



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์กลูโคเซโรโบรซิเดส
ที่กลายพันธุ์

Functional and cellular analyses of mutant glucocerebrosidase

โดย อาจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ และคณะ

พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์กลูโคเซเรโบรซิเดส
ที่กลายพันธุ์

ผู้วิจัย

1. อาจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ
2. ศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์
3. นางสาว ศิริประภา ทองกอบเพชร

สังกัด

- ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
ภาควิชาภูมิมาตรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
ภาควิชาภูมิมาตรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

Project Code: MRG5180024

Project title (ภาษาไทย) การศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์
กลูโคเซโรโบรซิเดสที่กลายพันธุ์
(ภาษาอังกฤษ) Functional and cellular analyses of mutant glucocerebrosidase

Investigator : อาจารย์ ดร.รัชณีกร ธรรมโชติ
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : rachpunyas@gmail.com

Project Period : 2 ปี (พฤษภาคม 2551-เมษายน 2553)

Abstract:

Gaucher disease (GD; MIM 230800), the most common lysosomal storage disorder, is caused by mutations in the glucocerebrosidase gene (*GBA*, MIM 606463), and subsequent deficiency of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. Recently, mutations in Thai patients were identified by our group and others. Two of them are novel: a missense (1204T>C, Y363H) and a termination codon mutation (1609T>C, X498A), which is the first termination codon mutation identified in this gene and expected to result in 15 extra amino acids. To elucidate the molecular pathogenesis of Gaucher disease caused by the X498A mutation, we performed a functional study using *GBA* clones mimicking the patient mutation. From protein expression analysis by western blotting, the X498A mutant did not completely inhibit but lower the protein expression. Sub-cellular localization demonstrated that unlike the wildtype protein, which mostly localizes to lysosome, the majority of the X498A protein localizes to the ER, similar to the N370S, a known ER-localized mutant. The result suggested that the X498A mutant might be mis-folded and sequestered in the ER by the cell surveillance system. Taken together, the main pathogenicity of the X498A mutant is the mis-localization and reduced protein expression.

Keywords: Gaucher disease, mutation, functional study

บทคัดย่อ

โรคโกเช (Gaucher disease, GD, MIM 230800) เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเก็บสารในไลโซโซม โรคโกเชเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนกลูโคเซโรโบรซิเดส (GBA, MIM 606463) ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติของเอนไซม์กลูโคเซโรโบรซิเดส ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำงานในไลโซโซม กลุ่มวิจัยได้ค้นพบการกลายพันธุ์ในยีนนี้ในผู้ป่วยชาวไทย ซึ่งพบมีการกลายพันธุ์แบบใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน 2 ชนิด ได้แก่ การกลายพันธุ์แบบมิสเซนส์ (1204T>C, Y363H) และแบบที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนหยุด (1609T>C, X498A) ซึ่งเป็นการค้นพบการกลายพันธุ์ ณ โคดอนหยุดเป็นครั้งแรกในยีนนี้ และคาดว่าจะทำให้โปรตีนมีขนาดยาวขึ้น 15 กรดอะมิโน เพื่อจะศึกษาพยากรณ์ทางโมเลกุลของโรคโกเชที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ X498A นี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการทำงานของโปรตีนนี้โดยการโคลนยีน GBA และทำให้เกิดการกลายพันธุ์เหมือนกับที่พบในผู้ป่วย ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากการทำเวสเทิร์นบลอต พบว่ายีนที่กลายพันธุ์นี้ยังมีการแสดงออกของโปรตีนอยู่ แต่มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเทียบกับยีนปกติ ส่วนการศึกษาตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีนนี้ พบว่าขณะที่โปรตีนปกติส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่ที่ไลโซโซม โปรตีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ X498A มีตำแหน่งอยู่ที่ ER ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับโปรตีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ N370S ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทราบว่า มีตำแหน่งอยู่ที่ ER ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่โปรตีนแบบ X498A อาจมีการม้วนตัวที่ผิดปกติ และถูกเก็บไว้ใน ER โดยระบบการตรวจสอบของเซลล์ จากผลทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าพยากรณ์หลักของการกลายพันธุ์ชนิด X498A คือการที่โปรตีนอยู่ผิดตำแหน่งภายในเซลล์ และการทำให้โปรตีนแสดงออกลดลง

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์
 กลูโคเซเรโบรซิเดสที่กลายพันธุ์
 (ภาษาอังกฤษ) Functional and cellular analyses of mutant glucocerebrosidase

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
 หัวหน้าโครงการ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ
 หน่วยงาน ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10300
 ที่อยู่ (บ้าน) 65 สุขุมวิท 19 วัฒนา กรุงเทพฯ 10110
 โทรศัพท์ 02-2185485-86 โทรสาร 02-2528979
 โทรศัพท์มือถือ 089-6943235 e-mail Rachpunyas@gmail.com

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย
 Molecular Biology, Cell Biology, Genetics

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

Gaucher disease (GD; MIM 230800), the most common lysosomal storage disorder, is caused by mutation in the glucocerebrosidase gene (GBA, MIM 606463), and subsequent deficiency of lysosomal enzyme glucocerebrosidase. Gaucher disease is categorized into three main subtypes distinguished by the absence or presence and severity of neurologic complications: Type 1 non-neuronopathic, Type 2 acute neuronopathic, and Type 3 subacute neuronopathic. Current treatment options include repeated infusions of modified acid glucosidase. However, the product is extremely expensive (in the range of millions of Baht per patient annually, lifelong). Another option is bone marrow transplantation, which may cure the disease but carries a mortality risk.

A significant genetic heterogeneity was identified in GD patients of different ethnicity. Nearly 200 mutations have been identified throughout the gene, and are likely to explain the wide phenotypic variation of the disease. Recently, novel mutations in Thai patients were identified by our group and others. In addition to the obvious reduction in enzymatic activity, it is possible that some missense mutations identified in *GBA* result in protein misfolding, which leads to ER retention and enzyme mis-localization. Therefore, chemical chaperone therapy is a promising therapeutic strategy of GD, as it assists the protein proper folding and rescues the protein from proteasomic degradation. Although there have been a few studies on the enzyme catalytic activity, none have been done on misfolding (ER retention, degradation, and sub-cellular localization) of glucocerebrosidase in Asian patients. This present study aims to better understand etiologic role of these mutations, which may help select a better treatment option.

Two of the novel mutations in Thai families identified by our group are a missense (1204T>C, Y363H) and a termination codon mutation (1609T>C, X498A). X498A is the first termination codon mutation identified in this gene and expected to result in 15 extra amino acids. However, their molecular pathogenesis is still unknown. This present study aims to better understand the molecular basis and the pathogenesis of the termination codon mutation, along with other mutations found in Thai patients.

7. วัตถุประสงค์

To determine sub-cellular localization and protein level of a novel mutant glucocerebrosidase found in a Thai patient with Gaucher Disease. This information will give us a better understanding in etiologic role of these mutations, which may lead to an evidence-based treatment option.

8. ระเบียบวิธีวิจัย

1. Generation of cell lines expressing wildtype and mutant glucocerebrosidase
2. Analysis of glucocerebrosidase level
 - Immunoblotting with an antibody to glucocerebrosidase
3. Analysis of glucocerebrosidase sub-cellular localization
 - Glucocerebrosidase localization was monitored by immunofluorescence staining in cells transfected with wildtype and mutant *GBA* clones. Localization to the lysosome and ER was traced with organelle-specific antibodies.

9. ผลการทดลองโดยสรุป

Our functional analysis suggested that the novel stop-codon mutation reduces the protein expression and the sub-cellular localization of the glucocerebrosidase protein, which is likely the main pathogenicity of this mutation.

สัญญาเลขที่ MRG5180024

โครงการ: การศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์กลูโคเซโรโบรซิเดสที่กลายพันธุ์

ชื่อโครงการ: การศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์กลูโคเซโรโบรซิเดสที่กลายพันธุ์

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (15 พฤษภาคม 2551 - 15 พฤษภาคม 2553)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน: อาจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

Introduction

Gaucher disease (GD; MIM 230800), an autosomal recessive lysosomal storage disorder, is caused by a deficiency of lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GC), which is responsible for the hydrolysis of glucocerebroside. The enzyme deficiency results in the accumulation of glucosylceramide within lysosomes. Gaucher disease is categorized into three main subtypes depending on the absence or presence and severity of neurologic complications: Type 1 non-neuronopathic, Type 2 acute neuronopathic, and Type 3 subacute neuronopathic.

All three forms of GD are caused by mutation in the glucocerebrosidase gene (*GBA*, MIM 606463). *GBA*, containing 11 exons and located on chromosome 1q21, has a highly homologous pseudogene (*GBAP*, MIM 606463) located on the same chromosome¹. A significant genetic heterogeneity was identified in GD patients of different ethnicity²⁻⁵ and explains the wide phenotypic variation. While N370S mutation was found to be common among the Ashkenazi Jewish individuals^{2,6}, it has not been found in Japanese⁷. The majority of the mutations identified in Chinese patients were rare in other populations³. This information suggested ethnic-specific character of the *GBA* mutations. The presence of the pseudogene further complicates the mutation analysis, as it creates recombinant alleles resulting from cross-over or gene conversion events between *GBA* and *GBAP*. Although recombinant alleles were found in 30% of non-Jewish patients, none were found in any of the Ashkenazi counterpart⁵.

