

การหาลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ขาดสองข้างของเซนโตรเมียบนโครโมโซมเอ็กซ์ที่หมุน
กลับในผู้ป่วยไฮโปไฮโดรติกเอกโตเดอรัมอลติสเฟลเซียที่มีภาวะปัญญาอ่อน



นางมนตกานต์ ตันสถิตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2463-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE PERICENTRIC INVERSION
BREAKPOINTS ON X CHROMOSOME IN A HYPOHIDROTIC ECTODERMAL
DYSPLASIA PATIENT WITH MENTAL RETARDATION

Mrs. Montakarn Tansatit

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences

(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2463-9

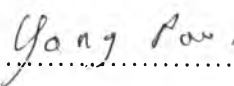
481937


Thesis Title Molecular Characterization of the Pericentric Inversion
 Breakpoints on X Chromosome in a Hypohidrotic
 Ectodermal Dysplasia Patient with Mental Retardation
By Mrs. Montakarn Tansatit
Field of Study Biomedical Sciences
Thesis Advisor Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.
Thesis Co-advisor Verayuth Praphanphoj, M.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

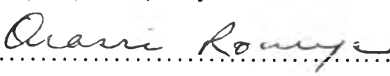
 Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

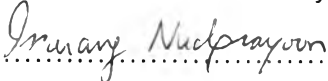
THESIS COMMITTEE

 Chairman
(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

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

 Thesis Co-advisor
(Verayuth praphanphoj, M.D.)

 Member
(Assistant Professor Orasri Romyanan, M.D.)

 Member
(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)

มนตกานต์ ต้นสถิตย์: การหาลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ขาดสองข้างของเซนโตรเมียบนโครโมโซมเอ็กซ์ที่เกิดการหมุนกลับในผู้ป่วยไฮโปไฮโดรติกเอกโตเดอรั่มอลดิสเพลเซียที่มีภาวะปัญญาอ่อน (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE PERICENTRIC INVERSION BREAKPOINTS ON X CHROMOSOME IN A HYPOHIDROTIC ECTODERMAL DYSPLASIA PATIENT WITH MENTAL RETARDATION) อ.ที่ปรึกษา: ศ.นพ. อภิวัฒน์ มุทิตางกูร, อ.ที่ปรึกษาร่วม: นพ. วีรยุทธ ประพันธ์พจน์, 92 หน้า. ISBN 974-53-2463-9

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาตำแหน่งที่ขาดบนโครโมโซมเอ็กซ์ที่เกิดการหมุนกลับของผู้ป่วยไฮโปไฮโดรติกเอกโตเดอรั่มอลดิสเพลเซียที่มีภาวะปัญญาอ่อน เพื่ออธิบายลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมเอ็กซ์แบบนี้เป็นสาเหตุของภาวะปัญญาอ่อนในผู้ป่วยหรือไม่ และทำให้ผู้ป่วยมีลักษณะอาการแสดงของไฮโปไฮโดรติกเอกโตเดอรั่มอลดิสเพลเซียได้อย่างไร

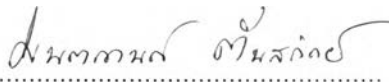
วิธีการวิจัย ศึกษาเมตาเฟสโครโมโซมของผู้ป่วยโดยใช้ปฏิกิริยาไฮบริโดเซชันซึ่งใช้ probe ที่เตรียมจาก BAC clones และตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากแต่ละ probe เพื่อกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนของตำแหน่งที่ขาดบนโครโมโซมเอ็กซ์ที่เกิดการหมุนกลับ และเพื่อดูความเกี่ยวข้องของตำแหน่งที่ขาดกับยีนที่ก่อให้เกิดภาวะปัญญาอ่อนที่อยู่ใกล้เคียง ใช้ปฏิกิริยาโพลีเมอเรสเซนในการศึกษาดีเอ็นเอของผู้ป่วยเพื่อหาขอบเขตโดยละเอียดของจุดขาด และใช้ปฏิกิริยาเรียลไทม์โพลีเมอเรสเซนในการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนที่อยู่ใกล้เคียงจุดขาดจากอาร์เอ็นเอของผู้ป่วย

