

การตรวจสอบการกลายพันธุ์และการทำหน้าที่ของยีน *thyroid hormone receptor  $\beta$*   
ในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรค resistance to thyroid hormone



นางสาวสาหร่าย พงศ์จันทร์เสถียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF  
THE *THYROID HORMONE RECEPTOR  $\beta$*  GENE IN THAI FAMILIES WITH  
RESISTANCE TO THYROID HORMONE

Miss Sarai Pongjantarasatian

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 2008  
Copyright of Chulalongkorn University

512223



สาขาวิชา พงศ์พันธุศาสตร์ : การตรวจสอบการกลายพันธุ์และการทำหน้าที่ของยีน *thyroid hormone receptor  $\beta$*  ในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรค resistance to thyroid hormone (MUTATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *THYROID HORMONE RECEPTOR  $\beta$*  GENE IN THAI FAMILIES WITH RESISTANCE TO THYROID HORMONE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.พญ. ดร.กัญญา ศุภปิติพร, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 104 หน้า.

โรคอาร์ทีเอชเป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในลักษณะเด่นเป็นภาวะที่ทำให้การตอบสนองของเนื้อเยื่อเป้าหมายต่างๆ ที่มีต่อไทรอยด์ฮอร์โมนลดลง ผู้ป่วยที่เป็นโรคอาร์ทีเอชพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นของไทรอยด์ฮอร์โมน ในขณะที่ปริมาณของ thyroid stimulating hormone (TSH) ในซีรัมอยู่ในระดับปกติหรืออาจมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและมีคอไตร่วมด้วย การกลายพันธุ์ของยีนที่อาร์เบต้าซึ่งมีหน้าที่สร้างตัวรับไทรอยด์ฮอร์โมน เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาร์ทีเอช โดยการกลายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่จะส่งผลทำให้ตัวรับไทรอยด์ฮอร์โมน มีความสามารถในการจับไทรอยด์ฮอร์โมนลดลงหรือสูญเสียความสามารถในการจับกับโปรตีน cofactor ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยไทรอยด์ฮอร์โมน นอกจากนี้ ที่อาร์เบต้าที่ทำหน้าที่ผิดปกตินี้สามารถที่จะไปรบกวนการทำงานของที่อาร์เบต้าที่ปกติได้ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ เรียกว่า dominant negative effect (DNE) ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้รายงานการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคอาร์ทีเอช โดยพบที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสไป 1 อัลลิลในบริเวณ exon 9 ของยีนที่อาร์เบต้าส่งผลให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากเมไทโอนีนไปเป็นทรีโอนีนที่ตำแหน่ง 313 (p.M313T) การกลายพันธุ์นี้พบเฉพาะในผู้ป่วย (*de novo*) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้ได้มีรายงานการกลายพันธุ์มาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยกลุ่มประชากรอื่น แต่ยังไม่ได้ทำการศึกษาถึงการกลายพันธุ์ว่าสามารถทำให้เกิดโรค RTH ได้จริง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง p.M313T มาศึกษาถึงผลของการกลายพันธุ์ต่อการทำงานของนที่อาร์เบต้า ร่วมกับ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นอีก 5 แบบ (I276L, I280S, L330S, G344A, M442T) ซึ่งมีการรายงานมาก่อนแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของการกลายพันธุ์ โดยใช้ luciferase reporter system ทำหน้าที่เป็นตัวรายงานผลของการทำงานของที่อาร์เบต้าดังกล่าว จากการทดสอบการทำงานพบว่า การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ (ยกเว้นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง I276L และ G344A) มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ที่นำมาศึกษาในการทดลองครั้งนี้สามารถยับยั้งการทำงานของที่อาร์เบต้าที่ปกติได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไทรอยด์ฮอร์โมนที่  $10^{-7}M$  จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า กลไกการเกิด dominant negative effect เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เกิดโรค RTH

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อผู้นิสิต กนกชัช พงศ์พันธุศาสตร์  
ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก So Anisorn  
ลายมือชื่ออ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Dr. Anisorn

## 497 47902 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS: RESISTANCE TO THYROID HORMONE / THYROID HORMONE RECEPTOR / THYROID RESPONSE ELEMENT / FREE THYROXINE / FREE TRIIODOTHYRONINE/ THYROID STIMULATING HORMONE

SARAI PONGJANTARASATIAN: MUTATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE *THYROID HORMONE RECEPTOR*  $\beta$  GENE IN THAI FAMILIES WITH RESISTANCE TO THYROID HORMONE.