To elucidate the disease molecular pathogenesis, a number of functional studies using *GBA* clones mimicking patient mutations were generated. The expressed mutant proteins were analyzed for their enzyme catalytic properties, stability, inhibitor binding, and activator response properties. Most of the mutations caused reduction in the enzymatic activity, supporting that GD is

caused by glucocerebrosidase deficiency⁸. In addition to the reduced enzymatic activity, *GBA* missense mutations may result in protein misfolding. Similar to other lysosomal enzymes, glucocerebrosidase is synthesized and folded in the endoplasmic reticulum (ER), and then trafficked to the lysosome, where it functions⁹. It is possible that some missense mutations identified in *GBA* result in protein misfolding, which leads to ER retention and enzyme mis-localization¹⁰.

To date, four mutant alleles have been reported in Thai patients including two novel splice site mutations, IVS6-1G>C and IVS9-3C>G¹¹. Recently, our group has identified 10 mutant alleles in five Thai families with GD¹². Two of them are novel: a missense (1204T>C, Y363H) and a termination codon mutation (1609T>C, X498A), which is the first termination codon mutation identified in this gene and expected to result in 15 extra amino acids. However, molecular pathogenesis of these two mutations is still unknown.

Objective

To elucidate the Gaucher disease molecular pathogenesis caused by a termination codon mutation (1609T>C, X498A) by a functional study using *GBA* clones mimicking the patient mutation. This information will give us a better understanding in etiologic role of these mutations, which may lead to an evidence-based treatment option.

Material and method

***GBA* plasmids generation**

The entire coding region of *GBA* gene was cloned from normal human white blood cells. The cloned gene was subsequently inserted into pGEM plasmid by TA cloning. The termination-codon mutant (1609T>C, X498A) and the missense mutant (N370S) mutation, which was used as a positive control for the enzyme mis-localization to the ER, were generated using QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit. Lastly, the wildtype and mutant clones were transferred into pcDNA3.1 expression vector.

Cell culture and transfection

Transformed African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells (COS-7 Line from ATCC) cells were cultured in D-MEM/F-12 (Invitrogen) supplemented with 5% fetal calf serum. For transient

transfection, cells were grown to ~80% confluence and transfected with 5 µg of plasmid DNA/ 1×10^6 cells using Lipofectamine (Invitrogen). Cells were continued to grow for 48 hours prior to all subsequent assays.

Antibodies

Rabbit anti-beta-glucosidase polyclonal Antibody (Santa Cruz, cat. no. sc-32883) was used for western analysis and immunofluorescence analysis. Alexa Flour 488 Donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen, cat. no. A21206), LysoTracker (Invitrogen, cat. no. L7528), anti-calreticulin (Abcam, cat. no. Ab14234) and anti-IgY Texas Red conjugated (Abcam, cat. no. Ab6751) were used for immunofluorescence analysis.

Protein isolation and western blot analysis

Total protein lysates were isolated from cultured cells by sonication of cells in RIPA buffer containing Halt protease inhibitor (Pierce). The lysates were then centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C. Supernatant was collected.

For electrophoresis and western blotting, 8 µg of cell lysates was loaded in each well. Proteins were separated in 8% polyacrylamide gel at 100 volt for 20 minutes and 200 volt for 30 minutes and were transferred into PVDF membranes. The membrane was incubated in blocking solution (1X PBS, 5% milk powder, and 0.05% Tween-20) for 2 h at room temperature, and probed with rabbit anti-beta-glucosidase polyclonal antibody. The membrane was washed three times in 1X PBS and 0.05% Tween-20, incubated in the blocking solution at room temperature for 1 hr and detected with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (Santa Cruz) for 1 hr. The membrane was subsequently washed as above and was detected using the chemiluminescent substrate (Pierce), and exposed to film (Kodak).

Immunofluorescence microscopy

Cells were fixed in either ice-cold methanol for 5 minutes at -20°C or 4% paraformaldehyde (for cells stained with LysoTracker) and were then blocked with 5% BSA and 0.5% Triton-X in PBS for 45 minutes. Cells were incubated in primary antibodies (diluted 1:250 in 1% BSA in PBS) for 1 hr, washed 3 times with PBS, 5 minutes each, and incubated with according secondary antibodies (Molecular Probes) for 1 hour. Cells were mounted with Vectashield containing DAPI (Vector Laboratories).

Results

Protein expression analysis

The effect of the mutation on protein expression was analyzed by western blotting. The results suggested that the X498A mutant still expressed the enzyme glucocerebrosidase (**Figure 1**). It also showed that the X498A mutant protein had a higher molecular weight than that of the wildtype, which is consistent to the prediction that the mutation resulted in 15 extra amino acids.

Interestingly, protein detected from the X498A mutant was much fainter than the wildtype and the other missense mutant (N370S). GAPDH was used as a loading control. Note that the top bands present in all of the lanes may be non-specific.

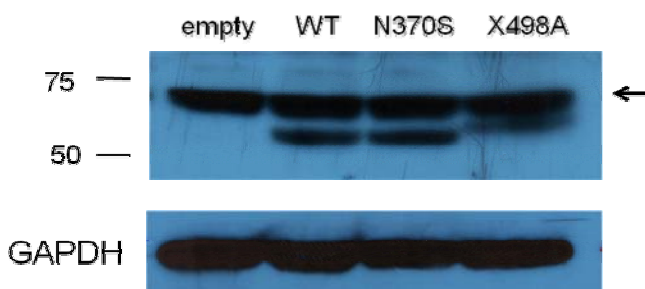


Figure 1. GBA expression analysis. Top panel: Empty = cells transfected with empty vector, WT = cells transfected with wildtype GBA, N370S = cells transfected with N370S mutant, X498A = cells transfected with X498A mutant. Arrow = a non-specific band. Lower panel: GAPDH loading control.

Sub-cellular localization analysis

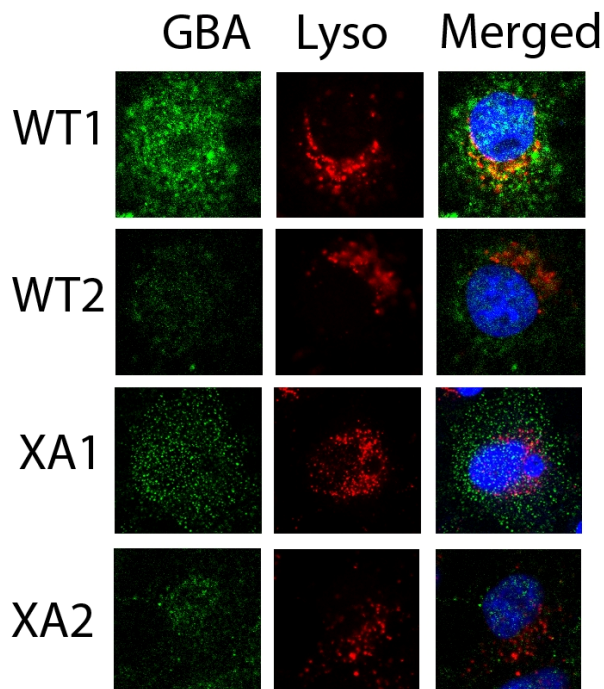


Figure 2. Glucocerebrosidase sub-cellular localization compared with lysosome. The wildtype and the X498A mutant Glucocerebrosidase were analyzed by immunofluorescence analysis to compare their sub-cellular localization with lysosome. Green = glucocerebrosidase, Red = LysoTracker (lysosome), WT = wildtype, XA = X498A.

The protein sub-cellular localizations were analyzed by immuno-fluorescence confocal microscopy. The some of the wildtype protein (green) co-localized with signal from Lysotracker (red), an antibody specific for lysosome, as seen in yellow (Figure 2, WT1 and WT2). Only the minority of signals from the X498A mutant co-localized with Lysotracker (Figure 2, XA1 and XA2).

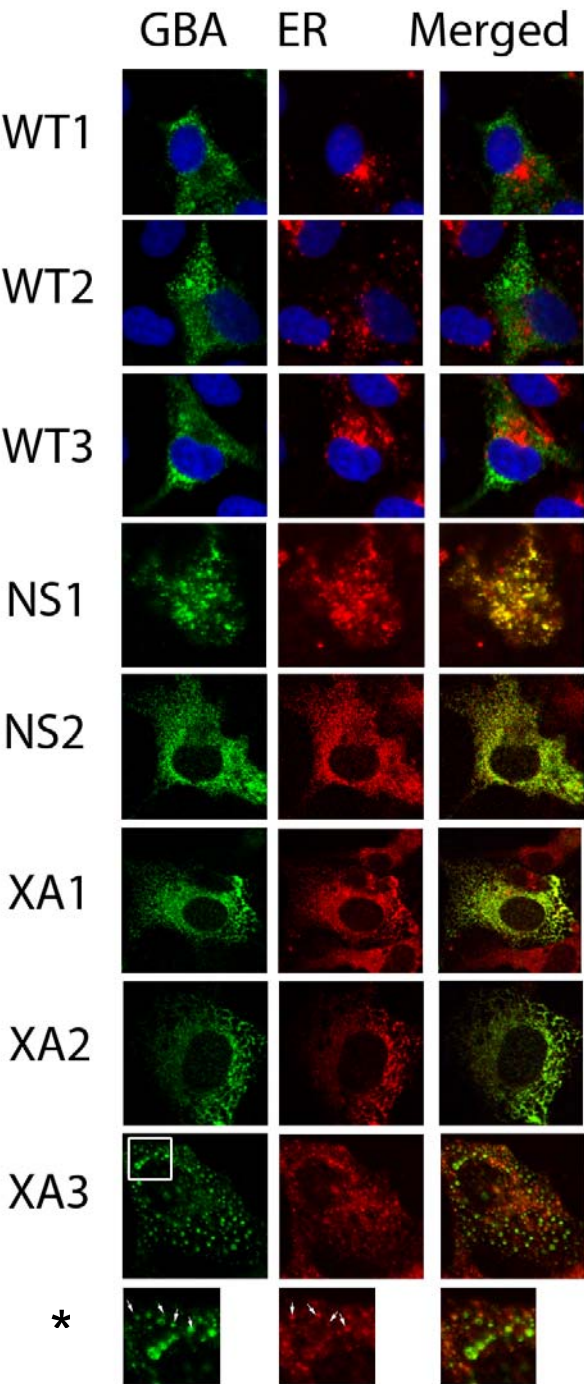


Figure 3. Glucocerebrosidase sub-cellular localization compared with ER. The wildtype, X498A, and N370S mutant glucocerebrosidases were analyzed by immuno-fluorescence analysis to compare their sub-cellular localization with ER.
Green = glucocerebrosidase, Red = Calreticulin (ER),
WT = wildtype, NS = N370S, XA = X498A, * = Enlarged photo of the cropped area from XA3. Arrows = co-