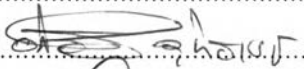
ผลการวิจัย ผลการศึกษาตำแหน่งโดยละเอียดของจุดขาดพบว่าจุดขาดบนแขนยาวอยู่ในยีน *EDA* ที่ intron 3 และจุดขาดทั้งสองตำแหน่งอยู่ใน repetitive sequences ผลการศึกษาความเกี่ยวข้องของจุดขาดบนแขนสั้นกับยีนที่ก่อให้เกิดภาวะปัญญาอ่อนอื่นในบริเวณใกล้เคียงพบว่าจุดขาดนั้นไม่ได้อยู่ในยีน และไม่ได้มีผลเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่อยู่ใกล้เคียง

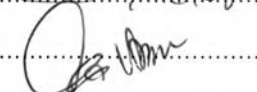
สรุปผลการวิจัย ตำแหน่งที่ขาดบนโครโมโซมเอ็กซ์ที่เกิดการหมุนกลับ ทำให้ยีน *EDA* ขาด เป็นสาเหตุของอาการแสดงของโรคไฮโปไฮโดรติกเอกโตเดอรั่มอลดิสเพลเซียในผู้ป่วย แต่ไม่ได้ตัดยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับภาวะปัญญาอ่อน และไม่ได้เปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนในบริเวณใกล้เคียง ภาวะปัญญาอ่อนของผู้ป่วยรายนี้จึงไม่น่าจะมาจากความผิดปกติของโครโมโซม

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

##458 96714 20: MAJOR BIOMEDICAL SCIENCES

KEY WORDS: ECTODERMAL DYSPLASIA / X CHROMOSOME INVERSION / MENTAL RETARDATION

MONTAKARN TANSATIT: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE PERICENTRIC INVERSION BREAKPOINTS ON X CHROMOSOME IN A HYPOHIDROTIC ECTODERMAL DYSPLASIA PATIENT WITH MENTAL RETARDATION. THESIS ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: VERAYUTH PRAPHANPHOJ, M.D., 92 pp. ISBN 974-53-2463-9

Objectives: To characterize both X inversion breakpoints in a hypohidrotic ectodermal dysplasia patient with mental retardation in order to explain whether the Xp breakpoint can cause mental retardation and how the genotype, chromosomal inversion, causes the phenotype hypohidrotic ectodermal dysplasia.

Materials and methods: Fluorescence *in situ* hybridization using BAC clones as probes was performed to determine precise breakpoints and to exclude the involvement of previously identified X-linked mental retardation genes. Polymerase chain reaction was used to further refine the breakpoints. Real-time polymerase chain reaction was carried out to quantitate gene expression.

Results: FISH analysis documented that the Xp breakpoint did not disrupt any known X-linked mental retardation genes. The PCR results suggested that both breakpoints located within the repetitive sequences, with the Xq13 inversion breakpoint localized in the intron 3 of the *EDA* gene. Analysis of the transcripts of *FAM51A1* gene flanking the breakpoint at Xp22.2 revealed that the inversion did not alter the expression of the gene.

Conclusion: The inversion breakpoints on X chromosome disrupted the *EDA* gene which resulted in the clinical phenotypes of ectodermal dysplasia in this patient but did not disrupt any X-linked mental retardation genes and did not alter the expression of the nearby gene. The results suggested that mental retardation in this patient might not be caused by chromosome rearrangement.

Field of study: Biomedical sciences (Inter-Department)

Academic year: 2005

Student's signature *Montakorn Tansatit*

Advisor's signature *Apiwat Mutirangura*

Co-advisor's signature *Verayuth Praphanphoj*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep and sincere gratitude to my advisor, Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D., Head of the Molecular Biology and Genetics of Cancer Development Research Unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his detailed and constructive comments, and for his important support throughout this work. His wide knowledge and his logical way of thinking have been of great value for me. His understanding, encouraging and personal guidance have provided a good basis for the present thesis.

I am deeply grateful to my co-advisor, Dr. Verayuth Praphanphoj, M.D., Head of the Center for Medical Genetics Research, Rajanukul Institute, Ministry of Public Health, whose help, stimulating suggestions and encouragement helped me in all the time of research.

