year : 2009

Student's Signature Pramuk Amarinthnukrowh

Advisor's Signature Vorasuk Shotelersuk

Co- Advisor's Signature Kanya Suphapeetiporn

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and appreciation to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indepted to my advisor, Prof. Vorasuk Shotelersuk for his continuous support, encouragement and in valuable knowledge he gave to me during the M.Sc. program. Without his suggestions and constant guidance, I could not get through this whole thesis. Special respect and thanks are also extended to Assist.Prof. Kanya Suphapeetiporn for her help, interest, suggestions and her genuine assist for all of paper work I have wrote.

Besides my advisors, I would like to greatly express my heartfelt thanks to the rest of my thesis committee, Prof. Dr. Apiwat Mutirangura, Asso.Prof. Nipan Isarasena and Dr. Nithiwat Vatanavicharn for their helpful suggestions and corrections during my study.

Special thanks go to Miss Siraprapa Thongkorbpetch, Mr. Chalurmpon Srichomgthong and all of our laboratory members for their help and support from the beginning I walked in this laboratory to the end I finished my work. Especially, all of graceful friendship and lessons they give me.

Thank you for all patients who have dedicated all value blood samples and serum for this research.

Last, but not least, I thank my family: my parents for giving me life in the first place, for their love which encourage my life every single moment. Thank you so much.

The institutional grant from Research Unit fund, Building National Confidence in Science and Technology (NSTDA),and The Thailand Research Fund (TRF) are gratefully acknowledged.

This work was supported by Chulalongkorn University.

CONTENTS

Page

Abstract (Thai)..... IV

Abstract (English)..... V

Acknowledgements..... VI

Contents..... VII

List of Tables..... X

List of Figures..... XII

List of Abbreviations..... XIV

Chapter

I. Introduction..... 1

1. Background and rationale..... 1

2. Research Questions..... 3

3. Objectives..... 3

4. Hypothesis..... 3

5. Conceptual Framework..... 4

6. Assumption..... 5

7. Key words..... 5

8. Operational Definition..... 5

9. Research Design..... 5

10. Ethical Considerations..... 5

11. Limitation..... 6

12. Expected Benefit and Application..... 6

13. Research Methodology..... 6

II. Background and Related Literatures..... 7

1. genetic disorder..... 7

1.1 Single-gene..... 7

1.1.1 Autosomal dominant..... 7

1.1.2 Autosomal recessive..... 7
1.1.3 X-linked..... 8
1.2 Multifactorial..... 8
1.3 chromosomal..... 9
1.4 Mitochondrial..... 9
2. Effect of mutation..... 10
2.1 Effect on structure..... 10
2.1.1 Small-scale mutations..... 10
2.1.2 Large-scale 11
2.2 Effect on function..... 11
3. X-linked adrenoleukodystrophy..... 14
4. Glycogen storage disease type II..... 15
5. Hyper-IgE syndrome..... 16
6. Holt-Oram syndrome..... 19
7. Systemic lupus erythematosus..... 22
III. Methodology..... 24
Reagent Instruments..... 24
Reagent
1. General reagents..... 25
2. PCR reagents..... 26
3. Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction 26
4. Restriction enzymes..... 26
5. ELISA reagents and materials..... 27
6. Commercial Kits..... 27
Experimental Procedure
1. Subjects and sample collection..... 27
2. Genetic analysis
2.1. DNA extraction and collected plasma..... 28
2.2. RAN extraction..... 29
2.3. DNA amplification by Polymerase Chain Reaction 30
2.4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction 31