As many of mis-folded proteins are stuck in the endoplasmic reticulum (ER) by the cell surveillance system, we speculated that the X498A protein may be sequestered there. Hence localization analysis compared with calreticulin, an antibody specific to the ER, was performed (Figure 3). Most of the signals from wildtype glucocerebrosidase (green) did not co-localize with signals from the ER (red). The N370S mutant, a known ER-localized glucocerebrosidase, was used as a control. As expected, the N370S completely localized to ER, giving the yellow signals (NS1 and 2). The X498A mostly localized to the ER (XA1, 2, and 3). A closer observation at the enlarged area (*) demonstrated that most of the glucocerebrosidase signals localized to the ER (arrows).

Conclusions and discussion

Stop codon mutations that cause amino acid extension to the normal peptide have been described¹³. While the molecular pathology of the per-mature stop codon mutation has been substantiated, the disease-causing mechanism of the delayed stop codon mutation has not. In this current study, we analyzed effects of the X498A, the first stop codon mutation identified in the *GBA* gene, on the protein product. Our results suggested that the mutation slightly reduced the protein expression and noticeably changed the sub-cellular localization of the glucocerebrosidase protein from the lysosome to the ER.

It has been established that mis-folded proteins are recognized by the ER, where they are sequestered or sent to degradation pathway¹⁴. Similar to other lysosomal enzymes, glucocerebrosidase is synthesized and folded in the ER, and then trafficked to the lysosome, where it functions⁹. It is possible that X498A mutation result in protein misfolding, which leads to ER retention and enzyme mis-localization. It was suggested that the defective intracellular transport of the enzyme from the ER to lysosomes might lead to a more severe clinical phenotype than the residual enzymatic activity may indicate¹⁰. This notion raises the possibility of chemical chaperone therapy, which aims to rescue the enzyme from global misfolding, to preserve its substrate-binding and eventual catalytic activity^{10,15}. It serves as an alternative to the already available enzyme replacement therapy and substrate reduction therapy¹⁶.

Chemical and pharmacological chaperones have been used to correct the protein folding and increase the mutant protein stability. There are *in vitro* study and pre-clinical trials as therapy for diseases caused by protein misfolding¹⁷. In fact, chemical chaperones have been analyzed as a therapeutic strategy for the N370S mutant glucocerebrosidase¹⁸. As the most common lysosomal storage disease, molecular pathogenesis of the disease has been the focus of the pharmaceutical industry. Our study has increased the understanding towards the molecular pathogenesis of Gaucher disease and with anticipation to benefit the patients.

Future directions

In addition to X498A, our group and others^{11,12} have identified a few novel mutations in Thai patients. Several missense mutations were also identified in Asian patients: F213I in Japanese¹⁹, V15L, G46E, and N188S in Korean and Chinese²⁰, L383R and L385P in Chinese²¹. None of these mutations have been functionally analyzed. It is highly possible that in addition to the reduced enzymatic activity, lowered protein expression and mis-localization are the causes of the disease molecular pathology. Using our developed methodology and reagents, these mutations can be rapidly analyzed. Knowledge gained from this information will benefit patients as therapeutic strategies for mis-folded glucocerebrosidase are in progress.

Reference:

- 1 Horowitz, M. et al., The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics* **4** (1), 87 (1989).
- 2 Alfonso, P. et al., Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J Hum Genet* **52** (5), 391 (2007).
- 3 Choy, F. Y. et al., Gaucher disease among Chinese patients: review on genotype/phenotype correlation from 29 patients and identification of novel and rare alleles. *Blood Cells Mol Dis* **38** (3), 287 (2007).
- 4 Erdos, M. et al., Genetic and clinical features of patients with Gaucher disease in Hungary. *Blood Cells Mol Dis* **39** (1), 119 (2007).
- 5 Koprivica, V. et al., Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* **66** (6), 1777 (2000).

- 6 Zimran, A. et al., High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* **49** (4), 855 (1991).
- 7 Eto, Y. and Ida, H., Clinical and molecular characteristics of Japanese Gaucher disease. *Neurochem Res* **24** (2), 207 (1999).
- 8 Berg-Fussman, A., Grace, M. E., Ioannou, Y., and Grabowski, G. A., Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem* **268** (20), 14861 (1993); Liou, B. et al., Analyses of variant acid beta-glucosidases: effects of Gaucher disease mutations. *J Biol Chem* **281** (7), 4242 (2006); Montfort, M., Chabas, A., Vilageliu, L., and Grinberg, D., Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat* **23** (6), 567 (2004).
- 9 Zhao, H. and Grabowski, G. A., Gaucher disease: Perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cell Mol Life Sci* **59** (4), 694 (2002).
- 10 Zimmer, K. P. et al., Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *J Pathol* **188** (4), 407 (1999).
- 11 Suwannarat, P. et al., Molecular characterization of type 3 (neuronopathic) Gaucher disease in Thai patients. *Blood Cells Mol Dis* **39** (3), 348 (2007).
- 12 Phipatthananti, K. et al., A common and three novel GBA mutations in Thai patients with Gaucher disease. *in preparation* (2007).
- 13 Yazaki, M. et al., Renal amyloidosis caused by a novel stop-codon mutation in the apolipoprotein A-II gene. *Kidney Int* **60** (5), 1658 (2001); Gu, L. H. et al., A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *J Invest Dermatol* **121** (3), 482 (2003).
- 14 Malhotra, J. D. and Kaufman, R. J., The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* **18** (6), 716 (2007).
- 15 Morello, J. P., Petaja-Repo, U. E., Bichet, D. G., and Bouvier, M., Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol Sci* **21** (12), 466 (2000); Zheng, W. et al., Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (32), 13192 (2007).

- 16 Jmoudiak, M. and Futerman, A. H., Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. *Br J Haematol* **129** (2), 178 (2005).
- 17 Loo, T. W. and Clarke, D. M., Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Rev Mol Med* **9** (16), 1 (2007); Germain, D. P. and Fan, J. Q., Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. *Int J Clin Pharmacol Ther* **47 Suppl 1**, S111 (2009).
- 18 Sawkar, A. R. et al., Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta - glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (24), 15428 (2002).
- 19 Kawame, H. and Eto, Y., A new glucocerebrosidase-gene missense mutation responsible for neuronopathic Gaucher disease in Japanese patients. *Am J Hum Genet* **49** (6), 1378 (1991).
- 20 Kim, J. W. et al., Gaucher disease: identification of three new mutations in the Korean and Chinese (Taiwanese) populations. *Hum Mutat* **7** (3), 214 (1996).
- 21 Tang, N. L. et al., Novel mutations in type 2 Gaucher disease in Chinese and their functional characterization by heterologous expression. *Hum Mutat* **26** (1), 59 (2005).

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (เอกสารแนบ)

1. Tammachote R, Janklat S, Tongkobpetch S, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V.

Holocarboxylase synthetase deficiency: novel clinical and molecular findings. Clin Genet. 2009 [Epub ahead of print]

2. Tammachote R, Tongkobpetch S, Desudchit T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V.

Prenatal diagnosis of a novel mutation, c.529C>T (p.Q177X), in the *BCKDHA* gene in a family with maple syrup urine disease. J Inherit Metab Dis. 2009 Feb 24. [Epub ahead of print]

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ไม่มี

3. อื่นๆ

1. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- เนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์ ศาสตราจารย์ นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ การวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน *AGXT* แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1 (Functional analysis of a novel *AGXT* mutation, c.32C>G (p.Pro11Arg), in a Thai family with PH1) การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 11 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น กุมภาพันธ์ 2553 เสนอผลงานแบบ oral presentation ได้รางวัลเสนอผลงานดีเด่น (เอกสารแนบ)

2. การสร้างนิติตปริญญาโท จำนวน 1 คน

- นายเนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์ สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาแพทยศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Short Report

Holocarboxylase synthetase deficiency: novel clinical and molecular findings

Tammachote R, Janklat S, Tongkobpetch S, Suphapeetiporn K and Shotelersuk V. Holocarboxylase synthetase deficiency: novel clinical and molecular findings.

