

บทวิจารณ์โดยรวมและข้อเสนอแนะ

วิธีการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ทำให้สามารถค้นพบมิวเตชันได้เกือบทุกประเภท ได้แก่ RNA-splicing defects, nonsense mutation, frameshift deletion และ in-frame deletion ยกเว้น missense mutation ที่ยังไม่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม มี single nucleotide polymorphisms (SNPs) จำนวนหนึ่งถูกค้นพบในงานวิจัยนี้ด้วย การตรวจกรองมิวเตชันด้วยวิธี MRF-SSCP นับว่าเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และมีประสิทธิภาพพอสมควร เหมาะกับห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ทั่วไป

ข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ทำให้ทราบชนิดมิวเตชันที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (germline mutation) ของยีน *PKD1* ที่เป็นสาเหตุของโรค PKD1 ในผู้ป่วยไทยเพิ่มขึ้นอีก 6 ครอบครัว เมื่อรวมกับครอบครัวที่เคยตรวจพบมาก่อนหน้านี้ 2 ครอบครัวเป็น 8 ครอบครัว โดยมีมิวเตชัน 1 ชนิดที่พบใน 2 ครอบครัว รวมพบมิวเตชันทั้งสิ้น 7 ชนิด (ตารางที่ 5 และภาพที่ 28) การที่ทราบชนิดมิวเตชันทำให้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจมิวเตชันนั้นๆ แบบจำเพาะเจาะจงที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัด เพื่อใช้วินิจฉัยโรค PKD1 สำหรับครอบครัวผู้ป่วยแต่ละครอบครัวได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคในแง่คุมทาง ใดๆ อาทิ

- การยืนยันหรือหักล้างการวินิจฉัยโรคทางคลินิกเนื่องจากผู้ป่วยมีประวัติครอบครัวและอาการแสดงที่ไม่ชัดเจน
- การวินิจฉัยแยกโรคในกลุ่มที่มีถุงน้ำในไตซึ่งมีหลายสาเหตุ
- การวินิจฉัยเพื่อพยากรณ์โรคซึ่งถ้าเป็น PKD1 มักจะมีอาการรุนแรงกว่า PKD2
- การวินิจฉัยโรคก่อนที่อาการจะปรากฏ
- การวินิจฉัยโรคเพื่อคัดเลือกรักษาผู้ที่สามารถบริจาคไตให้ผู้ป่วยเปลี่ยนถ่ายไตได้

การที่แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างแม่นยำและทันเวลา ทำให้การวางแผนดูแลรักษาและป้องกันโรคในผู้ป่วยและครอบครัวทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้โรคพันธุกรรมนี้ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่สามารถช่วยประคับประคองอาการให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตเช่นคนปกติ และชะลอภาวะไตวายให้เกิดช้าลงได้ นอกจากนี้ การทราบชนิดมิวเตชันยังทำให้แพทย์สามารถให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ด้วยข้อมูลที่ถูกต้องแก่ครอบครัวผู้ป่วยในการที่จะนำไปวางแผนการดำเนินชีวิตและการมีบุตรหลานสืบต่อไปได้

การตรวจพบมิวเตชันที่เกิดขึ้นใหม่ (de novo mutation) ดังที่พบในครอบครัว PK031 และ PK066 นั้นนับว่าเป็นประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก เนื่องจากครอบครัวเหล่านี้ไม่เคยมีประวัติโรค PKD1 มาก่อนในรุ่นพ่อแม่ของผู้ป่วยคนแรกที่มาพบแพทย์ (proband) ทำให้การวินิจฉัยโดยอาศัยข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวเกิดความไม่แน่ใจ การตรวจพบมิวเตชันจึงทำให้มั่นใจได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้ในแง่วิชาการพันธุศาสตร์ การค้นพบ de novo mutation ยังแสดงถึงการที่เบสในตำแหน่งที่เกิดมิวเตชันนั้นน่าจะมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเบสตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะปัจจัยแวดล้อมรอบๆ เบสนั้น ตัวอย่างเช่น เป็นตำแหน่งที่มีเบสเป็นชุดซ้ำๆ ติดกัน (tandem repeat) ทำให้มีโอกาสเกิดการจับคู่แบบไม่พอดีหรือเลื่อนกัน (misalignment) ขึ้นในช่วง DNA replication เป็นต้น

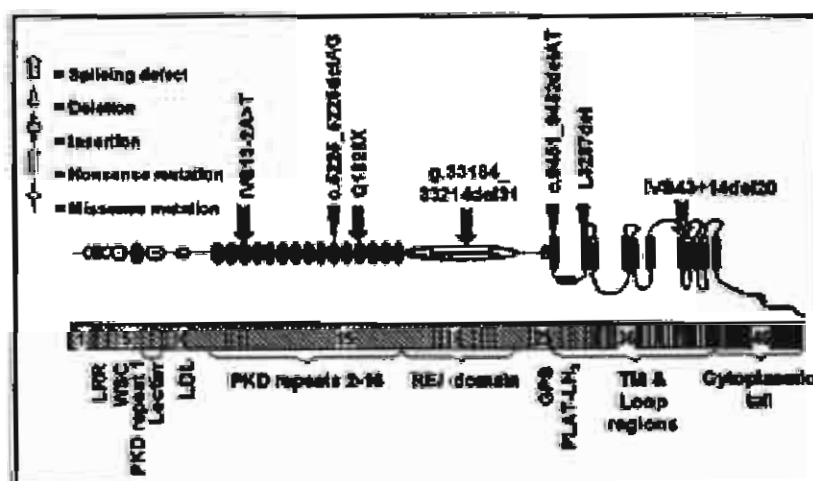
นอกเหนือจากมิวเตชันแล้ว งานวิจัยนี้ยังได้ข้อมูลเกี่ยวกับ SNPs ในยีน *PKD1* ของคนไทยซึ่งบางตำแหน่งอาจแตกต่างจากประชากรเชื้อชาติอื่น การมีฐานข้อมูล SNPs ที่สมบูรณ์ของยีนนี้อาจเพิ่มความเข้าใจถึงสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยโรค PKD1 มีการแสดงออกของโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกันในต่างครอบครัว หรือแม้แต่ในครอบครัวเดียวกันเองทั้งที่มีมิวเตชันชนิดเดียวกัน ข้อมูล SNPs ในยีน *PKD1* ยังอาจใช้ศึกษาหามิวเตชันชนิดที่เป็นการขาดหายขนาดใหญ่ ใดๆ (large deletion) ได้ ประโยชน์ที่เห็นได้ชัดจาก SNPs ในยีน *PKD1* ในงานวิจัยนี้คือ สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรค PKD1 ได้ โดยที่ยังไม่ทราบชนิดมิวเตชันที่เป็นสาเหตุ ถ้า SNPs นั้นมีการถ่ายทอดไปกับโรคเสมอเช่นในกรณีของครอบครัว PK007

ตารางที่ 5. মিวเตชันในยีน *PKD1* ที่ตรวจพบในคนไทยโดยคณะผู้วิจัย

ครอบครัวที่พบมิวเตชัน	ชนิดมิวเตชัน	ตำแหน่งในยีน	ความผิดปกติใน RNA ที่ตรวจพบ	ผลต่อ polycystin-1 ในทางทฤษฎี	เอกสารอ้างอิง
PK035* PK015*	IVS13-2A>T (g.26806A>T)	IVS13	Del the first 74 nt of exon 14	FS at 1055 (PKD IV-terminal deletion)	This study, Thongnopkhum et al., 2000 (17) Burley et al., 2002 (29)
PK039*	c.5225_5226delAG (g.29124_29125delAG)	Exon 15	-	FS at 1672 (PKD XI-terminal deletion)	This study, Previous studies (19, 24)
PK031**	Q1828X (c.5693C>T)	Exon 15	-	Stop at 1828 (PKD XIII-terminal deletion)	This study, Previous study (24)
PK066*	g.33184_33214del31 (31bpE19I19-2 to E19I19+29 or c.7913_7914+29del31)	Ex19-IVS19	Exon 19 skipping	FS at 2498 (REJ module-terminal deletion)	This study (Novel)
PK069*	c.9451_9452delAT (g.39376_39377delAT)	Exon 26	-	FS at 3082 (TM 1-terminal deletion)	This study (Novel)
PK002*	L3287del (c.10070_10072delCTC or g.41669_41671delCTC)	Exon 29	-	In-frame deletion of L3287 (TM 2)	This study (Novel)
PK009*	IVS43+14del20	IVS43	Exon 43 skipping	In-frame deletion of 3904-4001 (TM 7-9)	Rungroj et al., 2001 (31)

