การตรวจสอบการกลายพันธุ์ และการทำหน้าที่ของยีนอัลฟา-แอล-ไอดูโรนิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมิวโคโพลิแซ็คคาไรโดซีสชนิดที่ 1

นายกรกช พรหมจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN THE *ALPHA-L-IDURONIDASE* GENE RESPONSIBLE FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I

Mr. Korrakot Prommajan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Sciences
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510684

Thesis Title	IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN THE *ALPHA-L-IDURONIDASE* GENE RESPONSIBLE FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I
By	Mr. Korrakot Prommajan
Field of Study	Medical Sciences
Advisor	Assistant Professor Kanya Suphapeetiporn, M.D., Ph.D.
Co-Advisor	Professor Vorasuk Shotelersuk, M.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

(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

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

..... Advisor

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

..... Co-Advisor

(Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

..... External Examiner

(Associate Professor Duangrurdee Wattanasirichaigoon, M.D.)

กรกช พรหมจันทร์ : การตรวจสอบการกลายพันธุ์และการทำหน้าที่ของยีนอัลฟา-แอล-ไอดูโรนิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมิวโคโพลิแซ็คคาไรโดซีสชนิดที่ 1 (IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN THE *ALPHA-L-IDURONIDASE* GENE RESPONSIBLE FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.พญ.ดร.กัญญา ศุภปีติพร, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 75 หน้า.

โรคมิวโคโพลิแซ็คคาไรโดซีสชนิดที่ 1 เกิดจากการพร่องเอนไซม์อัลฟา-แอล-ไอดูโรนิเดส ทำให้มีการสะสมของไกลโคซามิโนไกลแคนในไลโซโซม งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยไทย 2 ราย ที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค แต่มีความรุนแรงแตกต่างกัน จากการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ของผู้ป่วยมีระดับน้อยกว่าเอนไซม์ของผู้ที่ไม่เป็นโรค การศึกษาหาการกลายพันธุ์ในยีนอัลฟา-แอล-ไอดูโรนิเดส โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ, ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และการศึกษาลำดับเบสในบริเวณส่วนที่แปลรหัสของการสร้างโปรตีนทั้งหมด พบว่า มีการกลายพันธุ์ของทั้งสองอัลลีลของยีนในผู้ป่วยทั้ง 2 ราย แต่ในบริเวณที่แตกต่างกัน คือ ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมีการเพิ่มแทรกของนิวคลิโอไทด์เบส C ที่ตำแหน่ง 252 ในเอ็กซอนที่ 2 ส่วนผู้ป่วยที่มีอาการน้อย มีการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น A ที่ตำแหน่ง 826 ในเอ็กซอนที่ 7 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 276 เปลี่ยนจากกรดกลูตามิกเป็นไลซีน การกลายพันธุ์ชนิดนี้ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน การทดสอบผลของการกลายพันธุ์ที่พบใหม่นี้โดยทำการทดลองศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้การทำงานของโปรตีนลดลง โดยพบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ที่ปกติ ข้อมูลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าการกลายพันธุ์ใหม่ที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค การศึกษานี้ได้พบการกลายพันธุ์ใหม่ในผู้ป่วยและเน้นถึงบทบาทที่สำคัญของการทดสอบทางชีวเคมีและทางอณูพันธุศาสตร์ในการให้การวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต กรกช พรหมจันทร์

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

497 48147 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORDS : MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I / HURLER / SCHEIE / *IDUA* / ALPHA-L-IDURONIDASE / MUTATION

KORRAKOT PROMMAJAN : IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN THE *ALPHA-L-IDURONIDASE* GENE RESPONSIBLE FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I.

ADVISOR: ASST. PROF. KANYA SUPHAPEETIPORN, M.D., Ph.D.,

CO-ADVISOR: PROF. VORASUK SHOTELERSUK, M.D., 75 pp.

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive metabolic disease caused by a deficiency of lysosomal alpha-L-iduronidase (IDUA) resulting in an accumulation of partially degraded glycosaminoglycans inside lysosomes. We described two Thai patients with clinical features consistent with MPS I and performed biochemical and mutation analysis. An assay for IDUA activity was carried out in leukocyte extracts using 4-methylumbelliferyl-alpha-L-iduronidase as a substrate. The IDUA activity in a patient with MPS I was less than that of the unaffected controls. Mutation analysis by PCR-sequencing of the entire coding region of the *IDUA* gene revealed two different potential pathogenic mutations, c.252insC and c.826G>A (p.E276K). The c.252insC found in our patient with Hurler syndrome has been identified in patients with similar phenotype. The p.E276K mutation has never been previously described. We further explored its functional property in cells transiently transfected with the p.E276K construct. The p.E276K exhibited a significant reduction of alpha-L-iduronidase activity compared to that of the wild-type IDUA suggesting it as a disease-causing mutation. This study has further expanded the genotypic spectrum of *IDUA* as well as emphasized an important role of biochemical and molecular testings for definite diagnosis and genetic counseling.