Clin Genet 2010. © John Wiley & Sons A/S, 2010

Multiple carboxylase deficiency (MCD) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by defective activity of biotinidase or holocarboxylase synthetase (HLCS) in the biotin cycle. Clinical symptoms include skin lesions and severe metabolic acidosis. Here, we reported four unrelated Thai patients with MCD, diagnosed by urine organic acid analysis. Unlike Caucasians, which biotinidase deficiency has been found to be more common, all of our four Thai patients were affected by HLCS deficiency. Instead of the generally recommended high dose of biotin, our patients were given biotin at 1.2 mg/day. This low-dose biotin significantly improved their clinical symptoms and stabilized the metabolic state on long-term follow-up. Mutation analysis by polymerase chain reaction-sequencing of the entire coding region of the *HLCS* gene revealed the c.1522C>T (p.R508W) mutation in six of the eight mutant alleles. This suggests it as the most common mutation in the Thai population, which paves the way for a rapid and unsophisticated diagnostic method for the ethnic Thai. Haplotype analysis revealed that the c.1522C>T was on three different haplotypes suggesting that it was recurrent, not caused by a founder effect. In addition, a novel mutation, c.1513G>C (p.G505R), was identified, expanding the mutational spectrum of this gene.

**R Tammachote^a, S Janklat^b,
S Tongkobpetch^b,
K Suphapeetiporn^b
and V Shotelersuk^b**

^aDepartment of Botany, Faculty of Science, and ^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Key words: haplotype analysis – *HLCS* – holocarboxylase synthetase deficiency – low-dose biotin – mutations – Thai

Corresponding author: Kanya Suphapeetiporn, MD, PhD, Department of Pediatrics, Sor Kor Building 11th floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand.
Tel.: +66 2 256 4989;
fax: +66 2 256 4911;
e-mail: Kanya.su@chula.ac.th

Received 2 September 2009, revised and accepted for publication 30 November 2009

Multiple carboxylase deficiency (MCD) is a rare autosomal recessive metabolic disease caused by defects of enzymes, either biotinidase (biotinidase deficiency, MIM 253260) or holocarboxylase synthetase (HLCS deficiency, MIM 253270), in the biotin cycle. The clinical presentations include severe metabolic acidosis, feeding and breathing difficulties, hypotonia and lethargy. Some patients have dermatologic signs which are erythematous rashes and hair loss (1). Ten milligrams per day biotin usually improve clinical symptoms (1, 2). Patients with HLCS deficiency usually have the neonatal or early-onset form, while patients with biotinidase deficiency have the juvenile or late-onset form. However, the age of onset and phenotypes are highly variable. Reliable diagnosis of either MCD types therefore requires enzyme activity or genetic analysis.

HLCS (EC 6.3.4.10) catalyzes the biotinylation of biotin-dependent mitochondrial carboxylases. In mammals, there are four carboxylases that require biotinylation: acetyl-CoA carboxylase, pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. These carboxylases are essential for cellular biosynthesis. Therefore, defects in HLCS, which reduce the biotin-dependent enzyme activity, affect several important metabolic processes. HLCS is encoded by an 11-exon gene, *HLCS*, located on chromosome 21q22.1. To date, there are at least 35 mutations reported in *HLCS* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>, accessed August 2009).

Here, we report four Thai patients with MCD. All of them were diagnosed to have HLCS deficiency. Treatment with low dose of biotin was able to significantly improve their clinical

symptoms. In addition, a common mutation was identified in Thai patients and a novel mutation was described.

Materials and methods

Patients

Four patients were referred to King Chulalongkorn Memorial Hospital with skin rashes or coma and severe metabolic acidosis. The age of onset varied from 1 to 9 months. They were diagnosed with MCD by urine organic acid analysis (3) (Fig. 1a and Table 1).

Biotinidase activity assay

The assay was performed on plasma using a colorimetric method. The biotinyl-*p*-aminobenzoate (B-*p*-ABA) was used as a substrate, as described by Pettit et al. (4). Patients' biotinidase activities were compared to those of 245 normal Thai controls.

Mutation analysis

Reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) was performed on white blood cells. Total RNA was isolated using QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Reverse transcription was performed using ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). The entire coding region of *HLCS* was PCR amplified by two primer pairs (Table 2). PCR products were directly sequenced. The mutations found were confirmed on genomic DNA of the patients obtained from whole blood by PCR sequencing.

Restriction fragment length polymorphism analysis

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to confirm mutations on genomic DNA of the patients and to screen for the presence of each mutation in their parents. *HLCS* exons 7 and 8 were amplified and treated with *FoxI* or *HhaI* (New England Biolabs, Beverly, MA),

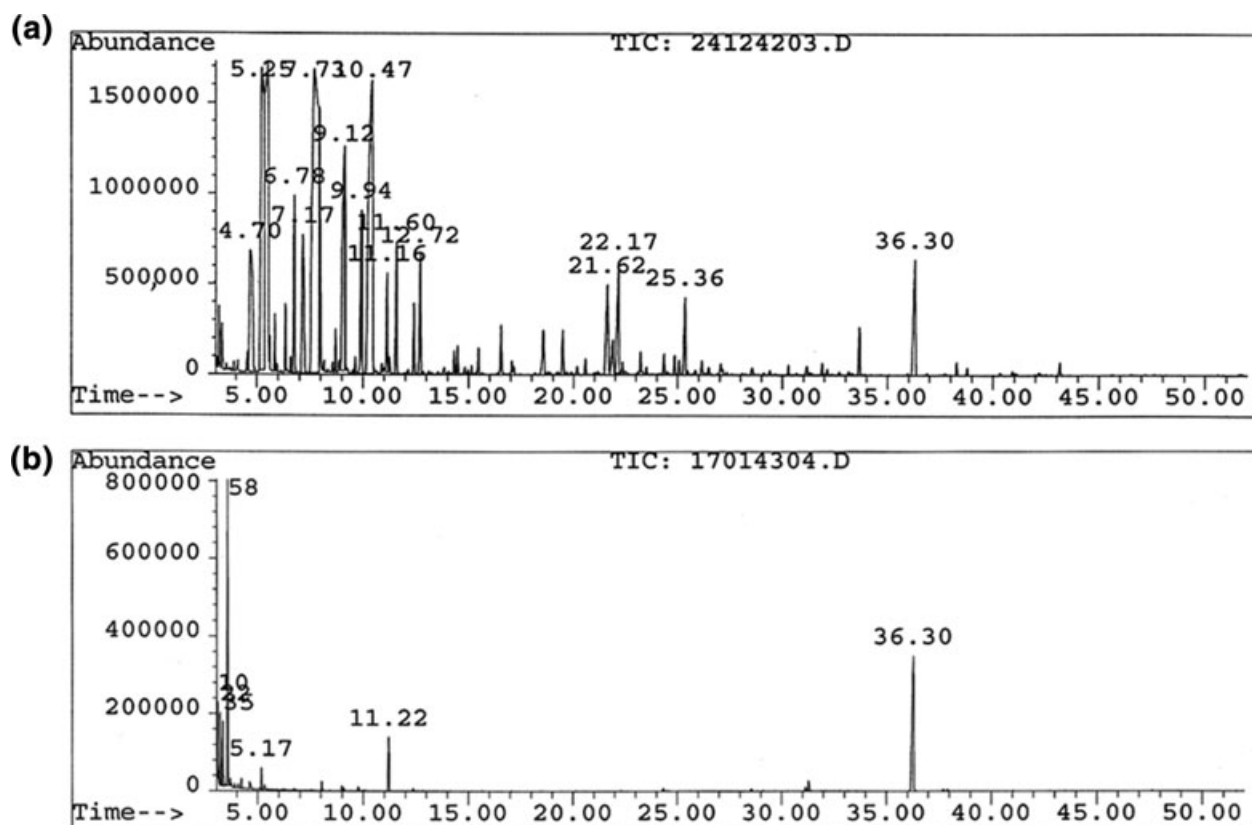


Fig. 1. Urine organic acid analysis of patient 1. (a) The tracing before the initiation of biotin revealing large peaks of lactic acid at 5.25 min, 3-hydroxypropionic acid at 7.17 min, 3-hydroxy-n-valeric acid at 9.94 min, and 3-methylcrotonylglycine at 22.17 min, consistent with the diagnosis of multiple carboxylase deficiency. (b) The tracing 24 days after the initiation of 1.2 mg/day of biotin showing no detectable levels of the abnormal acids. The peak at 36.30 of both panels represented the internal standard.

Table 1. Clinical description of four Thai patients with holocarboxylase synthetase deficiency

Patient	1	2	3	4
Gender	Female	Female	Female	Male
Consanguinity	—	+	—	—
Age of onset	1 month	8 months	9 months	9 months
Age at diagnosis	6 months	9 months	2 years 5 months	6 years
Age at last follow-up	8 years	3 years	6 years	12 years
Biotinidase activity (nmol/min/ml; normal: 5.63 ± 1.25 nmol/min/ml)	8.48	4.88	6.60	7.64
Development at last follow-up	Normal	Normal	Mildly delayed	Moderate mental retardation (IQ = 50) ^a

^aIntelligence testing on Stanford-Binet Intelligence Scales at the age of 9 years and 3 months.

respectively. All of the reactions were performed according to the company's recommendations.

Haplotype analysis

Tetra-nucleotide repeats, CAAA and ATTC in introns 8 and 9, respectively, were amplified as described by Yang et al. (5). Primer pairs and PCR conditions were shown in Table 2. Haplotypes were determined by a combination of the CAAA and ATTC repeats. EH program was employed to estimate the haplotype frequencies of 100 control alleles (6).

Results

Clinical presentations

MCD was suggested in four patients by urine organic analysis (Table 1). All patients had large amounts of 3-hydroxypropionic acid, 3-hydroxyisovaleric acid, 3-methylcrotonylglycine and lactic acid. The urine organic acid profile from patient 1 was shown in Fig. 1a. They had skin lesions around their mouth, eyes, neck and perineum, but none around the nose area (Fig. 2).