* มีการถ่ายทอดของมิวเตชันไปกับโรค

** เป็นมิวเตชันที่เกิดขึ้นใหม่ (de novo mutation) ในครอบครัวนี้



ภาพที่ 28. ตำแหน่งมิวเตชันในยีน *PKD1* ที่ตรวจพบในคนไทยโดยคณะผู้วิจัย (บน) แสดง domain ต่าง ๆ ของโปรตีน polycystin-1 ที่พบมิวเตชันทั้ง 7 ชนิด (ล่าง) แสดงขอบเขตของ exon บนยีน *PKD1* ที่กำหนดการสร้างแต่ละ domain

มิวเตชันทั้ง 7 ชนิดที่พบโดยคณะผู้วิจัยมีตำแหน่งกระจายเกือบทั่วทั้งยีน *PKD1* ยกเว้นส่วนต้นและปลายยีน ส่วนใหญ่เป็นมิวเตชันที่ทำให้โปรตีน polycystin-1 มีขนาดสั้นลง (truncated) ซึ่งน่าจะแสดงว่ามิวเตชันเหล่านี้ไปทำให้ polycystin-1 ทำหน้าที่ไม่ได้เลย (loss-of-function) แต่ก็มีมิวเตชันที่เกิดเฉพาะที่ (in-frame deletion) อยู่ 2 ชนิดซึ่งมีผลต่อ TM domain ที่ 2 และ 7-9 ซึ่งมิวเตชันประเภทหลังนี้น่าจะบ่งบอกถึงบริเวณที่มีหน้าที่สำคัญบนโมเลกุลของ polycystin-1 ได้ จากข้อมูลที่มีอยู่ซึ่งพอจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของมิวเตชันกับอาการแสดงของโรค (genotype-phenotype correlation) ได้ นั่นคือดูเหมือนว่าผู้ป่วยที่มีมิวเตชันที่เกิดต้นๆ หรือด้าน 5' ของยีนจะมีความรุนแรงของโรคมมากกว่าผู้ป่วยที่มีมิวเตชันที่อยู่ด้าน 3' ของยีนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยโดยกลุ่มของ Rossetti และคณะ (14, 15) เมื่อเร็ว ๆ นี้ ข้อเท็จจริงของการสรุปเช่นนี้มาจากข้อมูลที่พบว่ามิวผู้ป่วยจาก 3 ครอบครัว (PK015, PK039 และ PK009) ที่มีมิวเตชันต่างชนิดกันเรียงลำดับตั้งแต่ 5' ไป 3' คือ IVS13-2A>T, c.5225_5226delAG และ IVS43+14del20 มีอาการของภาวะไตวายระยะสุดท้าย (ESRD) ซึ่งเป็นเหตุให้เสียชีวิตเมื่ออายุได้ 41, 49 และ 55 ปีตามลำดับ

อย่างไรก็ดี ข้อสรุปที่ดีควรมีเหตุผลสนับสนุนที่ชัดเจนและมีปริมาณข้อมูลมากกว่านี้ เนื่องจากการศึกษาที่ระดับ RNA เป็นงานที่ยากทั้งในการเก็บตัวอย่างตรวจและวิธีการตรวจ การที่จะให้ได้ข้อมูลปริมาณมากจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการที่เริ่มจากการศึกษาที่ DNA ไม่พร้อม ๆ กันด้วย ปัจจุบัน คณะของผู้วิจัยมีตัวอย่าง DNA ที่เก็บไว้แล้วไม่น้อยกว่า 60 ครอบครัวซึ่งสามารถนำมาศึกษาใหม่ได้ทันทีที่มีความพร้อม โดยเฉพาะเมื่อมีเครื่องมือตรวจกรองมิวเตชันที่ทันสมัย เช่น denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) นอกจากนี้ ยังมีตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วยใหม่สะสมขึ้นมามากอีกเรื่อย ๆ เนื่องจากโรค PKD1 เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อยมากที่สุดโรคหนึ่งดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

ดังนั้น การค้นพบมิวเตชันในจำนวนที่มากเพียงพอน่าจะทำให้เกิดองค์ความรู้ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเกิดโรคได้ชัดเจนขึ้นกว่านี้ โดยเฉพาะเมื่อนำไปประกอบกับอาการแสดงทางคลินิกของผู้ป่วยที่ทราบชนิดและตำแหน่งของมิวเตชันแล้วจะยิ่งทำให้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของมิวเตชันกับลักษณะทางคลินิกของโรค และเข้าใจพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของโรค รวมทั้งกลไกที่อาจมีผลให้ผู้ป่วยบางรายมีลักษณะอาการของโรคแตกต่างกันได้กระจ่างยิ่งขึ้น ผลประโยชน์สูงสุดที่จะตามมา คือ การนำไปใช้ป้องกันและรักษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อย่างมีประสิทธิภาพ

หนังสืออ้างอิง (References)

1. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993;329(5):332-42.
2. Hafeboer N, Lazarou LP, Williams AJ, Holmans P, Ravine D. Familial phenotype differences in PKD11. *Kidney Int* 1999;56(1):34-40.
3. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994;77(6):881-94.
4. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, et al. *PKD2*, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996;272(5268):1339-42.
5. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, et al. The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995;10(2):151-60.
6. Burn TC, Connors TD, Deckowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Millholland JM, et al. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (*PKD1*) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium). *Hum Mol Genet* 1995;4(4):575-82.
7. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: the complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 1995;81(2):289-98.
8. Bogdanova N, Markoff A, Gerke V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B. Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 2001;74(3):333-41.
9. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. *PKD1* interacts with *PKD2* through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 1997;16(2):179-83.
10. Tsiokas L, Kim E, Amould T, Sukhatme VP, Walz G. Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(13):6965-70.
11. Ong AC, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, et al. Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol* 1999;154(6):1721-9.
12. Readers ST. Multilocus polycystic disease. *Nat Genet* 1992;1(4):235-7.
13. Hafeboer N, Veldhuisen B, Peters D, Breuning MH, San-Millan JL, Bogdanova N, et al. Location of mutations within the *PKD2* gene influences clinical outcome. *Kidney Int* 2000;57(4):1444-51.
14. Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millan JL, Zarnes K, et al. The position of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(5):1230-7.
15. Rossetti S, Chauveau D, Kubly V, Slezak JM, Saggat-Malik AK, Pel Y, et al. Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene and development of a vascular phenotype. *Lancet* 2003;361(9376):2196-201.