I owe my most sincere gratitude to Assistant Professor Orasri Romyanan, M.D. and Dr. Valairat Dhamcharee, M.D., who introduced me to the field of cytogenetics and gave me important guidance during my first steps into chromosome studies. Their ideals and concepts have had a remarkable influence on my entire career in the field of molecular cytogenetics research. Their kind support and guidance have been of great value in this study.

I wish to express my warm and sincere thanks to Dr. Ilse Chudoba, Ph.D., for her valuable advice and friendly help. Her extensive discussions around my work and her constructive suggestions in multicolor FISH experiments have been very helpful for this study.

I am really very grateful to Mr. Virachai Polsiri, for attracting me to Germany, and for his interesting discussions on the FISH analysis and applications. He also gave me untiring help during my difficult moments.

During this work, I have collaborated with many colleagues for whom I have great regards, and I wish to extend my warmest thanks to all those who have helped me with my work. My sincere thanks are due to Ms. Narisorn Kongruttanachok, Ms. Walaiwan Kongnak, Ms. Nussara Huapai, Mr. Chalurmporn Srichomthong and Mr. Wichai Pornthanakasem for all their help, support, interest and valuable hints.

I owe my loving thanks to my husband Tanvaa and my daughter Supornpat Tansatit. Without their encouragement and understanding it would have been impossible for me to finish this work. My special gratitude is due to my father and my mother for their loving support. They all let me own a happy family.

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
 CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
A. Introduction to Ectodermal Dysplasia.....	1
B. Introduction to Mental Retardation.....	10
1.1. Background and Rationale.....	10
1.2. Research Questions.....	12
1.3. Objectives.....	12
1.4. Hypothesis.....	13
1.5. Conceptual Framework.....	13
1.6. Key Words.....	15
1.7. Operational Definitions.....	15
1.8. Benefit of the Study.....	15
II REVIEW OF THE RELATED LITERATURES.....	17
III FISH APPLICATIONS IN CYTOGENETICS.....	22

CHAPTER	Page
IV RESEARCH METHODOLOGY.....	37
3.1 Target Population.....	37
3.2 Materials.....	37
3.3 Methods.....	37
V RESULTS.....	40
VI DISCUSSION AND CONCLUSION.....	58
REFERENCES.....	60
APPENDICES.....	67
BIOGRAPHY.....	92

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Sequences of Primers on BAC Clone RP11-351K23.....	46
2.	Sequences of Primers on BAC Clone RP11-804N7.....	54

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.	The G banding karyotype of the patient..... 16
2.	The inversion X chromosome of the patient and his mother..... 16
3.	Mapping of non-syndromic mental retardation genes..... 21
4.	The MRX genes in the region of interest on Xp22.2..... 43
5.	FISH results of the patient's mother..... 44
6.	Mapping of ED1 gene (exon 4-9) on BAC clone RP11-351K23.... 44
7.	The diagram illustrates the sequence on BAC clone RP11-351K23 which were amplified by PCR..... 45
8.	Long PCR results on BAC RP11-351K23..... 45
9.	Mapping of the primers and PCR results on BAC clone RP11-351K23..... 49
10.	The position of L1PA2 in BAC clone RP11-351K23..... 50
11.	The PCR results using primer EXLF8/EXLR8.3..... 51
12.	The position of L1PA7 in BAC clone RP11-804N7..... 52
13.	The position of primer EXLF8 and EXLR8.2 on BAC clone RP11-804N7..... 53
14.	Mapping of the primers and PCR results on BAC clone RP11-804N7..... 56
15.	Map viewer of the BAC clone spanning breakpoint on Xp22.2.... 57

LIST OF ABBREVIATIONS

HED	=	Hypohidrotic ectodermel dysplasia
MR	=	Mental reatardation
XLMR	=	X-linked mental retardation
XMRs	=	Syndromic X-linked mental retardation
MRX	=	Non-syndromic X-linked mental retardation
FISH	=	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
BAC	=	Bacterial artificial chromosome
PCR	=	Polymerase chain reaction
RT-PCR	=	Reverse-transcription polymerase chain reaction
Xp	=	Short arm of the X chromosome
Xq	=	Long arm of the X chromosome
inv(X)	=	X chromosome inversion
FAM51A1	=	family with sequence similarity 51, member A1
chr	=	Chromosome
bp	=	Base pair
Kb	=	Kilobase