After the diagnosis of MCD, they were treated with biotin. For all of the patients, treatment with biotin 1.2 mg/day, with the exception of periods of acute infection when the biotin dose was increased to threefold, was sufficient to eliminate skin rashes (Fig. 2) and restore normal acid–base balance. The urine organic acids in all patients were restored to normal. The urine organic acid profile of patient 1 at 24 days after the initiation of treatment with 1.2 mg/day of biotin showed undetectable 3-hydroxypropionic acid, 3-hydroxyisovaleric acid, 3-methylcrotonylglycine and lactic acid (Fig. 1b). For patients 1 and 2, who were early diagnosed, their development during their last follow-ups remained appropriate (Table 1).

Biotinidase activity analysis

To differentiate the two forms of MCD, biotinidase activities were measured and compared to those of unaffected controls ($n = 245$) (Table 1). All four patients were found to have biotinidase activity in the normal range (4.88–8.64 nmol/min/ml in patients compared to 5.63 ± 1.25 nmol/min/ml in

Table 2. Oligonucleotides and polymerase chain reaction (PCR) conditions for HLCS mutation analysis

Name	Primer sequences from 5' to 3'	Annealing Temperature (°C)	Note
HLCS1-F	CTGGGGATCCTTATCGGCTA	64	PCR cDNA
HLCS1-R	CATGTCACAGCTGAGGCCAA		
HLCS2-F	TCCCAGCTCCAACATAGTG	62	PCR cDNA
HLCS2-R	CAGATGCATGGGCACGGACA		
HLCS3	TTTCTCAGGGAGGGAAGGTG	—	Sequencing
HLCS4	TTCAGACACCGCAGGAAATG		
HLCS exon 7-F	CTCATGGCTCCACATTCCTG	58	PCR gDNA
HLCS exon 7-R	CTCCATTCCAGGCGGTTATG		
HLCS exon 8-F	GAGTGTGTGGCCCTGGCATA	60	PCR gDNA
HLCS exon 8-R	GCTGAGGTTCTACAGCCACC		
CAAA-F	CTGTAGTCCCAGCTAGTTGA	58	microsatellite
CAAA-R	CATTTTCCACCACAGCTGAG		
ATTC-F	CTCTGGTGAATGGAAGAACC	60	microsatellite
ATTC-R	CAGCAGGAGACCAGTATAGG		



Fig. 2. Clinical features. (a–d) Patient 1, (e–h) patient 2, (i–l) patient 3, (m–p) patient 4. (a, e, i, m) Patients' faces before the biotin treatment. (b, f, j, n) Patients' faces approximately 1 week after the initiation of biotin. (c, d) Patient 1 at the ages of 18 months and 8 years, respectively. (g and h) Patient 2's perineum before and 1 week after the treatment, respectively. (k and l) Patient 3 at the ages of 4 and 6 years, respectively. (o and p) Patient 4's buttock before and 1 week after treatment, respectively.

controls). This finding excluded the diagnosis of biotinidase deficiency and suggested that all the patients had the HLCS deficiency form of MCD.

Mutation analysis

PCR sequencing revealed sequence variants in seven alleles; six were c.1522C>T (p.R508W) and the other one was c.1513G>C (p.G505R) (Table 3 and Fig. 3a). No other nucleotide changes were found in and around exonic regions. The parents' genotypes for the corresponding changes were identified by RFLP analysis. The results were

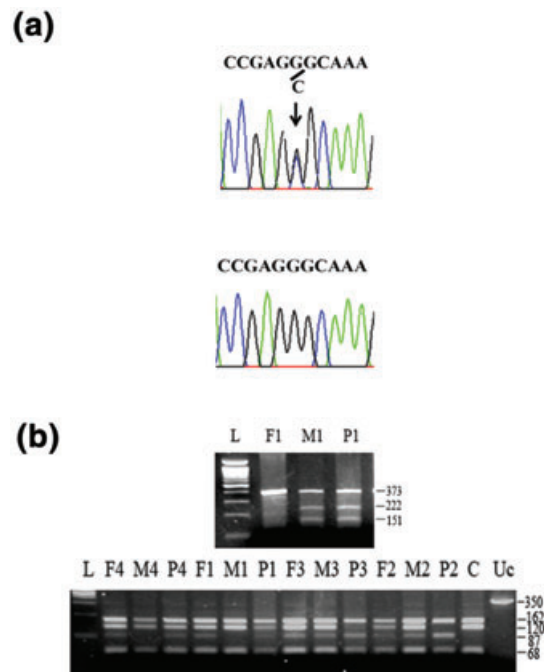


Fig. 3. Mutation analysis. (a) Chromatograms demonstrate a nucleotide change detected in the patient 1 (top) compared to an unaffected control (bottom). A black arrow shows the c.1513G>C mutation. (b) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for the nucleotide changes. Top, RFLP analysis for the c.1513G>C change in patient 1 (P1) and her parents (F1 = father, M1 = mother). The mutation creates a new restriction site for *HhaI* in exon 7 and enables it to cut the 373-bp polymerase chain reaction (PCR) product into 222- and 151-bp products. Bottom, genomic DNA of the patients (P1–P4) and their parents (F = father, M = mother) was amplified for *HLCS* exon 8, yielded 350-bp products, which were treated with *FoxI* restriction enzyme. *FoxI* digested the wild-type allele of a normal control (C) into 162-, 120-, and 68-bp products. The c.1522C>T mutation creates one of the *FoxI* restriction sites. The digestion of its PCR product therefore revealed 162-, 87-, 68-, and 33-bp products. Note that the 33-bp band is not visible in this figure. (L = DNA ladder, C = normal control, Uc = uncut amplified product).

consistent with the genotypes of the probands (Fig. 3b).

Haplotype analysis

As the c.1522C>T mutation was present in six out of eight alleles in our four patients, it

Table 3. Mutations in the *HLCS* gene and haplotypes of Thai patients with holocarboxylase synthetase deficiency

Patient	Nucleotide change	Amino acid change	CAAA repeat	ATTC repeat	Haplotype
1	c.1522C>T/c.1513G>C	p.R508W/p.G505R	8–9	9–9	8–9/9–9
2	c.1522C>T/c.1522C>T	p.R508W/p.R508W	7–7	10–10	7–10/7–10
3	c.1522C>T/c.1522C>T	p.R508W/p.R508W	8–8	9–9	8–9/8–9
4	c.1522C>T/U ^a	p.R508W/U	8–8	7–10	8–7/8–10

^aU, unidentified.

was interesting to investigate whether it was a founder mutation in our Thai population. Two microsatellite markers, CAAA and ATTC, in *HLCS* introns 8 and 9 were used, as described by Yang et al. (2000) (5). Fifty unaffected Thai individuals were examined for both markers by PCR and sequencing (Table 4). A haplotype with nine CAAA repeats and eight ATTC repeats, accounting for 25%, was found to be the most frequent haplotype in Thais. The c.1522C>T (p.R508W) change was associated with at least three haplotypes: 7–10, 8–9 and either 8–7 or 8–10. The c.1522C>T in patient 1 and patient 4 may associate with the haplotype 8–9 or 9–9, and 8–7 or 8–10, respectively. Our findings suggested that the c.1522C>T was a recurrent rather than a founder effect mutation in our population.

Discussion

In our 10-year experience at King Chulalongkorn Memorial Hospital, all Thai patients with MCD diagnosed by urine organic acid analysis had normal serum biotinidase activities, excluding biotinidase deficiency. Our findings were different from those found in western countries in which a larger group of children with MCD were deficient in biotinidase activity (7). Although our study included only a small number of patients, it suggested that majority of Thai patients with MCD could have defects in *HLCS*, instead of biotinidase. This finding was without ascertainment bias, as the phenotypes of the two forms of MCD are variable and overlap with each other and all MCD patients we identified were included in the study.

Another interesting finding from this cohort of patients is that dermatitis has been found in the periorbital and perioral areas, neck and perineal area, but never been detected around the nose area similar to those previously reported (1, 8, 9) (Fig. 2).

Table 4. Haplotype frequency of the *HLCS* gene in 100 control alleles

Haplotype repeat number (CAAA-ATTC)	Frequency (%)
7–7	0.8
7–8	1.8
7–9	1.4
8–7	7.6
8–8	16.7
8–9	13.7
9–7	11.6
9–8	25.5
9–9	20.9

At the time of their diagnosis, the availability of biotin in our institute was limited; a dose of 1.2 mg/day of biotin was therefore given. With close observation, we found that this low level of biotin significantly improved their symptoms and on the long-term follow-up, it was able to stabilize the metabolic state and maintain their developmental milestones. Although the dose of 1.2 mg per day is lower than the lowest dose ever reported in the literature, it is about a hundred times higher than daily requirement for normal children, which is 12 µg/day (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies). It is generally recommended to give 10 mg/day of biotin to patients with *HLCS* (1) and a massive dose of enteral biotin of 100 mg/day was also given in some cases (10). In our patients, it could be possible that the disease onset after neonatal period might indicate a reasonable remaining amount of enzymatic activity, which might explain the relatively low biotin dosage required in these cases. This relatively small dose could result in a normal growth and development without acidosis in patients 1 and 2 who were diagnosed and treated within 9 months of age. However, delayed diagnosis and delayed treatment in patients 3 and 4 resulted in developmental delay. Notably, developmental outcomes of our four patients correlated with their ages when biotin was started; the earlier the initiation of biotin, the better the developmental outcomes (Table 1).