16. Thongnoppakhun W, Wilairat P, Vareesangthip K, Yenchitsomanus PT. Long RT-PCR Amplification of the entire coding sequence of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene. *Biotechniques* 1999;26(1):126-32.
17. Thongnoppakhun W, Rungroj N, Wilairat P, Vareesangthip K, Sirinavin C, Yenchitsomanus PT. A novel splice-acceptor site mutation (IVS13-2A>T) of polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene resulting in an RNA processing defect with a 74-nucleotide deletion in exon 14 of the mRNA transcript. *Hum Mutat* 2000;15(1):115.
18. Van Raay TJ, Burn TC, Connors TD, Petry LR, Germino GG, Klinger KW, et al. A 2.5 kb polypyrimidine tract in the *PKD1* gene contains at least 23 H-DNA-forming sequences. *Microb Comp Genomics* 1996;1(4):317-27.
19. Watnick T, Phakdeekitcharoen B, Johnson A, Gandolph M, Wang M, Briefel G, et al. Mutation detection of *PKD1* identifies a novel mutation common to three families with aneurysms and/or very-early-onset disease. *Am J Hum Genet* 1999;65(6):1561-71.
20. Perrichot RA, Mercier B, Simon PM, Whebe B, Clédes J, Ferec C. DGGE screening of *PKD1* gene reveals novel mutations in a large cohort of 146 unrelated patients. *Hum Genet* 1999;105(3):231-9.
21. Koptides M, Mean R, Demetriou K, Constantinides R, Pleridas A, Harris PC, et al. Screening of the *PKD1* duplicated region reveals multiple single nucleotide polymorphisms and a de novo mutation in Hellenic polycystic kidney disease families. *Hum Mutat* 2000;16(2):176.
22. Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Germino GG. Mutation analysis of the entire replicated portion of *PKD1* using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(5):955-63.
23. Rossetti S, Stmecki L, Gamble V, Burton S, Sneddon V, Peral B, et al. Mutation analysis of the entire *PKD1* gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001;68(1):46-63.
24. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggat-Malik A, Winearls CG, Torres VE, et al. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 2002;61(5):1588-99.
25. Lee HH, Lo WJ, Choo KB. Mutational analysis by a combined application of the multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism and the direct linear amplification DNA sequencing protocols. *Anal Biochem* 1992;205(2):289-93.
26. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2766-70.
27. Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 1982;126(2):374-80.
28. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673-80.
29. Burtay S, Lossi AM, Bayle J, Bertrand Y, Fontes M. Mutation screening of the *PKD1* transcript by RT-PCR. *J Med Genet* 2002;39(6):422-9.

30. Mizoguchi M, Tamura T, Yamaki A, Higashihara E, Shimizu Y. Mutations of the *PKD1* gene among Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients, including one heterozygous mutation identified in members of the same family. *J Hum Genet* 2001;46(9):511-7.
31. Rungroj N, Thongnoppakhun W, Vareesangthip K, Sirinavin C, Willairat P, Yenchitsomanus PT. Molecular defect of *PKD1* gene resulting in abnormal RNA processing in a Thai family. *J Med Assoc Thai* 2001;84(9):1308-16.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Thongnoppakhun W, Limwongse C, Vareesangthip K, Sirinavin C, Bunditworapoom D, Rungroj N, Yenchitsomanus P. Novel and *de novo* PKD1 mutations identified by multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP). BMC Medical Genetics (Open Access) 2004, 5:2

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงสาธารณะ** มีเครือข่ายความร่วมมือเกิดขึ้นกับแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโรคไต และรังสีแพทย์ภายในคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
 - ผศ. นพ. เกรียงศักดิ์ วารินสงทิพย์ สาขาวิชาโรคไตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
 - ผศ. พญ. วลัยลักษณ์ ชัยสุตร สาขาวิชารังสีวินิจฉัย ภาควิชารังสีวิทยา
- **เชิงวิชาการ**
 - มีการพัฒนาวิธีการศึกษามีวเตชันโนยีนอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคพันธุกรรมหลายโรคโดยอาศัยหลักการที่ใช้ศึกษาเป็น PKD1 เป็นต้นแบบ
 - สร้างนักวิจัยใหม่จากนักศึกษามัธยมศึกษาลัย หลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งอยู่ระหว่างการทำวิทยานิพนธ์เรื่อง "โรคถุงน้ำในไตชนิดถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น: การศึกษาระดับโมเลกุลของยีน PKD1 ในผู้ป่วย (Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): a molecular study of PKD1 gene in Thai patients)"

3. อื่น ๆ

3.1 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ:

- Thongnoppakhun W, Limwongse C, Vareesangthip K, Rungroj N, Sirinavin C, Yenchitsomanus P. Application of long RT-PCR for mutation analysis of PKD 1 in Thai families with autosomal dominant polycystic kidney disease. The 4th HUGO Pacific Meeting and 5th Asia-Pacific Conference on Human Genetics, Ambassador City Jomtien, Pattaya, Chonburi, Thailand, October 27-30, 2002

3.2 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ:

- วรรณาทองนพคุณ, ดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ, วรรณวรงค์ ศิริโอคปิ, นิภูวรรณ รุ่งโรจน์, เพท่าย เย็นจิตโสมนัส, จินตนา ศิรินาวิน, ชนินทร์ ลีม่วงส์. การวินิจฉัยโรคไตเป็นถุงน้ำชนิดเด่น (ADPKD) โดยใช้เทคโนโลยีทางอณูพันธุศาสตร์ นำเสนอในงานประชุมวิชาการกรมการแพทย์ ประจำปี 2546 ระหว่างวันที่ 8-10 กันยายน พ.ศ. 2546 ณ โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ
- ดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ, วรรณาทองนพคุณ, วรรณวรงค์ ศิริโอคปิ, ชนินทร์ ลีม่วงส์, จินตนา ศิรินาวิน, เกรียงศักดิ์ วารินสงทิพย์, วลัยลักษณ์ ชัยสุตร, เพท่าย เย็นจิตโสมนัส. มีวเตชันชนิดที่เกิดซ้ำในยีน polycystic kidney disease 1 (PKD1) ในผู้ป่วยไทย (Recurrent mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene in Thai patients) นำเสนอในงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13 "พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน" ระหว่างวันที่ 5-7 มิถุนายน พ.ศ. 2546 ณ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ พิษณุโลก

3.3 บทควมวิชาการและเอกสารสำหรับเผยแพร่

- เอกสารประกอบการอบรมระยะสั้น "Molecular and Genetic Medicine in Medical Practice: Present and Future" เรื่อง "Molecular and Genetic Basis of Single-Gene Disorders: The Implication for Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease" ระหว่างวันที่ 21-23 สิงหาคม 2545 ณ ห้องประชุมตึกศิษย์เก่าแพทย์ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
- เอกสารเผยแพร่วิชาการเกี่ยวกับโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant สำหรับผู้ป่วยและครอบครัว

4. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

- สำหรับครอบครัวผู้ป่วยโรค ADPKD ที่ผลการศึกษาทางห้องปฏิบัติการสามารถระบุชนิดมิวเตชันในยีน *PKD1* ได้แล้วนั้น แพทย์เวชพันธุศาสตร์ได้นำไปใช้ประโยชน์ในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling) แก่สมาชิกครอบครัวดังกล่าว ในแง่ต่าง ๆ อาทิ การวินิจฉัยแยกโรค การวินิจฉัยโรคก่อนมีอาการ การพยากรณ์โรค และการตัดสินใจเลือกผู้บริจาคไต (kidney donor) ให้ผู้ป่วย
- การนำวิธีการตรวจมิวเตชันในยีน *PKD1* แบบเจาะจง (specific mutation detection) ที่พัฒนาขึ้นสำหรับมิวเตชันที่ทราบชนิดแล้วไปประยุกต์ใช้ตรวจแบบทางลัดในผู้ป่วย ADPKD ครอบครัวอื่น ๆ ที่ยังไม่ทราบชนิดมิวเตชัน

ภาคผนวก (Appendix)

1. Reprint:

Thongnoppakhun W, Limwongse C, Vareesangthip K, Sirinavin C, Bunditworapoom D, Rungroj N, Yenchitsomanus P. Novel and *de novo* *PKD1* mutations identified by multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP). *BMC Medical Genetics* 2004, 5:2

2. โปสเตอร์และบทคัดย่อเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ:

Thongnoppakhun W, Limwongse C, Vareesangthip K, Rungroj N, Sirinavin C, Yenchitsomanus P. Application of long RT-PCR for mutation analysis of *PKD 1* in Thai families with autosomal dominant polycystic kidney disease. The 4th HUGO Pacific Meeting and 5th Asia-Pacific Conference on Human Genetics, Ambassador City Jomtien, Pattaya, Chonburi, Thailand, October 27-30, 2002

3. โปสเตอร์และบทคัดย่อเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ:

3.1 วรณา ทองนพคุณ, ดวงมล บัณฑิตวรภูมิ, วรณวรงค์ หิริโอคปิ, นัญวรรณ รุ่งโรจน์, เพทาย เย็นจิตโสมนัส, จินตนา ศิรินาวิน, ชรินทร์ ลิมวงค์. การวินิจฉัยโรคไตเป็นถุงน้ำชนิดเด่น (ADPKD) โดยใช้เทคโนโลยีทางอณูพันธุศาสตร์ นำเสนอในงานประชุมวิชาการกรมการแพทย์ ประจำปี 2546 ระหว่างวันที่ 8-10 กันยายน พ.ศ. 2546 ณ โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ

3.2 ดวงมล บัณฑิตวรภูมิ, วรณา ทองนพคุณ, วรณวรงค์ หิริโอคปิ, ชรินทร์ ลิมวงค์, จินตนา ศิรินาวิน, เกรียงศักดิ์ วาริแสงทิพย์, วลัยลักษณ์ รัชบุตร, เพทาย เย็นจิตโสมนัส. มิวเตชันชนิดที่เกิดซ้ำในยีน polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) ในผู้ป่วยไทย (Recurrent mutations of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene in Thai patients) นำเสนอในงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13 "พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน" ระหว่างวันที่ 5-7 มิถุนายน พ.ศ. 2546 ณ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ จ. พิษณุโลก

4. บทความสำหรับเผยแพร่

4.1 เอกสารประกอบการอบรมระยะสั้น "Molecular and Genetic Medicine in Medical Practice: Present and Future" เรื่อง "Molecular and Genetic Basis of Single-Gene Disorders: The Implication for Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease" ระหว่างวันที่ 21-23 สิงหาคม 2545 ณ ห้องประชุมตึกศิษย์เก่าแพทย์ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

4.2 เอกสารเผยแพร่วิชาการเกี่ยวกับโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant สำหรับผู้ป่วยและครอบครัว

Research article

Open Access

Novel and *de novo* PKD1 mutations identified by multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP)

Wanna Thongnoppakhun¹, Chanin Limwongse^{1,2}, Kriengsak Vareesangthip³, Chintana Sirinavin^{1,2}, Duangkamon Bunditworapoom², Nanyawan Rungroj¹ and Pa-thai Yenchitsomanus*^{1,4}

Address: ¹Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand, ²Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand, ³Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand and ⁴Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

Email: Wanna Thongnoppakhun - slwtn@mucc.mahidol.ac.th; Chanin Limwongse - slchw@mucc.mahidol.ac.th; Kriengsak Vareesangthip - slkwn@mucc.mahidol.ac.th; Chintana Sirinavin - slcsr@mucc.mahidol.ac.th; Duangkamon Bunditworapoom - g4237439@student.mahidol.ac.th; Nanyawan Rungroj - nrungroj@yahoo.com; Pa-thai Yenchitsomanus* - gppe@mucc.mahidol.ac.th

* Corresponding author

Published: 03 February 2004

Received: 20 November 2003

BMC Medical Genetics 2004, 5:2

Accepted: 03 February 2004

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/5/2>

© 2004 Thongnoppakhun et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

Abstract

Background: We have previously developed a long RT-PCR method for selective amplification of full-length PKD1 transcripts (13.6 kb) and a long-range PCR for amplification in the reiterated region (18 kb) covering exons 14 and 34 of the PKD1 gene. These have provided us with an opportunity to study PKD1 mutations especially in its reiterated region which is difficult to examine. In this report, we have further developed the method of multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) for analysis of PKD1 mutations in the patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Novel and *de novo* PKD1 mutations are identified and reported.

Methods: Full-length PKD1 cDNA isolated from the patients with ADPKD was fractionated into nine overlapping segments by nested-PCR. Each segment was digested with sets of combined restriction endonucleases before the SSCP analysis. The fragments with aberrant migration were mapped, isolated, and sequenced. The presence of mutation was confirmed by the long-range genomic DNA amplification in the PKD1 region, sequencing, direct mutation detection, and segregation analysis in the affected family.

Results: Five PKD1 mutations identified are two frameshift mutations caused by two di-nucleotide (c.5225_5226delAG and c.9451_9452delAT) deletions, a nonsense (Q1828X, c.5693C>T) mutation, a splicing defect attributable to 31 nucleotide deletion (g.33184_33214del31), and an in-frame deletion (L3287del, c.10070_10072delCTC). All mutations occurred within the reiterated region of the gene involving exons 15, 26, 15, 19 and 29, respectively. Three mutations (one frameshift, splicing defect, and in-frame deletion) are novel and two (one frameshift and nonsense) known. In addition, two mutations (nonsense and splicing defect) are possibly *de novo*.

Conclusion: The MRF-SSCP method has been developed to analyze PCR products generated by the long RT-PCR and nested-PCR technique for screening PKD1 mutations in the full-length cDNA. Five mutations identified were all in the reiterated region of this gene, three of which were novel. The presence of *de novo* PKD1 mutations indicates that this gene is prone to mutations.

Background

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD; MIM# 173900) is a potentially fatal disease and one of the most common inherited disorders in humans, affecting approximately 1 per 1,000 individuals. The characteristic abnormality is the presence of multiple fluid-filled cysts in both kidneys causing defective functions, ultimately leading to end stage renal disease (ESRD) [1]. Liver cysts and other extra-renal manifestations such as cerebral aneurysm and mitral valve defect, can also be observed [2]. Two known genes are responsible for this disease: *PKD1* (MIM# 601313) at 16p13.3 [3-6] and *PKD2* (MIM# 173910) at 4q21-23 [7]. The presence of the third locus responsible for this disease is still controversial [8,9]. A majority of cases (85%) is caused by mutations in *PKD1*.

PKD1 gene spans >50 kb of genomic DNA, containing 46 exons and transcribing ~14-kb mRNA [3-6] that encodes a large membrane-associated glycoprotein, polycystin-1, comprising 4,302 amino acids. The protein possibly participates in the signal-transduction pathway by coordinating with polycystin-2, the product of *PKD2*, in mediating mechanosensory calcium mobilization by function as flow-sensitive mechanosensors in the primary cilium of renal epithelium [10]. A failure of fluid-flow sensation of the cells may disturb tissue morphogenesis, triggering abnormal cell proliferation and cyst formation. Renal cysts are likely to develop after a second-hit or somatic mutation, which inactivates the inherited normal allele of the same locus, or occasionally an allele of another counterpart locus (i.e. *PKD2* or vice versa), giving rise to a trans-heterozygous event [11].

To date, at least 250 unique *PKD1* mutations have been identified as listed in the Human Gene Mutation Database (HGMD, <http://www.miml.s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120293.html>) [12] and also reported more recently [13-15]. Three-fourths of mutations in this gene result in truncated protein products, suggesting its inactivation or loss-of-function mechanism. Most previous studies have found unclear genotype-phenotype correlations for *PKD1* mutations. However, a recent report has shown the significant correlation between the position of mutation and disease severity (more severe in more 5' mutation), raising the questions whether *PKD1* mutations simply inactivate all products of the gene [16]. Mutation databases from worldwide population and additional experiments would be useful to unravel the precise mechanism by which *PKD1* mutations cause diverse phenotypes.

Analysis of *PKD1* mutations is labor-intensive, time-consuming, and expensive because of its large size, the presence of a very high GC content, and most severely the presence of more than six homologous genes, which are

highly homologous to the 5' region (exons 1-33) of *PKD1* [4,17]. The latter has made mutation detection in this gene much more difficult. The methods successfully developed for mutation analysis of this gene are based on discrimination of *PKD1* from the non-functional homologous genes, by enrichment of *PKD1* sequence while suppressing the homologous ones to undetectable levels. *PKD1* mutations occur throughout the gene with apparently no mutational "hot-spots", rendering characterization of all disease causing *PKD1* mutations in various ethnic groups essential for comprehension of molecular mechanism of the disease and for providing diagnostic genetic testing. Our group aim to fulfill *PKD1*-mutation database of Thai patients and have previously developed a long RT-PCR technique for isolation of the entire coding sequence of *PKD1* (~13 kb) for the analysis of its mutations without interference from the homologous sequences [18]. The analysis of *PKD1* transcript provides an opportunity for *ex vivo* study of splicing defects prior to identification of causative mutations. In addition, a long-range PCR (LR-PCR) for amplification of *PKD1*-specific genomic sequence with the length of about 18 kb in the reiterated region covering exons 14-33 has also been established for further analysis of *PKD1* [19]. Using these techniques, we have previously identified and reported two mutations causing splicing defects of *PKD1* transcripts in Thai families with ADPKD [19,20].