Field of Study : Medical Sciences Student's Signature : Korrakot Prommajan

Academic Year : 2008 Advisor's Signature :

Co-Advisor's Signature : Vorasuk Shotelersuk

ACKNOWLEDGEMENTS

I really would like to express my gratitude to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indepted to my advisor, Asst. Prof. Kanya Suphapeetiporn for her help, interest, suggest and encouragements help me all the time I have worked on this thesis. Special respect and thanks are also extended to Professor Vorasuk Shotelersuk, for his valuable suggestions and guidance as Co-Asvisor. I also greatly express my heartfelt thanks to other committee members, Professor Apiwat Mutirangura and Assoc. Prof. Duangrurdee Wattanasirichaigoon for their helpful suggestion and corrections during my study.

Special thanks also go to all of the patients and the families for participation in this study

I am also grateful to Miss Siraprapa Thongkorbpetch, Miss Petcharat Leoyklang and all the members in our laboratory for their help and support from the beginning of my laboratory practice. Moreover, they asked me good questions, rescued me from various crises, encouraged me to do my thesis, gave insightful comments and reviewed my work all the time.

Finally, gratitude thanks to my dear parents for their loves and understandings to have brought me today's success.

This study was supported by the Research Unit Grant from Chulalongkorn University, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,
and the Thailand Research Fund.

CONTENTS

Page

Abstract(Thai)..... IV

Abstract(English) V

Acknowledgments..... VI

Contents..... VII

List of Tables..... XI

List of Figures..... XII

List of Abbreviations..... XIII

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. Review of Related Literatures..... 8

1. The mucopolysacchridoses..... 8

2. Discovery of mucopolysaccharidosis type I..... 8

3. Clinical classification..... 9

Chapter Page

4. Incidence and inheritance..... 11
5. Etiology and molecular genetics of MPS I..... 11
5.1 Alpha-L-iduronidase structure..... 11
5.1.1 Catalytic mechanism..... 12
5.2 Enzymatic and molecular diagnosis..... 13
6. Genotype-phenotype correlations..... 15
7. Genetic counseling..... 16
7.1 Carrier detection..... 16
7.2 Prenatal diagnosis..... 17
7.2.1 Molecular genetic testing..... 17
7.2.2 Biochemical genetic testing..... 17
7.2.3 Preimplantation genetic diagnosis..... 17
III. Materials and Methods..... 19
1. Research Instruments..... 19
2. Reagents..... 20
3. Experimental Procedure..... 23
3.1 Subjects and sample collection..... 23
3.1.1 Blood collection..... 23
3.1.2 Subjects..... 23
3.1.3 Controls..... 23
3.2 Genetic analysis..... 23
3.2.1 DNA extraction..... 23
3.2.1.1 Calculation of DNA concentration..... 24
3.2.2 RNA extraction..... 24
3.2.3 DNA amplification by Polymerase Chain Reaction..... 26
3.2.3.1 Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction..... 26
3.2.3.2 Polymerase Chain Reaction..... 29
3.2.4 Direct sequencing..... 31

3.2.5 Agarose gel electrophoresis..... 31
3.3 Enzyme assay..... 32
3.3.1 White blood cell extraction..... 32
3.3.2 Determining the protein concentrations by Bradford protein assay. 32
3.4 Functional analysis..... 33
3.4.1 Construction of plasmids..... 33
3.4.1.1Construction of mammalian expression vectors.. 33
3.4.1.2 Preparation of an empty vector..... 34
3.4.1.2.1 Procedure of gel extraction..... 34
3.4.1.2.2 Procedure of DNA ligation..... 35
3.4.2 Amplification of the expression vectors for transfection experiment..... 35
3.4.2.1 Preparation of competent cells..... 35
3.4.2.2 Transformation..... 36
3.4.2.3 Plasmid DNA extraction..... 36
3.4.2.4 DNA digestion..... 37
3.4.2.4.1 Restriction enzyme digestion with *EcoR*I... 37
3.4.2.5 DNA precipitation..... 38
3.4.3 Mutant strand synthesis..... 38
3.4.3.1 Mutant strand synthesis reaction 38
3.4.3.1.1 Primer Design Guidelines..... 38
3.4.3.2 *Dpn*I digestion of the amplification products..... 41
3.4.3.3 Transformation of competent cells..... 41
3.4.4 Transfection assay..... 42
3.4.4.1 Plating cells..... 42
3.4.4.2 Transfection..... 43
3.4.4.3 Prepare the cells for enzyme assay..... 44
3.4.5 Determining alpha-L-iduronidase activity by fluorimetric assay..... 44