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

CO-ADVISOR: PROF. VORASUK SHOTELERSUK, M.D., 104 pp.

Resistance to thyroid hormones (RTH) is an autosomal dominant inherited syndrome characterized by a variable degree of reduced tissue sensitivity to thyroid hormone (TH) resulting in elevated serum TH levels, inappropriately normal or elevated serum thyroid stimulating hormone (TSH) levels, and a goiter. It is caused by mutations in the *thyroid hormone receptor (TR)*  $\beta$  gene. Most mutations resulted in either a decreased T<sub>3</sub> binding activity or impaired interaction with one of the cofactors involved in the mediation of TH action. In addition, the mutant TR $\beta$  molecules interfere with the function of the normal TR $\beta$ , a phenomenon called dominant negative effect (DNE). We described a *de novo* mutation in a Thai patient with RTH who had a heterozygous missense mutation in exon 9 of the *TR* $\beta$  gene, resulting in a methionine to threonine substitution at codon 313 (p.M313T). This mutation has been previously reported in other populations but never been investigated for its functional significance. We further explored functional properties of this *de novo* mutant *TR* $\beta$  and compared with other uncharacterized known mutations (I276L, I280S, L330S, G344A, M442T) by using the luciferase reporter gene assay. All except the I276L and G344A had a significant impairment of T<sub>3</sub>-dependent transactivation activity. In addition, all exhibited a dominant negative effect in the presence of 10<sup>-7</sup> M of T<sub>3</sub>. These findings provide a strong support that interfering with the T<sub>3</sub>-mediated transcriptional activation of the wild-type TR $\beta$  is a major mechanism causing RTH.

Field of Study: Medical Science  
Academic Year: 2008

Student's Signature..... Sarai Pongjantarasion  
Advisor's Signature..... Kanya Suphapeetiporn  
Co-Advisor's Signature..... Vorasuk Shotelersuk

## ACKNOWLEDGEMENTS

I really would like to express my gratitude to all people who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indebted to my advisor, Asst. Prof. Kanya Suphapeetiporn for her help, interest, advice and encouragement during my work on this thesis. Special respect and thanks are also extended to Prof. Vorasuk Shotelersuk, for his valuable suggestion and guidance as a co-advisor. I also would like to express my heartfelt thanks to other committee members, Prof. Apiwat Mutirangura and Asst. Prof. Wallaya Jongjaroenprasert for their helpful suggestion and correction during my study.

Special thanks also go to all of the patients and families for participation in this study, Dr. Samuel Refetoff and Dr. Thongkum Sunthornthepvarakul for providing the Palx3-Luc and pcDNA1/Amp-WT TR $\beta$ 1 respectively.

I am also grateful to Miss Rungnapa Hirunsatit, Mr. Chalurmpon Srichomgthong, Miss Siraprapa Thongkorbpetch 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 which have brought me today's success.

This study was supported by the Ratchadapiseksompoch Fund, Faculty of Medicine, the Ratchadapiseksomphot Endowment Fund and the Research Unit Fund, Chulalongkorn University.

# CONTENTS

	Page
<b>Abstract (Thai)</b> .....	iv
<b>Abstract (English)</b> .....	v
<b>Acknowledgments</b> .....	vi
<b>Contents</b> .....	vii
<b>List of Tables</b> .....	x
<b>List of Figures</b> .....	xi
<b>List of Abbreviations</b> .....	xiii
<b>Chapter</b>	
<b>I. Introduction</b>	1
Background and Rationale.....	1
Research Questions.....	2
Objectives.....	2
Hypothesis.....	3
Conceptual Framework.....	3
Assumption.....	4
Key words.....	4
Operational Definition.....	4
Research Design.....	4
Ethical Consideration.....	5
Limitation.....	5
Expected Benefit and Application.....	5
Research Methodology.....	5

	Page
II. Review of Related Literatures.....	7
Resistance to thyroid hormone.....	7
Clinical classification.....	7
Incidence and inheritance.....	8
Etiology and molecular genetics of RTH.....	8
Role of diagnostic procedures in RTH.....	20
III. Materials and Methods.....	21
Research instruments.....	21
Subjects and sample collection.....	25
Genetic analysis.....	28
DNA extraction.....	28
DNA amplification.....	29
Agarose gel electrophoresis and DNA sequencing.....	30
Functional analysis.....	31
Construction of plasmids.....	31
Amplification of expression vectors for transfection experiment.....	33
Mutant strand synthesis.....	37
Transfection assay.....	40
IV. Results.....	52
Sequence analysis in the TR $\beta$ gene.....	52
Functional analysis of mutant TR $\beta$ 1s.....	53