To increase efficiency of screening and identification for other types of mutations in the reiterated region of *PKD1*, we have further developed a multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) method [21], in addition to the long RT-PCR and LR-PCR techniques. Since the SSCP method is more efficient for screening mutation in a short fragment (less than 300 bp), we used different sets of restriction endonucleases for digestions of each *PKD1*-cDNA segment so that the entire segment was efficiently screened. We have applied this procedure for screening and identifying *PKD1* mutations in Thai patients with ADPKD. Here, we report three novel and two recurrent mutations of *PKD1* identified in Thai patients; two mutations are possibly *de novo*.

Methods

ADPKD families and linkage study

Ten unrelated Thai families with ADPKD attending our clinics at Divisions of Medical Genetics and Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Bangkok, were included in this study. ADPKD was diagnosed according to established clinical and genetic criteria [22]. Research investigation was conducted in accordance with the Faculty of Medicine Siriraj Hospital Ethics Committee's guidelines and in accordance with the Helsinki Declaration. Blood samples were collected after informed consent for RNA and DNA preparations. Link-

Table 1: PCR primers and conditions for amplifications of PKD1 cDNA and DNA

Primer	Primer Sequences (5'→3')	Nucleotide Position	Location in PKD1 Transcript	PCR Product Size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Mg ²⁺ Conc. (mM)
cDNA amplification						
TH1F	CTGGGGACGCGCGGGCCATGCC	173-198*	5' UTR	13,634	48	1.2
TH1B	GGCCTGGGGCAAAGGAGGATGACAA	13888-13784*	3' UTR			
S1F	ACGGCGGGGCCATGCGCGCGCTGCCCTAAC	181-210*	5'UTR	1,554	72	3.0
S1B	CAGTCTCGGCTGTGGCTGGTGTGGCTCC	1734-1705*	Exon 7			
S12F	AGGAGCCTAGACGTGTGGATCG	1585-1616*	Exon 6-7	1,478	65	1.5
S12B	CCTGCATCCTGTTCATCCGCTC	3273-3251*	Exon 13			
S13F	CATCAACGACAAGCAGTCCCT	3115-3135*	Exon 12	1,575	60	1.5
S13B	CCACGCGCCACAGCAGAGAA	4489-4670*	Exon 15			
S14F	ATCTCTGCTGCCAATGACTCAG	4542-4583*	Exon 15	1,473	60	1.5
S14B	GGGGAAGCTGTGGGAGAAAC	6034-6015*	Exon 15			
S15F	TCAATGCCCTCAACGCGAGTCAGC	5888-5830*	Exon 15	1,463	65	1.5
S15B	GTCTCATCCAGCACCAGCTCTTG	7470-7447*	Exon 18			
S16F	AGCAGCGGCTCCAAAGCGAG	7480-7418*	Exon 17	1,506	65	3.0
S16B	CACAACGGAGTTGGCGGAGT	8935-8884*	Exon 23			
S17F	CCTTTCCCTTTGGCTATATCAG	8709-8736*	Exon 23	1,518	60	1.5
S17B	CCAGGTAGACGGGATAGACAAC	10236-10286*	Exon 30			
S18F	GCCACCTGCTGGCTTCTCT	10052-10071*	Exon 29	1,539	65	1.5
S18B	CGTCCCGAGCCATTGTGAG	11590-11571*	Exon 40			
S19F	CTTCAGCACCGGATTACGAGCTT	11533-11557*	Exon 40	1,650	65	1.5
S19B	AGAAAGTAATACTGAGCGGTGTGCACTC	13182-13155*	3' UTR			
Genomic DNA amplification						
S23.1F	GCAACGTCACCGTGAAGTACAACGTAAACCG	26348-26369*	Exon 13	18,099	41	1.0
Ex34B	GAGCAGGTCCDTTTCATGTGGGTGTCTTG	44438-44409*	Exon 34			
S14.2F	CTTCCCCACCAACCACCGGTACAGC	29064-29039	Exon 15	486	42	1.0
S14.2B	AGGCCACTCAGGCGACCTGCACATC	29523-29498	Exon 15			
S14.1F	AGCCAAAGCCACCGTGGAA	29476-29494*	Exon 15	372	40	1.5
S14.1B	CAGGCCAGCAGGATCTGAAAATG	29847-29825*	Exon 15			
S16.1F	CGCTGTGCAGGCCCTCACCACCAAGGT	32835-32861*	Exon 18	480	40	1.5
S16.1B	GTGCAGCCAGACTGTGAGCCCGTTGC	33314-33288*	Exon 20			
S17.1F	GGAGTTACCATCTGAACCTCTCCAG	38178-38002*	Exon 25	698	60	1.0
S17.2B	CAGGATGAACACACGAGCCCTTGACAC	39675-39649*	IVS 26			
S18L	TTCTTTGACAAGCAGATCTGGC	41600-41579	Exon 29	326	57	1.0
S17B	CCAGGTAGACGGGATAGACAAC	41915-41894	Exon 30			

*The nucleotide positions are according to HUMPKD1A, GenBank Accession No. L33243. *The nucleotide positions are according to HUMPKD1GEN, GenBank Accession No. L39891. Bold faces are primers for long-range PCR of which products were used as PKD1-specific templates for nested PCRs.

age analysis was performed by using 5 polymorphic DNA markers on chromosome 16p including D16S85 (3' HVR), SM7, 16AC2.5, SM6, and K8 as previously described [19].

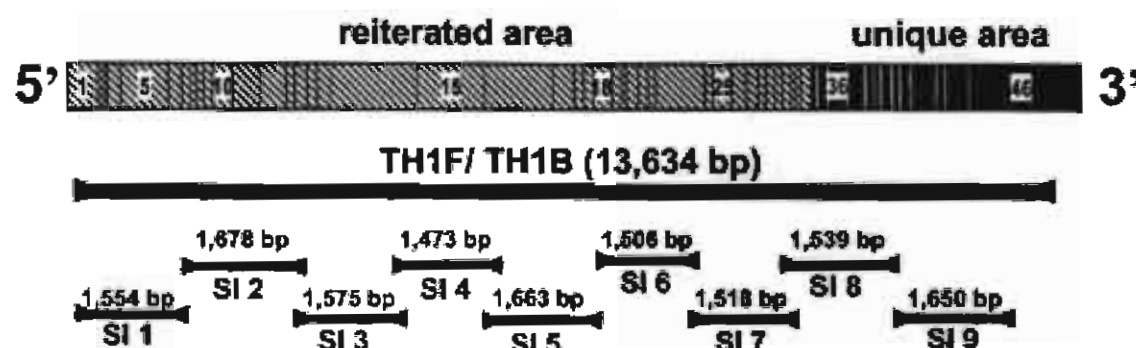
Full-length PKD1 cDNA amplification by long RT-PCR

RNA prepared from fresh blood sample was used for full-length PKD1 cDNA (~13 kb) amplification by long RT-PCR. The full-length cDNA was then fractionated into nine overlapping fragments by nested-PCR methods as previously described [18]. The sizes of nested-PCR fragments were 1,473-1,678 bp (Table 1 and Figure 1A). The product with abnormal size as shown by agarose gel electrophoresis was further analyzed by restriction endonuclease mapping and sequencing to directly identify abnormal RNA splicing.

