9 JAN 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

MULTIPLEX SSCP ANALYSES OF EGF PRECURSOR HOMOLOGY DOMAIN OF LDL RECEPTOR GENE

LAMPOON KASEMSUK

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
MAHIDOL UNIVERSITY
2002**

ISBN 974-04-2442-2
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
L238m
2002
c. 2

Copyright by Mahidol University

4238006 SIBC/M : MAJOR: BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : LOW DENSITY LIPOPROTEIN/ POLYMERASE CHAIN REACTION / SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISMS/ MUTATIONS/ MULTIPLEX

LAMPOON KASEMSUK: MULTIPLEX SSCP ANALYSES OF EGF PRECURSOR HOMOLOGY DOMAIN OF LDL RECEPTOR GENE. THESIS ADVISORS: KLAI-UPSORN PONGRAPEEPORN, Ph.D. SOMPONG ONG-AJYOOTH, M.Sc. WATTANA LEOWATTANA, M.D. 193 p. ISBN 974-04-2442-2.

Hypercholesterolemia has been recognized as a major risk factor of atherosclerosis and coronary artery disease. The elevation in plasma low density lipoprotein (LDL) cholesterol is frequently due to genetic alteration at the genetic locus specifying the LDL receptor, leading to defective catabolism of LDL. A mutation in this gene cause the autosomal dominant disorder namely familial hypercholesterolemia (FH). Mutations in the LDL receptor gene are very heterogenous at the DNA level. So far, 920 mutations have been described. The identification of the specific mutations causing inherited disease is the framework for the development of DNA based technique for screening relatives. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis has proven to be a simple and effective technique for the detection of single base substitutions. However, the original SSCP protocol is generally large formatted, which is both time and reagents consuming as well as cumbersome. In this study, mini-gel SSCP has been devised for replacement of the large formatted gel, using silver staining for visualization. In order to reduce cost, time and labor, multiplex assays on gradient mini-gel SSCP analysis were also developed. In this study, the exons encoding the EGF precursor homology domain were screened for mutations and polymorphisms by the developed techniques. Abnormal SSCP patterns were detected in exons 7, 11, 12, and 13. Eight abnormal SSCP patterns (one unique, two identical and five identical) were seen in exon 12. Five DNA samples revealed an identical abnormal SSCP pattern in exon 13. Subsequently, these abnormal SSCP patterns were characterized by automated DNA sequencing. A novel polymorphism was found in exon 7. This is due to a heterozygous C to T transition at nucleotide 1029. Another novel polymorphism and novel mutation was found in exon 11. These are due to heterozygous C to T transitions at nucleotide 1617 and 1661, respectively. The novel mutation causes a serine substitution with leucine at position 554. This nucleotide change results in a substitution of uncharge polar R group serine (TCG) for nonpolar R group leucine (TTG), note S554L. A heterozygous mutation was also found in exon 12. This is due to a G to T transversion at nucleotide 1788. This novel mutation causes a lysine substitution with asparagine at position 596. This nucleotide change results in a substitution of basic R group lysine (AAG) for uncharge R group asparagine (AAT), note K596N. These missense mutations, i.e., S554L and K596N, do not create any restriction site. These amino acid residues belong to the fourth repeat of YWTD repeats of EGF precursor homology domain. The proposed structural and functional consequence of the mutation have been analyzed by amino acid sequence alignment indicating that the mutations are a non-conservative substitution in a conservative region, i.e., sequence YWTD repeat. Such amino acid substitutions probably affect the structure and function of protein. Another abnormal patterns in exon 12, as characterized by DNA sequencing, turns out to be a common polymorphism, namely *Hinc*II polymorphism. This is due to a T to C transition at nucleotide 1773. This common polymorphism does not change amino acid at position 591. The five identical abnormal SSCP patterns in exon 13, as characterized by DNA sequencing, turns out to be a common polymorphism, namely *Ava*II polymorphism. This is due to a T to C transition at nucleotide 1959. This common polymorphism does not change amino acid at position 653.

Copyright by Mahidol University

4238006 SIBC/M: สาขาวิชา: ชีวเคมี; วท.ม. (ชีวเคมี)

ลำพูน เกษมสุข: การศึกษาความหลากหลายและการกลายพันธุ์ ใน EGF PRECURSOR HOMOLOGY DOMAIN ของยีน LDL RECEPTOR โดยวิธี MULTIPLEX SSCP ANALYSES (MULTIPLEX SSCP ANALYSES OF EGF PRECURSOR HOMOLOGY DOMAIN OF LDL RECEPTOR GENE). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร, Ph.D., สมพงษ์ องอาจยุทธ, M.Sc., วัฒนา เลี้ยววัฒนา พบ. 193 หน้า. ISBN 974-04-2442-2.

