การหากลไกการทำให้เกิดมีโสเมลิคดิสเพลเชียแบบกันตบุตร

นายธันยภัทร วณิชชานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-5257-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 22438178

DETERMINATION OF THE MECHANISM CAUSING MESOMELIC DYSPLASIA, KANTPAPUTRA TYPE

Mr. Thanyapat Wanitchanon

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 2005

ISBN 974-17-5257-1

481815

Thesis Title	DETERMINATION OF THE MECHANISM CAUSING MESOMELIC DYSPLASIA KANTAPUTRA TYPE (MDK)
By	Mr. Thanyapat Wanitchanon
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Associated Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.
Thesis Co-advisor	Verayuth Praphanphoj, M.D.

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

P. Kamolratanakul ..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)

Vorasuk Shotelersuk ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Verayuth Praphanphoj, M.D.)

Montakarn Tansatit ..... Member

(Montakarn Tansatit, M.D.)

ธันยภัทร วณิชชานนท์ : การหากลไกการเกิดมีโสมีลิคดีสเพลเซียแบบกันตบุตร (DETERMINATION OF THE MECHANISM CAUSING MESOMELIC DYSPLASIA, KANTAPUTRA TYPE)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 57 หน้า. ISBN 974-17-5257-1

มีโสเมลิคดีสเพลเซียแบบกันตบุตรคือ skeletal dysplasia ที่มีการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่นชนิดใหม่ ผู้ป่วยมีลักษณะเตี้ยแบบไม่สมส่วน แขนและขาทั้งสองข้างสั้นกว่าปกติ มีการเชื่อมกันของกระดูก carpal และ tarsal และมีการเบี่ยงเบนของเท้า ปัจจุบันนี้มีรายงานของมีโสเมลิคดีสเพลเซียแบบกันตบุตรเพียง 2 ครอบครัวในโลกเท่านั้นโดยครอบครัวแรกพบในประเทศไทยส่วนอีกครอบครัวพบในประเทศฮอลแลนด์ ผลจากการทำ linkage analysis พบว่าตำแหน่งของยีนที่ทำให้เกิดโรคอยู่ในโครโมโซมคู่ที่2 ในช่วง 2q24-q32 การศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของ DNA ในบริเวณที่จะนำไปสังเคราะห์โปรตีนของบางยีนในส่วน 2q31 เช่นยีน *HOXD13* และ *HOXD10* มีผลให้เกิดความผิดปกติในพัฒนาการของแขนและขา นอกจากนี้การกลายพันธุ์ในบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีนสามารถทำให้เกิดลักษณะที่คล้ายคลึงกับมีโสเมลิคดีสเพลเซียแบบกันตบุตรได้เช่นกัน ดังที่ได้เห็นจากหนู *Ulnaless* และจากผู้ป่วยมีโสเมลิคดีสเพลเซียที่รายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งนี่อาจจะบ่งบอกถึงการมีอยู่ของบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เรียกว่า Global control region จากหลักฐานที่ได้จากการศึกษาในมนุษย์และหนูทดลอง ผู้วิจัยจึงได้นำผู้ป่วยมาหาการกลายพันธุ์ของ DNA ในบริเวณที่จะนำไปสังเคราะห์โปรตีน ในยีน *HOXD10*, *HOXD11*, *EVX-2* และ *LNP* ซึ่งอยู่ในบริเวณ 2q31 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *LNP* โดยการใช้วิธี relative quantification มาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *LNP* ระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่เป็นคนปกติเพื่อที่จะดูว่ามีอิทธิพลของการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ผลการทดลองพบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของ DNA ในบริเวณที่จะนำไปสังเคราะห์โปรตีนในทุกยีนที่นำมาศึกษา อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าในผู้ป่วยระดับการแสดงออกของยีน *LNP* นั้นมากกว่าคนปกติถึง 3 เท่า ผู้วิจัยจึงสรุปว่ายีน *LNP* อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคมีโสเมลิคดีสเพลเซียแบบกันตบุตร ผลจากการค้นพบนี้จะนำไปสู่การศึกษาในเชิงลึกเพื่อหากลไกการเกิดมีโสเมลิคดีสเพลเซียแบบกันตบุตรต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

467 47326 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD : MDK / GCR

THANYAPAT WANITCHANON : DETERMINATION OF THE MECHANISM CAUSING MESOMELIC DYSPLASIA, KANTAPUTRA TYPE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. VORASUK SHOTELERSUK, M.D.,57 pp, ISBN 974-17-5257-1