Screening of PKD1 mutation by MRF-SSCP

The nested-PCR fragments from PKD1 cDNA showing no abnormality in size were further screened for mutation by a multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) method. This method firstly developed by Lee et al. [21] was modified to use silver staining instead of radioactive detection. A relatively large PCR-product (1-2 kb) for SSCP method could be analyzed since it was fractionated into several short fragments by combined digestions with restriction endonucleases. The restriction enzymes were selected by consideration of their restriction maps on the sequences so that each digestion produced 6-7 fragments with the average size about 200-300 bp and resulted in a discrete size distribution on the SSCP gel. Each nested-PCR fragment was digested with at least two sets of combined restriction endonucleases to generate overlapping-digested products, in order to approximate the position of

A. Maps of long RT-PCR and 9 overlapping nested PCR in *PKD1* mRNA



B. Maps of long-range PCR amplification of *PKD1* DNA

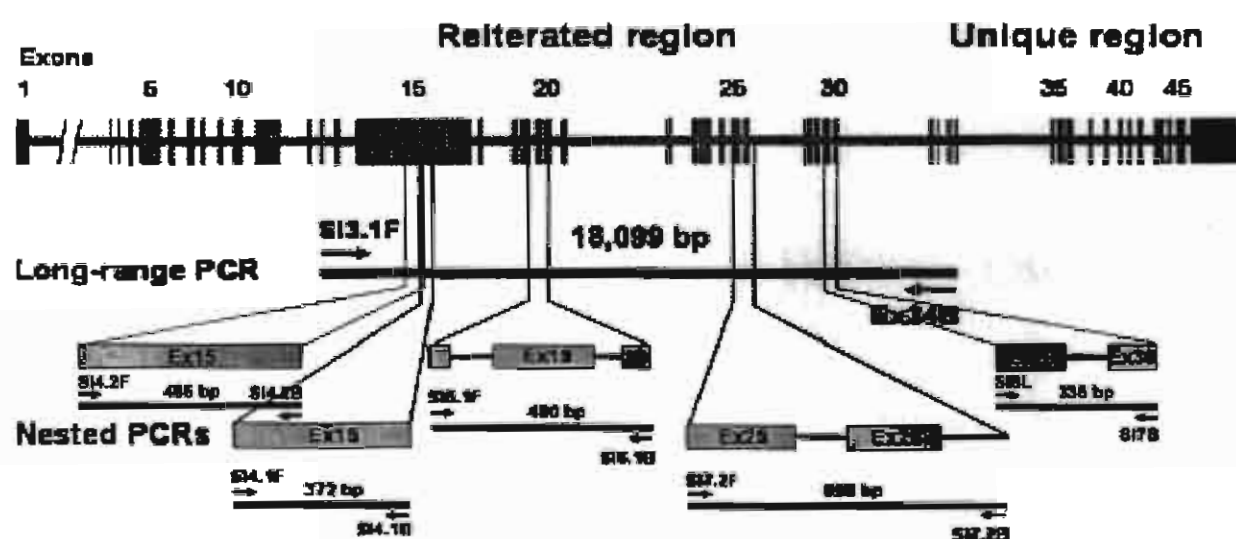


Figure 1

A. Schematic illustration of *PKD1* mRNA, long RT-PCR product, and nine overlapping nested-PCR fragments (SI 1–SI 9) used for the MRF-SSCP analysis. B. Maps of the regions in *PKD1* amplified by long-range PCR and nested-PCR.

mutation in the shifted fragment on the SSCP gel (Table 2).

The digestion of nested-PCR fragments was performed in a final volume of 25 μ l, containing 10 μ l of DNA, 2.5 μ l of 10 $\times$ buffer, and 2–5 units of enzymes (e.g. *Ava* II + *Hinf*

I or *Bgl* I + *Hha* I), in the presence or absence of BSA. The reaction mixture was incubated either at 37, 60 or 65°C according to the enzymes used and following the manufacturer's recommendations. Five μ l of the digested-PCR product were mixed with 5 μ l of 5 $\times$ TBE and 10 μ l of SSCP-loading dye (95% formamide, 0.05% bromophenol

Table 2: MRF-SSCP for mutation analysis of the full-length PKD1 cDNA

PCR Fragment from PKD1-cDNA	Size (bp) before endonuclease digestion	Restriction endonuclease used	Restriction fragment length (bp) in MRF-SSCP (5' > 3')
SI 1	1,554	Pvu II+Xcm I+Ava II	209, 318, 99, 249, 294, 385
SI 2	1,678	Afl III+Sac I+Ava II	209, 282, 384, 238, 312, 129
		Pvu II+Hinf I	429, 93, 344, 277, 295, 218
SI 3	1,575	Sma I+Bgl I	108, 245, 292, 605, 123, 306
		Bgl I+Hinf I	233, 81, 424, 198, 325, 202, 112
SI 4	1,473	Taq I	429, 215, 187, 243, 501
		Bgl I+Hinf I	131, 159, 96, 380, 108, 476, 123
SI 5	1,663	Ava II	178, 252, 475, 204, 253, 111
		Sau3A I+Bgl I	127, 387, 377, 188, 224, 169, 189
SI 6	1,506	Ava II+Bgl I	114, 324, 423, 216, 141, 85, 358
		Ava II+Bgl I	173, 307, 294, 402, 187, 143
SI 7	1,518	BstU I+BstE II	313, 344, 265, 190, 70, 239, 85
		BstU I+Hinf I	112, 287, 424, 389, 201, 105
SI 8	1,539	Ava II+Hinf I	197, 202, 398, 315, 192, 109, 105
		Pvu II+Pvu I+BstE II	337, 199, 233, 505, 218, 185
SI 9	1,650	Taq I+Bgl I	190, 141, 222, 344, 474, 98, 208
		Pvu II	190, 351, 81, 180, 453, 135, 12, 248
		Taq I+Bgl I	288, 318, 197, 529, 84, 234

blue, 0.05% xylene cyanol, 20 mM EDTA and 10 mM NaOH). The total mixture was heat-denatured at 95°C for 10 min before loading onto the vertical electrophoresis set (size: 17 × 15 × 0.8 cm³) of 10% polyacrylamide gel containing 5% glycerol. The electrophoresis was run at a constant current (20 mA) and room temperature for 4–7 h; the running time was longer for a larger size of the digested fragments. DNA fragments on the gel were stained with silver nitrate [23]. After that, the gel was placed between two sheets of cellophane, left at room temperature to dry, and kept as a record.

The fragment with mobility shift was amplified with a newly designed pair of primers. The PCR product was purified and subjected to a direct sequencing using ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and ABI PRISM 310 Automated DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Genomic DNA analysis

A long-range PCR (LR-PCR) was performed to amplify genomic DNA in the PKD1 region covering the nucleotide positions 26340–44438 (18,099 bp). The amplified product was then used as template for nested-PCRs (Figure 1B). The primers used for nested-PCRs are listed in Table 1. The methods for LR-PCR and nested-PCR have been previously described [19]. Briefly, the reaction was performed in a total volume of 25-μl containing 2 μl of the diluted LR-PCR product, 400 nM of each primer, 200 μM dNTP mixture, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.25 unit AmpliTaqGold™ (PE Applied Biosystems) or

IMMOLASE™ DNA polymerase (Bioline USA Inc.), 10% DMSO, and an optimal concentration of MgCl₂. The nested-PCR product was purified for DNA sequencing to confirm the nucleotide change observed in the PKD1 cDNA.

Once the mutation was identified, a simple detection method was developed for direct mutation and segregation analysis in the affected family. In addition, the mutation was examined in 56 DNA samples from unrelated normal individuals (112 chromosomes). The disease-causing mutation should not be observed in these normal DNA samples.

Results

Of ten families studied, ADPKD was found to be PKD1-linked or probable PKD1-linked by linkage (haplotype) analysis using 5 polymorphic markers in the PKD1 region on chromosome 16p in eight families. The results of haplotype analysis in two families were inconclusive because of small number of family members.