ภาวะโคเลสเตอรอลสูงในเลือด เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน การเพิ่มขึ้นของระดับ แอลดีแอลโคเลสเตอรอลในเลือดส่วนหนึ่งมักเกิดมาจาก ความผิดปกติของยีน LDL receptor ซึ่งมีผลทำให้การสลาย แอลดีแอลผิดปกติ และตั้งค้างอยู่ในกระแสเลือด การกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดโรคพันธุกรรมที่เรียกว่า Familial hypercholesterolemia การศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน LDL receptor พบว่ามีความหลากหลายในระดับโมเลกุลกว่า 920 ชนิด ในการศึกษานี้ ได้ค้นหาความหลากหลายและการกลายพันธุ์ของยีน LDL receptor ด้วยวิธี PCR-SSCP อย่างไรก็ตาม SSCP ต้นแบบนั้นจะใช้ gel ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเปลืองทั้งเวลา, สารเคมี และ ยุ่งยาก ดังนั้น จึงมีการพัฒนา mini-gel SSCP ขึ้นมาเพื่อเพิ่มความเร็ว, ประหยัดเวลาและแรงงาน ในการตรวจค้นและได้พัฒนา multiplex gradient mini-gel SSCP ขึ้นมาด้วยเพื่อเพิ่มความไว ด้วยเทคนิคดังกล่าวได้ตรวจค้นการกลายพันธุ์ในบริเวณ EGF precursor homology domain ของยีน LDL receptor ในผู้ป่วยที่มีภาวะโคเลสเตอรอลสูงในเลือดแบบปฐมภูมิ (n=46) พบว่า จำนวนตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วยจำนวน 15 ราย มีแบบแผนของแถบพันธุกรรม (6 patterns) ต่างไปจากคนปกติที่ใช้อ้างอิง โดย 1 pattern พบใน exon 7, 1 pattern พบใน exon 11, 3 patterns พบใน exon 12 (1 pattern พบ 1 ราย, อีก 1 pattern พบ 5 ราย และ อีก 1 pattern พบ 2 ราย) และ exon 13 พบ pattern แบบเดียวกันแต่ต่างจากของคนอื่นจำนวน 5 ราย จากนั้นได้มีการศึกษาลำดับ เบสบน DNA โดยใช้เทคนิค automated DNA sequencing พบว่า exon 7 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก C ไปเป็น T ใน allele 1 ข้างที่ตำแหน่ง 1029 ซึ่งพบว่าเป็น polymorphism ในระดับ DNA แบบใหม่, ใน exon 11 พบว่าการเปลี่ยนแปลงเบสจาก C ไปเป็น T ใน allele 1 ข้างที่ตำแหน่ง 1617 และ 1661 ซึ่งในตำแหน่ง 1617 พบว่าเป็น polymorphism ในระดับ DNA แบบใหม่ ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 1661 พบว่ามีผลทำให้กรดอะมิโนเซอรีน (TCG) ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนลิวซีน (TTG) หรือ S554L, ซึ่งการกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนที่มีขั้วไปเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว, ใน exon 12 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G ไปเป็น T ที่ตำแหน่ง 1788 ซึ่งพบว่าทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโน ไลซีน (AAG) ด้วยกรดอะมิโนแอสปาราจีน (AAT) หรือ K596N, การกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก ไปเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ จากการทำ amino acid alignment พบว่า การกลายพันธุ์ดังกล่าวเหล่านี้เกิดขึ้นบนตำแหน่งที่เป็น conserved region ในยีนของสิ่งมีชีวิต 5 species ซึ่งแสดงว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสำคัญมาก การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จึงอาจส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนได้ ใน exon 12 แถบพันธุกรรมที่ต่างไปอีก 2 แบบที่พบในผู้ป่วย 5 ราย และ 2 ราย พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก T ไปเป็น C ที่ตำแหน่ง 1773 ในอัลลีล 1 ข้าง (heterozygote) และ 2 ข้าง (homozygote) ตามลำดับซึ่งทำให้เกิด common polymorphism *Hin*cII, และใน exon 13 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก T ไปเป็น C ที่ตำแหน่ง 1959 ซึ่งทำให้เกิด common polymorphism *Ava*II.

Copyright by Mahidol University