3. Mutation analysis

3.1. Mutation analysis with *ABCD1*..... 32

3.2. Mutation analysis with *GAA*..... 34

3.3. Mutation analysis with *STAT3*..... 37

3.4. Mutation analysis with *TBX5*..... 38

3.5. Mutation analysis with *SALL4*..... 40

3.6. Mutation analysis with *DcR3*..... 42

3.7. Gel extraction..... 47

IV. Results..... 49

1. X-linked adrenoleukodystrophy

1.1. Mutation analysis of the *ABCD1* gene..... 49

1.2. Confirmation of two novel mutant alleles by restriction enzyme digestion and sequencing..... 52

2. Pompe disease

2.1. Restriction enzyme *BsaH I*..... 54

2.2. Sequencing..... 54

3. Hyper-IgE syndrome..... 56

4. Holt-Oram syndrome..... 56

5. Systemic Lupus Erythematosus

5.1 SLE Disease Activity Index..... 57

5.2 Mutation analysis of the *DcR3* gene..... 57

5.3 Confirmation of two novel mutant alleles by restriction enzyme digestion and sequencing..... 58

V. Discussion and Conclusion..... 60

References..... 64

Appendices..... 68

Appendix A Buffers and Reagent..... 69

Appendix B Sample size..... 71

Appendix C Criteria for selection of controls & Result of ELISA..... 72

Biography..... 74

LIST OF TABLE

Table		Page
1	A new classification of Hyper-IgE syndrome	17
2	Primer sequences for *ABCD1* mutation analysis	32
2.1	PCR reaction of *ABCD1*	33
2.2	PCR cycle and condition of *ABCD1*	34
3	Primer sequences for *GAA* mutation analysis	35
3.1	PCR reaction of *GAA*	35
3.2	PCR cycle and condition of *GAA*	35
4	PCR-RFLP reaction of *GAA*	36
5	Primer sequences for *STAT3* mutation analysis	37
5.1	PCR reaction of *STAT3*	37
5.2	PCR cycle and condition of *STAT3*	38
6	Primer sequences for *TBX5* mutation analysis	38
6.1	PCR reaction of *TBX5*	39
6.2	PCR cycle and condition of *TBX5*	40
7	Primer sequences for *SALL4* mutation analysis	41
7.1	PCR reaction of *SALL4*	41
7.2	PCR cycle and condition of *SALL4*	42
8	Primer sequences for *DcR3* mutation analysis	42
8.1	PCR reaction of *DcR3*	43
8.2	PCR cycle and condition of *DcR3*	43
9	SLEDAI form	44
10	The restriction enzyme digestion to screening for the c. 740C>A mutation	52
11	PCR-RFLP for confirmation of the novel mutation, c. 740C>A	53
12	PCR-RFLP for confirmation of the common mutation, c.1935C>A	54
13	The result of *GAA* analysis in 6 unrelated Thai families	55
14	SLEDAI score of 47 SLE patients	57

15 PCR-RFLP for confirmation of the novel mutation, c.364C>T..... 58

16 Practical technique to detect mutation in this study..... 63

17 Evaluation of serum DcR3 in SLE patients by ELISA..... 73

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	All exons and domains of *ABCD1*	15
2	All exons and domains of *GAA*	16
3	JAK-STAT signaling pathway	18
4	Mutations detected in the *STAT3* gene	19
5	TBX5 Domains and mutations of *TBX5*	20
6	Structure of SALL4	21
7	Structure of DcR3	22
8	PCR-RFLP of *GAA* hotspot mutations	36
9	Electropherogram showing the c.1936G>C (p.A646P) mutation in the *ABCD1* gene	49
10	Electropherogram showing the c.1825G>A (p.E609K) mutation in the *ABCD1* gene	50
11	Electropherogram showing the c.1201C>T (p.R401W) mutation in the *ABCD1* gene	50
12	Electropherogram showing the c. 1175T>C (p.L392P) mutation in the *ABCD1* gene	51
13	Electropherogram showing the c. 740C>A (p.A247D) mutation in the *ABCD1* gene	51
14	Restriction enzyme digestion analysis of patient 5, the mother of patient 5 and 50 unaffected controls	52
15	Electropherogram showing the p.L392P in patient 4 and 50 unaffected controls in the *ABCD1* gene	53
16	Restriction enzyme digestion to detect the D645E mutation	54
17	Electropherogram showing the c.1726G>A (p. G576S) mutation in the *GAA* gene	55

18 Electropherogram showing the c.1144C>T (p.R382W) mutation in the *STAT3* gene 56

19 Electropherogram showing the c.364C>T (p.H122Y) mutation in the *DcR3* gene 57

20 PCR-RFLP to confirm the presence of a novel mutation, c.364C>T in *DcR3*..... 58

21 Serum DcR3 levels (pg/µl) in SLE patients and unaffected controls assayed by ELISA 59

22 Standard curve of DcR3 by ELISA..... 73

LIST OF ABBREVIATIONS

X-ALD	=	X- Linked Adrenoleukodystrophy
HIES	=	Hyper-IgE syndrome
HOS	=	Holt-Oram syndrome
SLE	=	Systemic Lupus Erythematosus
Ig	=	Immunoglobilin
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
SLEDAI	=	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index