The RNA samples from the probands of these ten families were analyzed by the long RT-PCR and nested-PCR methods. The result showed an about 200 bp shorter nested-PCR fragment (SI 6) of PKD1 cDNA from the proband (II-3) of family PK066, indicating an abnormal PKD1-mRNA splicing. No abnormality in size was, however, observed for all nested-PCR fragments of PKD1 cDNA from the other probands; they were then further analyzed by the MRF-SSCP method. A nonsense mutation and small dele-

Table 3: PKD1 mutations in Thai families identified by our group

Family	Mutation	Location	RNA Splicing Defect (experimentally determined)	Effect on Polycystin-1 (theoretically deduced)	Reference
PK015 ^a	IVS13-2A>T	IVS13	Del the first 74 nt of exon 14	FS at 1055 (PKD IV-terminal deletion)	Thongmopaldhun et al., 2000 [19]
PK039 ^a	c.5225_5226delAG (g.29124_29125delAG)	Exon 15	-	FS at 1672 (PKD XI-terminal deletion)	This study, Waznick et al., 1999[24], Rossetti et al., 2002 [15]
PK031 ^{a,b}	Q1828X (c.5693C>T)	Exon 15	-	Stop at 1828 (PKD XIII-terminal deletion)	This study, Rossetti et al., 2002 [15]
PK066 ^a	g.33184_33214del31 (31bpE19119-2 to E19119+29 or c.7913_7914+29del31)	Ex19-IVS19	Exon 19 skipping	FS at 2498 (RE) module-terminal deletion)	This study (Novel)
PK069 ^a	c.9451_9452delAT (g.39376_39377delAT)	Exon 26	-	FS at 3082 (TM 1-terminal deletion)	This study (Novel)
PK002 ^a	L3287del (c.10070_10072delCTC or g.41669_41671delCTC)	Exon 29	-	Inframe deletion of L3287 (TM 2)	This study (Novel)
PK009 ^a	IVS43+14del20	IVS43	Exon 43 skipping	Inframe deletion of 3904-4001 (TM 7-9)	Rungroff et al., 2001 [20]

^a Segregation of mutation with disease phenotype ^b De novo mutation is likely. Reference sequences for DNA and mRNA of PKD1 are GenBank Accession No. U39891 and U33243, respectively.

tions causing either frameshift or inframe translations were identified in the probands of four families. The details of mutation identified in the five probands and their families are summarized in Table 3 and described below.

Splicing defect

The proband (II-3) of family PK066 was the only one in this family who had the disease with chronic renal failure at the age of 54 years. His father died from coronary heart disease at the age of 70 years and his mother was still healthy at the age of 81 years. It was possible that the haplotype carrying defective PKD1 in the patient might be inherited from his father (data not shown). As it seems that the father did not have the disease, a *de novo* PKD1 mutation in this family was suspected. The analysis of nested-PCR fragments of PKD1 cDNA from the proband (II-3) of this family showed a possible deletion of about 200 bp in one fragment (SI 6), which was amplified by SI6F/SI6R primers (in the region between the nucleotides 7400 and 8905), in one allele. The location of possible deletion site was examined by restriction endonuclease mapping on the nested-PCR fragment (data not shown) and by amplification with additional pair of primers (SI6.1F/SI6.1B), covering between the nucleotides 7657 and 7978 in the region of exons 18-20, for direct sequencing. The results showed that an entire sequence of exon 19 was missing from the deleted nested-PCR fragment (Figure 2A). Further analysis of genomic DNA of PKD1 revealed a novel 31-bp deletion in the region between the nucleotides 33184-33214 (g.33184_33214del31),

involving the last two nucleotides of exon 19 and twenty-nine nucleotides in the first part of intron 19, causing skipping of all sequence of exon 19 (Figure 2A and 2B).

Direct detection of this 31-bp deletion in genomic DNA samples of the family members could be conducted by LR-PCR of PKD1 and nested PCR using the pair of SI6.1F/SI6.1B primers. The result showed that only the proband carried this novel deletion; none of other six family members including the patient's mother had the mutation; thus, it is likely to be a *de novo* PKD1 mutation (Figure 2C).

Nonsense mutation

In family PK031, the proband (I-1) was 55 years old who had ADPKD at 43 years. His son and daughter also had multiple renal cysts; however, other 55 members in the family were not affected by this disease, indicating that the proband had a *de novo* PKD1 mutation that was inherited to his son and daughter. The MRE-SSCP analysis of nested-PCR fragment amplified with SI4F/SI4B primers (fragment SI 4) from PKD1 cDNA of the proband (I-1) of the family PK031 showed mobility shifts of restriction fragments digested with Bgl I + Hha I and also with Ase II (Figure 3A). These were also confirmed by the SSCP analysis of individual restriction fragments isolated from agarose gels before the analysis (data not shown). The mobility shifts occurred within the restriction fragments with the sizes of 476 and 253 bp when digested with Bgl I + Hha I and with Ase II, respectively (Figure 3A), corresponding to nucleotides between the positions 5670 and