Mesomelic dysplasia, kantaputra type (MDK) is a new type of autosomal dominant skeletal dysplasia. All of patients were characterized by disproportionate dwarfism, bilateral shortening of the forearms/lower-legs, carpal/tarsal synostosis, and dorsolateral foot deviation. To date, only two families of MDK were reported, first in Thai and second in Dutch family. A linkage analysis mapped the MDK to 2q24-q32. However, there was no further study of this disease. Previous studies have shown that mutation in coding region of some genes in 2q31 region, for instance; *HOXD13*, *HOXD10*, caused abnormalities in limb development. Moreover, mutation in regulatory region can also caused phenotype similar to MDK as seen in *Ulnaless* mice and mesomelic dysplasia patients which implied the existence of regulatory region called Global control region (GCR). Based on evidences from human and mouse model, we screened the mutation in coding region of *HOXD10*, *HOXD11*, *EVX-2* and *LNP* gene, located within 2q31 region, in MDK patients. We also determined a level of *LNP* gene expression by using relative quantification method in a MDK patient compared to normal controls to find the clue for mutation in the regulatory region. Our results showed no mutation in coding regions of candidate genes. However, we found upregulation of *LNP* gene expression in the MDK patient which showed three times higher than normal controls. This could be concluded that *LNP* gene might involve in MDK pathogenesis. This finding could be a clue for extensive study to determine the mechanism causing mesomelic dysplasia, Kantaputra type.

Field of study Medical Science Student's signature.....

Academic year 2005 Advisor's signature.....

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 co-advisor, Dr. Verayuth Pranphanphoj for his help, interest, suggest all the time I have worked on this thesis. I also thanks to other committee members, Assoc. Prof. Dr. Apiwat Mutirangura, Assoc. Prof. Dr. Vorasuk Shotelersuk and Dr. Montakarn Tunsathit for their helpful suggestion and corrections during my study.

I am so greatful to my colleagues, Miss Sukanya Meesa and Mr. Chalurmphol Srichomthong for their helps. I would like to thank Miss Rootjanat Manisi and Miss Mattana Maungklom who give me an encouragement. I would like to thank Mr. Wichai Pornthanakasem for his suggestions.

Finally, I would like to thank my parents for their love, optimistic suggestions and belief in me which brought me today's success.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)....iv

Abstract (English)....v

ACKNOWLEDGEMENTS....vi

TABLE OF CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....viii

LIST OF FIGURES....ix

LIST OF ABBREVIATION....x

CHAPTER I INTRODUCTION....1

1.1 Background and Rationale....1

1.2 Research Questions....3

1.3 Objectives....3

1.4 Hypothesis....3

1.5 Conceptual Framework....4

1.6 Methodologies....5

1.7 Limitation....6

1.8 Expected Benefit....6

CHAPTER II REVIEW OF RELATED LITERATURES....7

2.1 The Limb Development....7

2.2 Mesomelic Dysplasia, Kantaputra Type....9

2.3 The Studies of MDK....13

2.4 Limb Malformation and the Human *HOX* Gene....15

2.5 Mutations in the Other Type of Mesomelic Dysplasia....15

2.6 The Clues for MDK....16

2.7 The Candidate Genes.... 9

Page

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....23
3.1 Research Instruments.....23
3.2 Reagents.....25
3.3 Subject and Sample Collection.....27
3.4 DNA Extraction.....27
3.5 Conventional PCR.....28
3.6 RNA Extraction.....34
3.7 DNase-I Treatment.....35
3.8 Reverse Transcription.....37
3.9 RT-PCR.....39
3.10 Quantitative Real-time RT-PCR.....40
3.11 Agarose Gel Electrophoresis.....41

CHAPTER IV RESULTS.....42
4.1 Mutation Screening.....42
4.2 RT-PCR.....42
4.3 Realtime RT-PCR.....43

CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION.....47

REFERENCES.....50

APPENDIX.....53

BIBLIOGRAPHY.....54

LIST OF TABLE

Table Page

1. Candidate genes and primer sets for PCR.....29

2. Reaction components for conventional PCR.....33

3. Reaction components for GC-rich PCR.....33

4. PCR Condition.....34

5. Genes, primer sets and probes for quantitative real-time PCR.....36

6. Components for RNA-Primer combination and denaturation.....37

7. Components for reverse transcription.....38

8. Components for RT-PCR.....39

9. RT-PCR condition.....39

10. Probe-primer mixture preparation.....40

11. Multiplexed-PCR component.....40

12. Multiplexed PCR condition.....41

13. The details of *LNP* quantitation.....44

14. The details of *GAPDH* quantion.....45

15. The details of relative quantification.....46

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Pedigree of a Thai family	10
2.	MDK patients	10
3.	Arm radiographs	11
4.	Foot and ankle radiographs	12
5.	Tip toe standing and ballerina-like standing	12
6.	Fibula prominences	13
7.	The forelimb phenotype of double homozygous mutant mice	17
8.	The forelimb and hindlimb phenotypes of *Ulnaless* mice	17
9.	A balanced-paracentric inversion in *Ulnaless* mice	18
10.	The orientation of candidate genes within 2q31 region	20
11.	The TA repeat found in 3'UTR of *HOXD10* gene	42
12.	Conventional and multiplexed PCR	43
13.	The quantitation graph of *LNP* gene	44
14.	The quantitation graph of *GAPDH* gene	45
15.	The relative differences in case and control samples	46

LIST OF ABBREVIATIONS

AER	=	Apical ectodermal ridge
ELCR	=	Early limb control region
GCR	=	Global control region
MDK	=	Mesomelic dysplasia, Kantaputra type
RT-PCR	=	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
ZPA	=	Zone of polarizing activity