3.4.6 Calculation of enzyme activity..... 46
3.4.7 Restriction enzymes digestion..... 46
3.4.7.1 Restriction enzyme digestion with *Mbo*II..... 47
3.4.8 The protein sequence is aligned with the ClustalX program..... 47
3.4.8.1 Open ClustalX program version 2.0.11..... 47
3.4.8.2 Read in the FASTA-formatted sequences..... 47
3.4.8.3 Modify the output format option..... 48
3.4.8.4 Create an alignment..... 49
3.4.8.5 The image above shows the main features of the ClustalX..... 49
3.4.8.6 Creating the input file for multiple sequence alignment..... 50
IV. Results..... 52
1. *IDUA* gene analysis..... 52
1.1 Mutation analysis of mRNA..... 52
1.2 Mutation analysis of gDNA..... 52
2. Confirmation of the novel mutant allele..... 55
2.1 Amino acid change..... 55
2.2 Multiple protein sequence alignment of IDUA 56
2.3 Restriction enzyme digestion with *Mbo*II..... 56
3. Alpha-L-iduronidase activity assay in leukocytes..... 57
4. Functional analysis of mutant *IDUA*..... 58
V. Discussion and conclusion..... 60
References..... 62
Appendices..... 67
Appendix A Buffers and reagent..... 68
Appendix B Glossary..... 73
Biography..... 75

LIST OF TABLE

Table		Page
1	Alpha-L-iduronidase activity values for Control and Patients.....	14
2	The primers used in RT-PCR.....	27
3	Mixture of RT-PCR.....	28
4	PCR conditions of cDNA amplification.....	28
5	Primers sequences for *IDUA* mutation analysis.....	29
6	Mixture of PCR reactions.....	30
7	PCR cycle and conditions.....	31
8	Oligonucleotide primers for Quikchange site-directed mutagenesis of the *IDUA* cDNA.....	40
9	Mixture of PCR reactions for site directed mutagenesis.....	40
10	PCR cycle for site directed mutagenesis.....	40
11	Mixture of transfection reaction for an assay of alpha-L-iduronidase activity.....	43
12	Mixture of enzyme assay.....	45
13	Clinical and molecular features of patient with MPS I.....	53
14	The Primers and restriction enzymes.....	56
15	Alpha-L-iduronidase activity in leukocytes of an MPS I patient.....	57
16	alpha-L-iduronidase activity in COS-7 cells transiently transfected with either wide-type or mutant cDNAs.....	58

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Schematic representation of the structures of heparan sulfates and dermatan sulfates	10
2	C-α traces overlaid for the IDUA homology model and the crystal structure of the XyTS used as the basis for the homology model	12
3	Ribbon representation of the IDUA model	13
4	pEFNeo-IDUA expression vector	33
5	Show a window when starting the ClustalX program	47
6	Display show protein sequences when pull down the File-menu and load sequence	48
7	"Output format options" from the menu alignment	48
8	"Do complete alignment" from the menu Alignment	49
9	Overview the main features of the ClustalX program	50
10	RT-PCR amplification of the IDUA gene	52
11	Clinical features of patients 1 with Hurler syndrome	53
12	Clinical features of patients 2 with Scheie syndrome	53
13	Mutation analysis. An electropherograms of the patient with Hurler syndrome	54
14	Mutation analysis. An electropherograms of the patient with Scheie syndrome	55
15	Structure of the glutamic acid and lysine	55
16	The IDUA protein sequence comparison	56
17	Restriction enzyme digestion analysis	57
18	IDUA activity in COS-7 cells transiently transfected with different constructs	59
19	An electropherogram of the patient with Scheie syndrome showing some heterozygous variants	60

LIST OF ABBREVIATIONS

IDUA	=	Alpha-L-iduronidase
MPS I	=	Mucopolysaccharidosis type I
4MU-IDUA	=	4-methylumbelliferyl-alpha-L-iduronide
WBC	=	White blood cell