	Page
T <sub>3</sub> -dependent transactivation activity.....	53
Dominant negative effect.....	56
V. Discussion and Conclusion.....	58
<b>References</b> .....	<b>62</b>
<b>Appendices</b> .....	<b>67</b>
<b>Biography</b> .....	<b>104</b>

## LIST OF TABLE

Table	Page
1 The clinical manifestation of RTH and its frequency.....	1
2 Differential diagnosis of conditions associated with an elevated FT <sub>4</sub> with non-suppressed TSH and associated free thyroid hormone levels.....	20
3 Primer sequences and PCR products.....	29
4 Mixture of PCR reactions.....	30
5 PCR cycle and condition.....	30
6 Mixture of DNA digestion reactions for plasmid detection.....	36
7 Mutagenesis primer sequences for site directed mutagenesis by using PCR.....	38
8 Mixture of PCR reactions for site directed mutagenesis.....	38
9 PCR cycle for site directed mutagenesis.....	39
10 Mixture of transfection reaction for T <sub>3</sub> -dependent transcriptional activity.....	42
11 Dilute LF <sup>TM</sup> 2000 in OptimemI-Reduced Serum Medium without Serum for T <sub>3</sub> -dependent transcriptional activity.....	42
12 Mixture of transfection reaction for dominant negative activity testing.....	45
13 Dilute LF <sup>TM</sup> 2000 in OptimemI-Reduced Serum Medium without Serum for dominant negative activity testing.....	45
14 Thyroid function tests of a Thai patient and a Japanese patient with a similar mutation in the <i>TRβ1</i> gene.....	52
15 Summary of thyroid function test abnormalities in syndromes of reduced sensitivity to TH.....	60

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Structure of the human <i>TRβ</i> gene.....	9
2 The thyroid hormone receptor (TR) structure.....	11
3 Schematic representation of the elements involved in the mediation of thyroid hormone action through the regulation of target (T <sub>3</sub> -responsive) gene expression.....	12
4 Schematic drawing of the two zinc fingers of human TRβ and the various subregions within the DNA-binding domains.....	13
5 Schematic drawing represents the dimerization forms of TRs in TREs.....	13
6 TH receptor-mediated transcriptional silencing and activation.....	15
7 Model for molecular mechanisms of thyroid hormone receptor action.....	16
8 The hot spot regions in the ligand-binding domain of TRβ.....	17
9 Clinical and genetic observations in the RTH families: evidence for the pathogenic mechanism of RTH.....	18
10 Models for mechanisms of dominant negative activity by mutant TRs.....	19
11 Pedigree and results of thyroid function tests in six families .....	27
12 Strategy of sequencing of the <i>TRβ</i> coding areas .....	29
13 pcDNA1/Amp-TRβ1 construction.....	31
14 TREpal x3-Luc construction.....	32
15 Circle maps of the pRL-TK and pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/myc-His B.....	33
16 Structures of the mtTRs used in this study.....	37

Figure	Page
17 Schematic diagram for measuring the transcriptional activity and dominant negative effect in COS-7 cells using luciferase reporter assays.....	51
18 Mutation analysis.....	52
19 Structure of <i>TRβ1</i> isoform.....	53
20 Firefly and Renilla luciferase activities in testing of $T_3$ -dependent transactivation.....	54
21 $T_3$ -dependent transactivation of the Palx3-Luc reporter in COS-7 cells transfected with different constructs.....	55
22 Firefly and Renilla luciferase activities in testing of dominant negative effect in each culture with $10^{-7}M T_3$ .....	56
23 Dominant negative effect of the mutant <i>TRβ1</i> s.....	57
24 Schematic drawing represents defects in thyroid hormone action.....	59

**LIST OF ABBREVIATIONS**

RTH	=	Resistance to Thyroid Hormone
TR	=	Thyroid Hormone Receptor
TRE	=	Thyroid Response Element
TH	=	Thyroid hormone
FT <sub>4</sub>	=	Free thyroxine
FT <sub>3</sub>	=	Free triiodothyronine
TSH	=	Thyroid Stimulating Hormone
DNE	=	Dominant negative effect