To our knowledge, this is the first mutation study of *HLCS* deficiency in Southeast Asia. Of our four patients, seven mutant alleles were identified; six were c.1522C>T (p.R508W) and the other one was c.1513G>C (p.G505R). The finding of p.R508W in all four patients (100%) and in six out of eight alleles (75%) makes it possible the most common mutation in the Thai population. Although it has been reported in American, Chinese, Japanese, French, and Iranian (8, 11), it has not been demonstrated as the most common in these previously studied ethnic groups. The closest ethnic group studied for mutations in this gene was probably the Japanese in which their most common mutations were a truncating mutation (c.1067delG) and a missense mutation (p.L237G) (11). This information will certainly help facilitate the diagnosis of *HLCS* deficiency in Thai patients.

For the polymorphic markers in the *HLCS* gene in the Thai population, the number of CAAA and ATTC repeats ranged from 7 to 9 and 7 to 10, respectively, compared to 6 to 8 and 10 to 15 in the Japanese population (5). While the Japanese study revealed that two most common mutations, p.L237P and c.1067delG, were founder mutations,

our data indicating that the most common mutation in the Thai population, p.R508W, was associated with at least three haplotypes, suggesting that it was rather a recurrent mutation.

The c.1513G>C (p.G505R) has never been previously reported (Fig. 3). This expands the mutational spectrum of *HLCS* to at least 36 (The Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; searched on August, 2009). Both mutations identified in this study are in the *HLCS* biotin-binding domain. It has been reported that mutations in this domain are responsible for the increased *K_m* for biotin, which may explain the clinical biotin responsiveness and the disease onset after neonatal period (1, 12).

For an unidentified mutation in another allele of patient 4, several possibilities include it being in unexplored regions, for example, regulatory element, promoter, or intronic regions, or it being undetectable by our methods, such as an exonic deletion mutation.

In summary, we reported four unrelated Thai patients with MCD. An interesting clinical finding includes the lack of dermatitis of the perinasal area. In our Thai population, *HLCS* deficiency is probably more common than biotinidase deficiency. The low-dose biotin has been able to stabilize the metabolic state and maintain the patients' developmental milestones on long-term follow-up. The recurrent c.1522C>T (p.R508W) mutation is the most common mutation in the Thai population. In addition, a novel mutation, c.1513G>C (p.G505R), was identified.

Acknowledgements

We are thankful to Dr Chantragan Srisomsap Phiphobmongkol for her assistance on the biotinidase activity assay. This study was supported by Chulalongkorn University, National Science and Technology Development Agency, and the Thailand Research Fund.

References

1. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Schriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al., eds. The metabolic and molecular basis of inherited diseases. New York, NY: McGraw-Hill, 2000: 3935–3962.
2. Suormala T, Fowler B, Duran M et al. Five patients with a biotin-responsive defect in holocarboxylase formation: evaluation of responsiveness to biotin therapy in vivo and comparative biochemical studies in vitro. *Pediatr Res* 1997; 41: 666–673.
3. Shotelersuk V, Srivuthana S, Wacharasindhu S et al. Establishing gas chromatography-mass spectrometry to diagnose organic acidemias in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31: 566–570.
4. Pettit DA, Wolf B. Quantitative colorimetric assay of biotinidase activity. In: Hommes F, ed. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual. New York, NY: Wiley-Liss, 1991: 561–565.
5. Yang X, Aoki Y, Li X et al. Haplotype analysis suggests that the two predominant mutations in Japanese patients with holocarboxylase synthetase deficiency are founder mutations. *J Hum Genet* 2000; 45: 358–362.
6. Tervilliger J, Ott J. Handbook of human genetic linkage. Baltimore, MD: John Hopkins University Press, 1994.
7. Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Schriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al., eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, NY: McGraw-Hill, 2001: 2165–2194.
8. Morrone A, Malvagia S, Donati MA et al. Clinical findings and biochemical and molecular analysis of four patients with holocarboxylase synthetase deficiency. *Am J Med Genet* 2002; 111: 10–18.
9. Seymons K, De Moor A, De Raeve H, Lambert J. Dermatologic signs of biotin deficiency leading to the diagnosis of multiple carboxylase deficiency. *Pediatr Dermatol* 2004; 21: 231–235.
10. Van Hove JL, Josefsberg S, Freehauf C et al. Management of a patient with holocarboxylase synthetase deficiency. *Mol Genet Metab* 2008; 95: 201–205.
11. Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y. Mutations in the holocarboxylase synthetase gene *HLCS*. *Hum Mutat* 2005; 26: 285–290.
12. Dupuis L, Leon-Del-Rio A, Leclerc D et al. Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1011–1016.

Prenatal diagnosis of a novel mutation, c.529C>T (p.Q177X), in the *BCKDHA* gene in a family with maple syrup urine disease

R. Tammachote · S. Tongkobpetch · T. Desudchit ·
K. Suphapeetiporn · V. Shotelersuk

Received: 3 August 2008 / Submitted in revised form: 19 December 2008 / Accepted: 12 January 2009 /
Published online: 24 February 2009
© SSIEM and Springer 2009

Summary Maple syrup urine disease (MSUD) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by defective activity of the branched-chain α -keto-acid dehydrogenase (BCKD) complex. The disease-causing mutations can affect the *BCKDHA*, *BCKDHB* or *DBT* genes encoding for the E1 α , E1 β , and E2 subunits, respectively, of the BCKD complex. Here we report a girl who first presented to our clinic at 4 years of age with profound mental retardation. A diagnosis of MSUD was subsequently made based on the results of plasma amino acid analysis. Mutation analysis confirmed that she was homozygous for a novel mutation, c.529C>T (p.Q177X) in *BCKDHA*, while both parents, who were first cousins, were heterozygous. This enabled us to give an option of prenatal diagnosis to the parents.

Communicating editor: Viktor Kozich

Competing interests: None declared

References to electronic databases: Maple syrup urine disease: OMIM 248600. E1 α subunit: NP_000700. The Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>.

R. Tammachote
Department of Botany, Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

S. Tongkobpetch · T. Desudchit ·
K. Suphapeetiporn · V. Shotelersuk
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

K. Suphapeetiporn (✉)
Department of Pediatrics,
King Chulalongkorn Memorial Hospital,
Sor Kor Building 11th floor,
Bangkok 10330, Thailand
e-mail: Kanya.su@chula.ac.th

The prenatal testing for MSUD was performed during the mother's subsequent pregnancy and revealed that the fetus was heterozygous for the mutation. The healthy male neonate was born and his genotype was tested by restriction enzyme analysis, which confirmed the result of the prenatal testing. In summary, a late diagnosis of MSUD in patients without an unusual odour could occur especially in countries without neonatal screening programs as seen in the index patient. Mutation detection was, however, still beneficial to the family since prenatal testing could be performed in subsequent pregnancies. In addition, a novel mutation was found, expanding the mutation spectrum of this disease.

Abbreviations

BCAA	branched-chain amino acids
BCAT	branched-chain aminotransferase isozyme
BCKD	branched-chain α -keto acid dehydrogenase
MRI	magnetic resonance imaging
MSUD	maple syrup urine disease
RFLP	restriction fragment length polymorphism

Introduction

Maple syrup urine disease (MSUD; OMIM 248600) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by defective activity of the branched-chain α -keto-acid dehydrogenase (BCKD) complex which catalyses the catabolism of the branched-chain amino acids (BCAA): leucine, isoleucine, and valine (Zhang et al 1991). The BCKD is a multimeric complex comprising three catalytic components: a branched-chain α -keto-acid decarboxylase (E1), a dihydrolipoyl transacylase (E2), and a

dihydrolipoamide dehydrogenase (E3). E1 is a heterotetrameric complex consisting of two E1 α and two E1 β subunits encoded by the *BCKDHA* and *BCKDHB* genes, respectively. E2 and E3 are encoded by the *DBT* and *DLD* genes, respectively. BCKD complex deficiency leads to accumulation of the corresponding amino acids and marked ketoacidosis with clinical features of neurological abnormalities and mental retardation. Patients usually have a distinctive maple syrup odour in their urine. Mutations causing MSUD are genetically heterogeneous and have been identified in the *BCKDHA*, *BCKDHB*, and *DBT* genes (Danner and Doering 1998; Nellis and Danner 2001).

Based on the clinical presentation and biochemical responses to thiamine administration, MSUD can be divided into four types: classic, intermediate, intermittent, and thiamine-responsive. Most individuals affected with MSUD suffer from the severe classic form with residual BCKD activities less than 2% of those of normal subjects. If left untreated, the prognosis is poor as the majority of patients die within the first few months of life, usually from a metabolic crisis and neurological deterioration (Chuang and Shih 2001). Newborn-screening programmes in some countries lead to early diagnosis and specific treatment.

Here we report a 4-year-old girl with MSUD caused by a novel mutation in the *BCKDHA* gene. This finding enabled us to provide appropriate genetic counselling and successful prenatal diagnosis during subsequent pregnancy.

