23 JUN 2003

PCR-MINIGEL SSCP ANALYSES OF THE EXONS ENCODING THE LIGAND BINDING DOMAIN OF LDLR GENE

KWANDAO KERDSAENG

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2003

ISBN 974-04-2889-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
K98p
2003
c.2

Copyright by Mahidol University

PCR-MINI GEL SSCP ANALYSES OF THE EXONS ENCODING THE LIGAND BINDING DOMAIN OF LDLR GENE

KWANDAO KERDSAENG 4237741 SIBC/M

M.Sc. (BIOCHEMITRY)
THESIS ADVISOR : KLAI-UPSORN PONGRAPEEPORN, Ph.D. SOMPONG ONG-AJYOOTH, M.Sc. WATTANA LEOWATTANA, M.D.

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is one of the major risk factors for Coronary Artery Disease (CAD). Both hereditary and environmental factors lead to a wide variation in concentrations of LDL-C in the general populations. One form of primary hypercholesterolemia is caused by mutations in the LDL receptor (LDLR) gene. A mutation in the LDLR gene causes an inherited primary hypercholesterolemia namely Famililal hypercholesterolemia (FH). Such mutation results in impaired clearance of plasma LDL and accumulation of LDL-C in bloodstream for a long time. At present, more than 920 mutations have been identified worldwide. In our previous study, a number of putative mutations and/or polymorphisms of LDLR gene have been found in Thai subjects with primary hypercholesterolemia by PCR-CFLP and PCR-large gel SSCP (30cmx40cmx0.04cm). In this study, mutations and polymorphisms in the LDL receptor gene has been screened further by PCR-SSCP technique. The conventional PCR-SSCP, used previously in this laboratory, is large gel format. It is labor intensive, time consuming, expensive, cumbersome and inconvenient. In this study, the mini gel (10x7.3x0.075 cm) SSCP technique have been devised to replace for the large gel SSCP format. PCR-minigel-SSCP analysis has become a simple and sensitive screening method for identification of DNA polymorphisms and mutations in LDL receptor gene prior to DNA sequencing. The SSCP patterns were detected by silver staining to avoid the exposure of the radioactive material and from the hazardous from ethidium bromide staining and UV irradiation. All gel data were wrapped by cellophane, air dried and collected. The result of the minigel SSCP have demonstrated that this strategy can detect conformation polymorphisms in PCR-fragments with a comparative sensitivity to large gel SSCP. Six abnormal SSCP patterns were detected in this study, two from exon 3, one from exon 5, one from exon 6 and two from exon 17. To accelerate the screening procedure, we have tried PCR-multiplex SSCP in gradient minigel. Three strategies of the multiplex assay have been tried. By these strategies, multiple exons of the LDLR gene have been analysed simultaneously in gradient minigel-SSCP. Simultaneous analysis of exons 3,16 and 17 at the LDLR gene locus, using the multiplex SSCP gel, revealed mobility shifts in exon 3 in two DNA samples, previously detected by minigel SSCP analysis. The multiplex assay of exons 5,16 and 17 revealed no different SSCP patterns. For the multiplex assay of exons 2, 6, 15 and 18, a mobility different of exon 6, previously detected by minigel SSCP analysis, was apparent on the gradient SSCP gel. The multiplex assay should be useful for routine mutation screening. It is expected to be versatile and readily adaptable for clinical diagnostic laboratory. The mobility differences were later characterized by automated DNA sequencing. Same splicing mutations i.e., 313+1(G>T) were found in exon 3 in two hypercholesterolemic subjects. This mutation in exon 3 is due to a heterozygous transversion at the 5' donor splice site, IVS3+1(G>T). This mutation is already available in a database (http://www.umd.necker.fr/LDLR). Some other type of change in exon 17 at the 5'donor splicing site was also observed. First, there is, a heterozygous T to A transversion at the nucleotide IVS17+2(T>A) hypercholesterolemic subject. Second, there is a heterozygous A to T transversion at the nucleotide IVS17+4(A>T) in the same hypercholesterolemic subject. These changes have never been reported. Further analyses at the mRNA and protein levels as well as family study are necessary to identify the pathogenicity of these genetic alterations.

KEY WORDS ; LOW DENSITY LIPOPROTEIN / SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISMS / MUTATION

212 P. ISBN 974-04-2889-4

Copyright by Mahidol University

การใช้ MINI GEL SSCP ในการตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายและการกลายพันธุ์ใน EXONS ที่เป็นรหัสของ LIGAND BINDING DOMAIN ในยีน LDL RECEPTOR (PCR-MINIGEL SSCP ANALYSES OF THE EXONS ENCODING THE LIGAND BINDING DOMAIN OF LDLR GENE)

ขวัญดาว เกิดแสง 4237741 SIBC / M
วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : คล้ายอับสร พงศ์รพีพร, Ph.D., สมพงษ์ องอาจยุทธ, MS.c.,
วัฒนา เลี้ยววัฒนา, พบ.