Patient

The index patient was born at term in India to a 22-year-old, gravida 1, para 0, Indian mother and a 22-year-old Indian father. The parents were first cousins. The pregnancy and labour were uneventful. Her birth weight was 3500 g. At 5 days of age, she developed seizures and

dystonia. Brain magnetic resonance imaging (MRI) at 1 week of age suggested generalized delayed myelination. EEG at 8 months of age demonstrated severe epileptic cerebral dysfunction. Seizures ceased at the age of 9 months, but the patient continued to vomit every day. Her development was at best at 6 months of age, when she started holding her head. She had regular follow-up visits in India and was totally dependent on the caregiver, but was not on any medications and had not been hospitalized. The diagnosis was made at 4 years of age when the family came to Thailand and she was referred to our hospital. She presented with profound mental retardation. Her head circumference was 45.5 cm (-3 SD) and her weight was 14 kg (-1 SD). She had hypertonia and hyperreflexia with positive clonus. Neither dysmorphic features nor abnormal odour was observed. Plasma amino acid analysis revealed increased levels of branched-chain amino acids (1542 μ mol/L for leucine, 506 μ mol/L for valine, and 376 μ mol/L for isoleucine). Urine organic acid analysis by gas chromatography–mass spectrometry revealed a large amount of 2-hydroxyisovaleric acid. The clinical picture and the greatly elevated BCAA concentrations in plasma indicated that the patient suffered from a severe form of MSUD. Treatment with a special formula was subsequently started. She responded poorly to the treatment. Her developmental status remained the same. She also suffered from multiple episodes of pneumonia, and died at the age of 7 years.

Mutation analysis by PCR-sequencing revealed a novel homozygous mutation, c.529C>T, in exon 5 of the *BCKDHA* gene (data not shown). The nucleotide change was predicted to cause a truncating mutation (p.Q177X) in the E1 α subunit of the BCKA complex. Using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, it was confirmed that the index patient was homozygous for the c.529C>T transition and both parents were found to be carriers of the mutation (Fig. 1).

Identification of the disease-causing mutation enabled us to give more accurate genetic counselling. One year

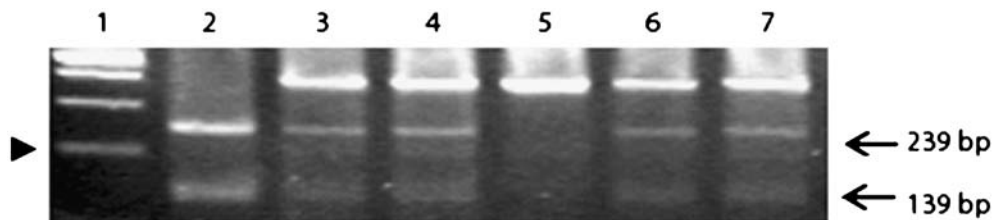


Fig. 1 PCR-RFLP analysis of *BCKDHA* c.529C>T. Lane 1, 100 bp marker; lane 2, unaffected control; lane 3, father; lane 4, mother; lane 5, index patient; lane 6, second child (fetal CVS); lane 7, second child (born, peripheral blood). In lane 2, *Sau96I* digested the wild-type allele of the control into 239 bp and 139 bp products (arrows).

The c.529C>T mutation in the index patient eliminates the restriction site, leaving the uncut 328 bp product. The analysis showed that the index patient was homozygous for the mutation, while her parents and brother were heterozygotes. The 200 bp band is indicated by an arrow head

Table 1 Oligonucleotides and PCR conditions for MSUD mutation analysis

Name	Primer sequences for PCR 5' to 3'	Annealing temperature (°C)
<i>BCKDHA</i> -F	CTGAGTGGTTGTTAGCCAAG	61
<i>BCKDHA</i> -R	AGACAGTGGTGTGCTGTCAG	
<i>DBT</i> -F	GTTGTCATTTCCGGGGTAAG	55
<i>DBT</i> -R	CCCAGGAGAACCATTACACC	
<i>DLD</i> -F	CAGCGGAGGTGAAAGTATTG	61
<i>DLD</i> -R	GTTCAGGAATGTGACTTC	
Ex5-F	CCTGTCTGCCTGCCAGCATG	57
Ex5-R	AGGGCTCTAGTGGTGTACC	

after the causative mutation was found in the proband, her parents decided to have another child. Prenatal diagnosis was successful in this family.

Materials and methods

Mutation analysis

Total RNA was isolated from white blood cells of the index patient using QIAamp RNA blood mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Reverse transcription was performed using ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). PCR amplification of the entire coding region of the *BCKDHA*, *DBT*, and *DLD* genes was performed on the cDNA using primers specific for each gene (Table 1). PCR products were directly sequenced.

Genomic DNA was obtained from venous (whole) blood of the index patient, the parents, and the newborn. For prenatal diagnosis, genomic DNA was extracted from chorionic villi (obtained in the 11th week of gestation) and cultured amniocytes (obtained by amniocentesis in the 16th week of gestation). For mutation analysis by PCR-RFLP, exon 5 of the *BCKDHA* gene was amplified using primers Ex5-F and Ex5-R (Table 1), then treated with *Sau96I* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). DNA extraction and restriction enzyme digestion were performed according to the manufacturer's recommendations.

Results

Mutation analysis of the *BCKDHA* gene was first performed in the index patient and revealed a novel homozygous nonsense mutation, c.529C>T (p.Q177X). Both parents were found to be carriers of the mutation. Prenatal testing of fetal materials by RFLP analysis revealed that the fetus was heterozygous for the mutation (Fig. 1). The mother decided to continue her pregnancy, which resulted in a birth of a healthy male

child. The newborn's genotype was tested by RFLP, which confirmed the prenatal testing result (Fig. 1). Amino acid and acylcarnitine levels analysed by tandem mass spectrometry were within normal limits.

Discussion

At least 100 different mutations causing MSUD have been described. Of these, 39 are reported in the *BCKDHA* gene, with the majority being missense/nonsense mutations (The Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.cf.ac.uk>, accessed July 2008). This study describes a patient with a severe form of MSUD. A novel nonsense mutation (c.529C>T; p.Q177X) was found and predicted to create a premature termination codon of the E1 α subunit (NP_000700), which results in either mRNA degradation through nonsense-mediated mRNA decay process or truncation of the protein at amino acid 176, thus deleting 269 amino acids at its carboxy terminus. Both cases can cause a major disruption to the protein function.

Although the diagnosis was delayed in the index patient and she was not given the specific treatment in time to prevent further neurological damage, identification of the causative mutation was still beneficial to her family. It did not discourage her parents from having another child and allowed fetal molecular analysis.

Untreated individuals with severe MSUD usually suffer from neurological damage as seen in our patient. Early diagnosis and treatment can reduce morbidity, mortality, and length of hospitalization (Mitsubuchi et al 2005; Padilla et al 2001). Newborn screening by tandem mass spectrometry can be used to detect elevated BCAA concentrations in the blood samples, making early diagnosis and intervention possible in pre-symptomatic newborns (Chace et al 1995; Heldt et al 2005; Simon et al 2005). This can result in benign neonatal courses, normal growth, and low hospitalization rates in classic MSUD patients (Morton et al 2002). Without newborn screening, diagnosis of MSUD is

usually made between 10 and 20 days of life, when the patients become symptomatic and neurological damage has already occurred. Therefore, countries currently without a newborn screening programme for metabolic disorders should take this issue seriously into consideration.

In summary, we report a novel protein-truncating mutation in the *BCKDHA* gene in a girl with severe MSUD. Identification of the causative mutation enabled us to make a successful prenatal diagnosis in this family in which the fetus was found to be heterozygous for the mutation. This study also re-emphasizes the importance of early diagnosis and treatment of MSUD in affected individuals to help them survive and develop normally.

Acknowledgements We are grateful to Dr Sumonta Chaisomchit of Thailand's Ministry of Public Health for the tandem mass spectrometry analysis. This study was supported by the Research Unit Grant from Chulalongkorn University, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, and the Thailand Research Fund.

References

- Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Roe CR, Naylor EW (1995) Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **41**: 62–68.
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 1971–2005.
- Danner DJ, Doering CB (1998) Human mutations affecting branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase. *Front Biosci* **3**: d517–524.
- Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, Grotzke M, Wendel U (2005) Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Mol Genet Metab* **84**: 313–316. doi:10.1016/j.ymgme.2004.11.010.
- Mitsubuchi H, Owada M, Endo F (2005) Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: an implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. *J Nutr* **135**: 1565S–1570S.
- Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI (2002) Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* **109**: 999–1008. doi:10.1542/peds.109.6.999.
- Nellis MM, Danner DJ (2001) Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet* **68**: 232–237. doi:10.1086/316950.
- Padilla CD, Silao CL, Lee JY (2001) Maple syrup urine disease: a report of 26 cases in the Philippines. In: Lai PS, Yap EPH, eds. *Frontiers in Human Genetics: Diseases and Technologies*. Singapore: World Scientific Publishing, 185–192.
- Simon E, Wendel U, Schadewaldt P (2005). Maple syrup urine disease-treatment and outcome in patients of Turkish descent in Germany. *Turk J Pediatr* **47**: 8–13.
- Zhang B, Zhao Y, Harris RA, Crabb DW (1991) Molecular defects in the E1 alpha subunit of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex that cause maple syrup urine disease. *Mol Biol Med* **8**: 39–47.



ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ฉบับที่ 26 /2553)

เรื่อง ผลการตัดสินการเสนอผลงานวิทยานิพนธ์
จัดการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11

ตามที่บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้จัดการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11 และจัดการประกวดการเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ไปแล้ว นั้น บัณฑิตวิทยาลัยพิจารณาการเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ดังกล่าวได้เสร็จสิ้นเรียบร้อยแล้ว บัณฑิตวิทยาลัยใคร่ขอประกาศรายชื่อผู้ได้รับรางวัล ดังรายละเอียดตามเอกสารที่แนบท้ายประกาศนี้ โดยบัณฑิตวิทยาลัยจะจัดพิธีมอบรางวัลแก่ผู้ได้รับรางวัลในวันศุกร์ที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553 เวลา 17.00 น. เป็นต้นไป ณ บริเวณลานชั้น 1 อาคารตึกเพียรวิจิตร จึงขอให้ผู้ได้รับรางวัลและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ของผู้ได้รับรางวัลเข้าร่วมพิธีมอบรางวัลในวัน เวลา และสถานที่ดังกล่าวโดยพร้อมเพรียงกัน

ประกาศ ณ วันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553

(รองศาสตราจารย์ลำปาง แม่นมัตย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

รายชื่อแนบท้ายประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ฉบับที่ 26/2553)

ผลการประกวดการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11

ประเภทบรรยาย ระดับปริญญาเอก

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาวจตุพร วิจิตสรณ์น้อย
ชื่อบทความ	ผลของการบริโภคกากงาดำต่อความดันโลหิตและสารต้านอนุมูลอิสระในคนที่ถือว่ากำลังจะเป็นโรคความดันโลหิตสูง
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดี

ชื่อ	นายภัทรารุณี แสงศิริ
ชื่อบทความ	การคัดแยกประเภทของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้วิธีการจัดอันดับ ร่วมกับเทคนิคซัพพอร์ตเวกเตอร์แมชชีน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

กลุ่มมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาวปิยลักษณ์ โพธิวรรณ
ชื่อบทความ	ขบวนการเคลื่อนไหวทางสังคมของคนข้ามเพศ
สาขาวิชา	สังคมวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาวอรธิดา ประสาร
ชื่อบทความ	กระบวนการพัฒนาเรื่องราวทางสังคมสำหรับนักเรียนออทิสติก
สาขาวิชา	หลักสูตรและการสอน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประเภทบรรยาย ระดับปริญญาโท

กลุ่มวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นายโอภาส โชคทรัพย์มณี
ชื่อบทความ	การสังเคราะห์โปรตีนเอสเชิงซ้อน (NS2B-NS3) ของไวรัสไข้เลือดออกที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์
สาขาวิชา	อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รางวัลดี

ชื่อ	นายเนลวัฒน์ กิ่งสุวรรณพงษ์
ชื่อบทความ	การวิเคราะห์การทำงานของมิวแทนใหม่ในยีน AGXT แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาวทักษพร รัตนมูขัย
ชื่อบทความ	การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตไบโอดีเซลด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก Scenedesmus dimorphus
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาว อุมาวดี เหลาทอง
ชื่อบทความ	วิธีการให้เมลาโตนินที่เหมาะสมในการลดการอักเสบและภาวะออกซิเดทีฟและไนเตรทีฟสเตสในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchis viverrini)
สาขาวิชา	ปรสิตวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กลุ่มวิทยาศาสตร์กายภาพ

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	ร.ต.อ.วรากุล กาญจนกัญโห
ชื่อบทความ	แบบจำลองโครงข่ายประสาทเทียมสำหรับการพยากรณ์อัตราการเกิดเหตุอาชญากรรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นายชาตินักรบ แสงสว่าง
ชื่อบทความ	การจัดตารางการผลิตเครื่องจักรแบบขนานที่ไม่เกี่ยวข้องกันภายใต้ข้อจำกัดการผลิตของเครื่องจักร
สาขาวิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นายณภัฏ ปัทมสัตยาสนธิ
ชื่อบทความ	ผลของการบ่มเร่งสภาวะด้วยแสงยูวีและสารเคลือบผิวชนิดซีเรียมออกไซด์ที่มีผลต่อสมบัติเชิงกล และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีในวัสดุเชิงประกอบระหว่างฟิวิซีและผงซีลีอียไม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาวอลิสสา เชาวไวพจน์
ชื่อบทความ	การใช้กากตะกอนจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตลาเท็กซ์เป็นตัวเติมสำหรับเรซินอีพ็อกซี
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาว จันทร์พิมพ์ สุขเสริม
ชื่อบทความ	ผลของการใช้โปรแกรมกระบวนการกลุ่มเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตของนักเรียนกลุ่มเสี่ยงติดเกมคอมพิวเตอร์
สาขาวิชา	จิตวิทยาการศึกษาและการให้คำปรึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดี

ชื่อ	นาย ชศกร สิทธิศักดิ์ไพบูลย์
ชื่อบทความ	การศึกษาข้อถกเถียงแพร่ไปในภาษาไทยตามแนววรรณคดีชาตินิพนธ์
สาขาวิชา	ภาษาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รางวัลดี

ชื่อ	นาย ณัชรุต เกื้อทาน
ชื่อบทความ	แบบจำลองความคิดเรื่องพันธะเคมีของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาว สุธีรา เตชคุณวุฒิ
ชื่อบทความ	ผลต่อการเข้าถึงยาของนโยบายบังคับใช้สิทธิเหนือสิทธิบัตรยาในประเทศไทย
สาขาวิชา	เศรษฐศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเภทโปสเตอร์

กลุ่มวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นายเพิ่มสิทธิ์ ชาดิกุลวัฒน์
ชื่อบทความ	การวิเคราะห์ชนิดจิ้งหรีดโดยลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์และการทำเสียงในจิ้งหรีดเพศผู้
สาขาวิชา	กีฏวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาววิริยา ภูผิวคำ
ชื่อบทความ	การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของ <i>Trichoderma harzianum</i> isolate T9
สาขาวิชา	ชีวเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาวรุ่งอรุณ สุขสำราญ
ชื่อบทความ	การศึกษาตำแหน่งของทรานสโปซอนบนจีโนมของเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv สายพันธุ์กลายที่ไวต่อยากลุ่มแมโครลายด์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาวมุสดี พรหมประสิทธิ์
ชื่อบทความ	ถิ่นฐานวิทยาเขตของพืชวงศ์ทานตะวันในอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว
สาขาวิชา	ชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นาย เอกพงศ์ ฐู๋ทำนอง
ชื่อบทความ	การวิเคราะห์การกลายพันธุ์บริเวณไทโรซีนไคเนสโดเมนของยีนอีจีเอฟอาร์ ของผู้ป่วยมะเร็งปอดในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย
สาขาวิชา	ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาว ฐาปะนีย์ ชูเหลือ
ชื่อบทความ	การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองโดยใช้ <i>Plasmodium yoelii</i> เชื้อตายฟอร์มาลินโดยใช้ CpG oligodeoxynucleotide และ Montanide เป็นแอดจูแวนท์
สาขาวิชา	โรคติดเชื้อและวิทยาการระบาด มหาวิทยาลัยมหิดล

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นาง อาทิตยา ทิคำ
ชื่อบทความ	การให้บริการดูแลสุขภาพต่อเนื่องสำหรับผู้สูงอายุที่มีภาวะเจ็บป่วยเรื้อรังของโรงพยาบาลบ้านผือ จังหวัดอุดรธานี
สาขาวิชา	การพยาบาลชุมชน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาว ชูมาพร รอดสีดา
ชื่อบทความ	ความเสี่ยงจากการบริโภคอาหารบรรจุกล่องโฟมโพลีสไตรีน
สาขาวิชา	พิษวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กลุ่มวิทยาศาสตร์กายภาพ

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาวรสรินทร์ เนื่องจำนงค์
ชื่อบทความ	การเตรียมนาโนคอมโพสิตของโซเดียมเบนโทไนด์เคลือบโพลิเมอร์ให้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาวพรรณรัตน์ สนิทนนท์
ชื่อบทความ	การสร้างนาโนฟิล์มของพอลิเมอร์แบบเชื่อมขวางบนผิวซิลิกาโดยการฉายรังสีเหนี่ยวนำ
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

กลุ่มมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาว เสาวลักษณ์ มาธุรสกุล
ชื่อบทความ	แนวทางการจัดการปัญหาการกัดเซาะชายฝั่งทะเล หาดเจ้าหลาวและหาดแหลมเสด็จ ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยมหิดล

รางวัลดีเด่น

ชื่อ	นางสาว วรรัตน์ วัฒนชนโนบล
ชื่อบทความ	ปัจจัยที่มีผลต่อบทบาทของชุมชนในการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติในพื้นที่ต้นน้ำของชุมชนบ้านถ้ำผึ้ง ตำบลต้นขวน อำเภอนม จังหวัดสุราษฎร์ธานี
สาขาวิชา	การจัดการลุ่มน้ำและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รางวัลดี

ชื่อ	นางสาว กิตติมา ยอดคำ
ชื่อบทความ	การประเมินประสิทธิผลการจัดการพื้นที่คุ้มครองทางทะเล กรณีศึกษา อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะสุรินทร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการบริหารสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยมหิดล

รางวัลดี

ชื่อ	นาง พรพกา ชำนาญวงษ์
ชื่อบทความ	การจัดกิจกรรมการเรียนรู้หน่วยบูรณาการ เรื่องรักย์ต้นไม้ในชุมชน สำหรับชั้นประถมศึกษาปีที่ 5
สาขาวิชา	สิ่งแวดล้อมศึกษา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รางวัลดี

ชื่อ	นาย นพดล เพิ่มสมบูรณ์
ชื่อบทความ	ปัจจัยด้านการสอนงาน และการรับรู้ความสามารถของตนเอง ที่มีอิทธิพลต่อผลการปฏิบัติงานของพนักงานขายรถยนต์ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการจัดการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รางวัลดี

ชื่อ	นาง จันทรา สุจิตานนท์
ชื่อบทความ	พฤติกรรมเสี่ยงทางสังคมของนักเรียนระดับชั้นมัธยมศึกษา
สาขาวิชา	พัฒนาสังคม มหาวิทยาลัยขอนแก่น