บทคัดย่อ

สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันเกิดจากการที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง สาเหตุหนึ่งของการเพิ่มขึ้นของLDL-โคเลสเตอรอลเกิดจากการที่มีกลายพันธุ์ในยีน LDL receptor (LDLR) ซึ่งเป็นโรคพันธุกรรมที่เรียกว่าFamilial Hypercholesterolemia (FH) ความผิดปกตินี้มีผลทำให้การสลายของ LDL โคเลสตอรอลในกระแสเลือดลดลง LDL- cholesterol ที่ค้างอยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานาน อาจถูก oxidized และ LDLR ไม่สามารถรับเข้าสู่ cell มีผลทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดซึ่งเป็นอาการที่นำไปสู่โรคหัวใจ (CAD)ในที่สุด การศึกษานี้ ใช้วิธี PCR-SSCP ตรวจหาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีน LDL receptor ในคนไทยที่มีภาวะโคเลสเตอรอลสูงในเลือดแบบปฐมภูมิ (n=46) ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าการใช้เทคนิค PCR-SSCP และ PCR-CFLP เพื่อตรวจหากลายพันธุ์สามารถตรวจพบการกลายพันธ์จำนวนหนึ่งใน exons 4, 9 และ 13 ของยีน LDL receptor แต่เนื่องจากยีนนี้มีขนาดใหญ่และประกอบไปด้วย 18 exons วิธีการตรวจค้นโดย PCR-SSCP โดยใช้ gel ขนาดใหญ่ค่อนข้างยุ่งยาก จำเป็นต้องใช้พื้นที่ที่เหมาะสม อีกทั้งยังสิ้นเปลืองสารเคมีและกระแสไฟฟ้า (ต้องใช้ไฟฟ้าถึง 1000 โวลต์) การศึกษานี้จึงได้ทดลองพัฒนา PCR-mini gel SSCP แทน gel ขนาดใหญ่ ทำให้สามารถประหยัด เวลา, แรงงาน, และสารเคมีได้ ถึง ประมาณ 10 เท่า และ gel สามารถเก็บไว้ได้โดยใช้วิธีหุ้มด้วยกระดาษเซโลเฟน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำให้ gel แห้ง PCR-minigel SSCP ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหากลายพันธุ์ในจำนวนตัวอย่าง DNA 46 ราย สามารถพบ แถบของการกลายพันธุ์ 6 patterns ต่างไปจากคนปกติที่ใช้อ้างอิง โดย 2 patterns พบใน exon 3, และพบอีกอย่างละ 1 pattern พบใน exon 5, exon 6 และ exon 17 เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพ, ประหยัดเงิน, ลดระยะเวลาและแรงงาน เราได้พัฒนาเทคนิค Multiplex-SSCP เพื่อนำมาใช้ในการตรวจค้นให้เร็วยิ่งขึ้นและ จากวิธี multiplex-SSCP เราสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ ได้ในคราวเดียวกัน 3- 4 exons โดยในการ multiplex ของ exons 3, 5 และ 17 สามารถ ตรวจพบ แถบของการกลายพันธ์ได้ใน exon 3 จำนวน 2 ราย ซึ่งเคยตรวจพบแล้ว โดยใช้เทคนิค PCR-minigel SSCP และ สามารถตรวจพบแถบของการกลายพันธุ์ ได้ 1 รายใน exon6 โดยใช้วิธี multiplex SSCP ของ exons 2,6,15 และ 18 ส่วน multiplex ของ exon 5,16 และ17 ยังตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ จากนั้นได้ศึกษาลำดับเบสบนสาย DNA ที่ตรวจพบแถบของการกลายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค automated DNA sequencing พบว่า มีการแทนที่ของเบสจาก G เป็น T ที่ตำแหน่ง IVS 3+1 (G>T) การกลายพันธุ์นี้มีรายงานแล้วว่าทำให้เกิดโรค FH ใน exon 17 พบว่า มีการแทนที่ของเบสจาก T เป็น A ที่ตำแหน่ง 5'donor splice site คือ IVS 17+2 (T>A) และ มีเบสเปลี่ยนในตำแหน่งถัดจาก splice site คือ IVS 17+4 (A>T) การเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่ง IVS 17+2 (T>A) และ IVS17+4(A>T) ในผู้ป่วย 1 ราย การเปลี่ยนแปลงนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดในบริเวณ Conserved region ซึ่งสำคัญสำหรับ mRNA processing ดังนั้นจึงอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ก่อให้เกิดโรค FH ได้ การศึกษาในระดับ mRNA และ โปรตีน รวมทั้ง การติดตามดูการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงของนียนี้ในครอบครัวผู้ป่วยจะช่วยยืนยันว่าผู้ป่วยมีภาวะโคเลสเตอรอลสูงในเลือด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้หรือไม่

212 หน้า ISBN 974-04-2889-4

Copyright by Mahidol University