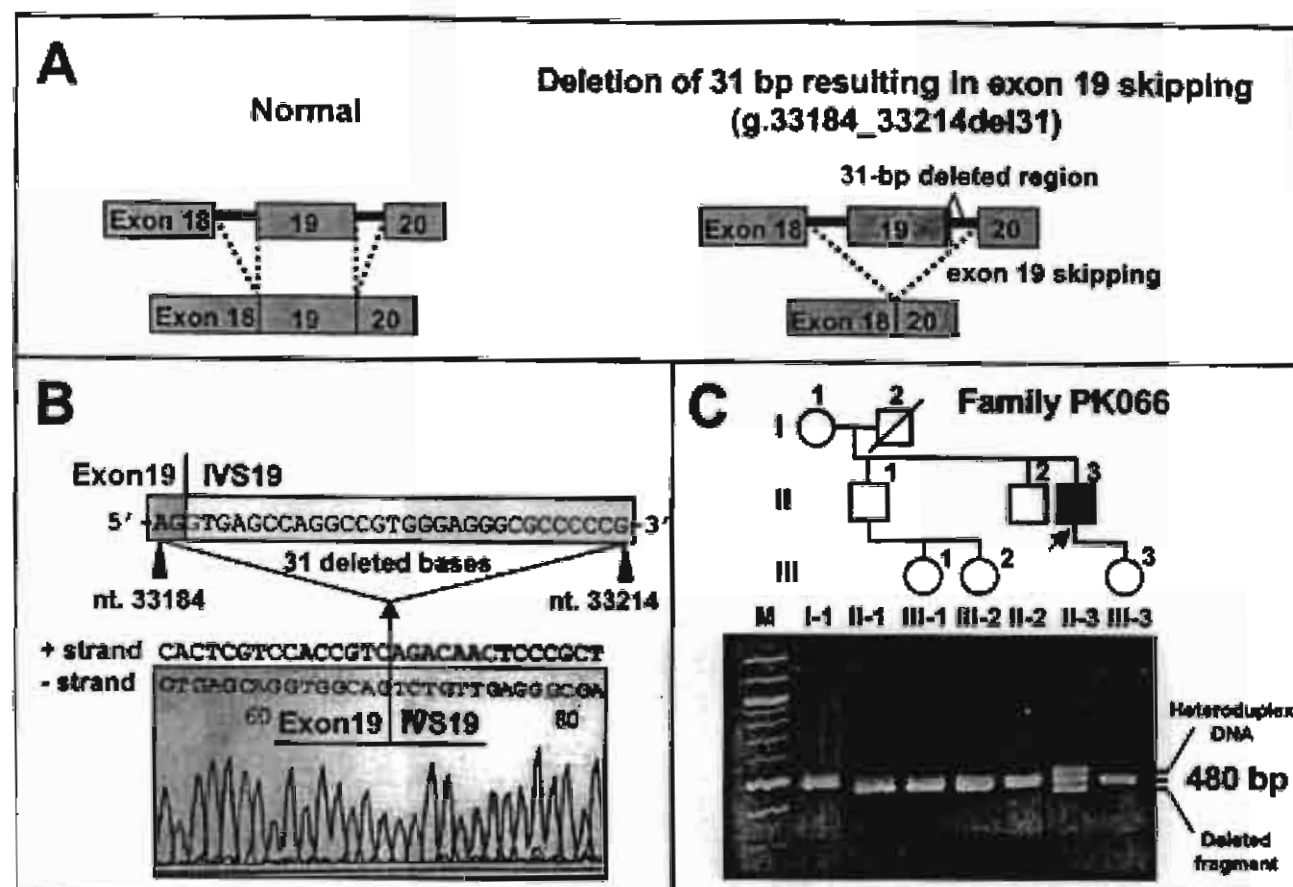


Figure 2

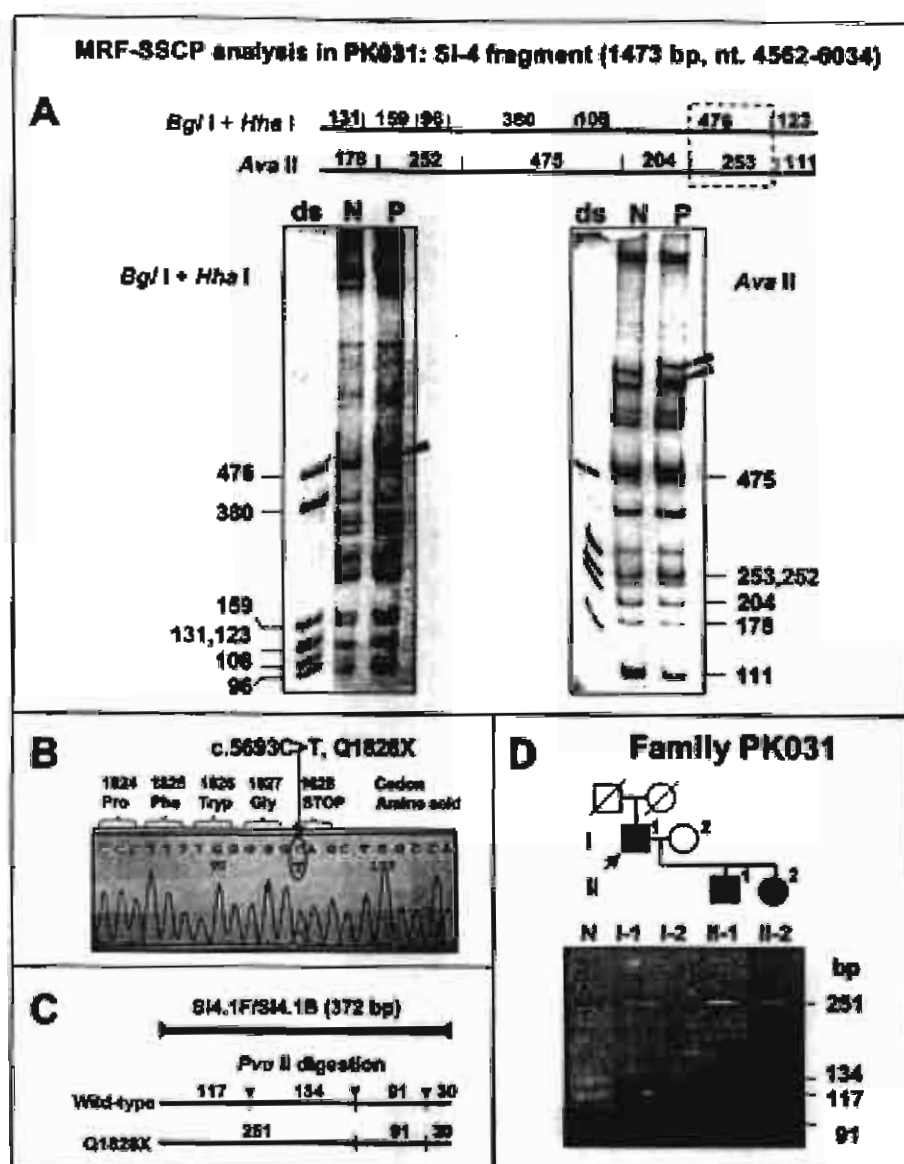
Novel PKD1-splicing defect identified in family PK066. **A.** Diagram showing splicing defect resulted from a deletion of 31 bp in PKD1. The deletion of 31 bp (g.33184_33214del31) involves the end of exon 19, splice-donor site and a part of intron 19, resulting in exon 19 skipping in the PKD1-RNA transcripts. **B.** Direct sequencing analysis of PKD1-genomic DNA from the proband. The sequencing result shows the 31-nucleotide deletion including the two last nucleotides in exon 19 and the first twenty-nine nucleotides in adjacent intron 19 (g.33184_33214del31) as compared with the sequence of HUMPKD1GEN, GenBank Accession No. U39891. **C.** Direct detection of the 31-bp deletion (g.33184_33214del31) in the family PK066. The detection of 31-bp deletion (g.33184_33214del31) in members of the family PK066 was directly performed by genomic DNA amplification. Only the proband (II-3) in this family carries the deletion. M represents 100 bp ladder-DNA markers.

5911 of PKD1 cDNA. The sequence in this region was selectively amplified by a new pair of primers (S14.1F/S14.1B) for sequencing analysis. A single nucleotide substitution (c.5693C>T) resulting in a nonsense mutation where a codon for glutamine (CAG) was changed to a stop codon (TAG) at the position 1828 (Q1828X) in exon 15 of PKD1 was observed (Figure 3B). The mutation with the nucleotide substitution was confirmed by sequencing analysis of the PKD1 gene (g.29591C>T). This mutation abolishes a restriction site of Pvu II endonuclease.

Mutation segregation study by Pvu II digestion in the PK031 family demonstrated that three affected members (I-1, II-1, and II-2) carried this mutation while one non-affected member (I-2) did not (Figure 3C and 3D).

Frameshift mutations

In family 039, the proband (I-2) had polycystic kidney disease at the age of 48 years and died of renal failure one year later. The patient's sister (I-1) and her daughter (II-1) were diagnosed as having the disease at 55 and 38 years, respectively. Two (I-1 and I-2) out of three affected persons in this family exhibited renal stone. The patient's sis-

**Figure 3**

Nonsense mutation (Q1828X) identified in family PK031. **A.** MRF-SSCP analysis in SI 4 fragment from the patient of family PK031. The restriction maps of *Bgl* I + *Hha* I and *Ava* II digestions of SI 4 fragment (upper). The dotted square area indicates the region with mobility shifts in the MRF-SSCP analysis of SI 4 fragment from the patient. The SSCP patterns (lower) of SI 4 fragment digested with *Bgl* I + *Hha* I (left) and *Ava* II (right) show mobility shifts of single-stranded DNAs (pointed) in the patient's sample (P) compared with that of normal control (N). Double-stranded DNA fragment-size markers (ds) were included for each set. The mobility shifts were observed in the fragments with the sizes of 476 bp in the first set and 253 bp in the second one. The two fragments were located in the same region within the positions 5670–5911. **B.** Direct sequencing analysis of *PKD1*-cDNA from the patient of family PK031. The sequencing profile shows a nucleotide substitution (c.5693C>T), resulting in a nonsense mutation; CAG (glutamine) was changed to TAG (stop) at codon 1828 (Q1828X). **C.** Restriction map of RFLP analysis for g.29591C>T (Q1828X) in *PKD1*-genomic DNA. Four DNA fragments with the sizes of 117, 134, 91 and 30 bp are obtained from the normal allele, whereas only 3 fragments with the sizes of 251, 91 and 30 bp are generated from the mutant allele carrying the g.29591C>T mutation because of the loss of a *Pvu* II recognition site at the position 29593. **D.** Results of direct detection for g.29591C>T (or Q1828X) mutation by *Pvu* II digestion in members of the family PK031. The appearance of 251-bp fragment in I-1, II-1, and II-2 indicates the presence of Q1828X mutation. The mother (I-2) did not have the 251-bp fragment; thus, she did not carry the mutation. N is normal control sample digested with the same enzyme.

ter (I-1) also had severe hypertension causing serious headache but no intracranial aneurysm was detected by magnetic resonance angiography. The MRF-SSCP analysis of nested-PCR fragments amplified with SI4F/SI4B primers (SI 4) from PKD1 cDNA of an affected person (I-1) in this family revealed mobility shifts of restriction fragments digested with either *Ava* II or *Bgl* I + *Hha* I (Figure 4A). A deletion of AG di-nucleotides (c.5225_5226delAG) at codon 1672, resulting in a frameshift translation starting from this codon (Figure 4B) was finally identified. The di-nucleotide deletion was confirmed by sequencing of genomic DNA in exon 15 of PKD1 (g.29124_29125delAG). This mutation has been previously reported in many Caucasian families [15,24] and its correlation to cerebral aneurysm phenotype was questioned [24]. This mutation abolishes an *Eco*0109 I restriction site. Mutation segregation analysis by *Eco*0109 I digestion of amplified genomic DNA samples in the family PK039 showed that three affected members (I-1, I-2, and II-1) carried the mutation while a non-affected person (II-2) did not (Figure 4C).

The proband (II-1) of the family PK069 attended our renal clinics with the problem of end-stage chronic kidney disease at the age of 42 years. She was found to have polycystic kidney disease and since then she commenced on hemodialysis. Three of her siblings (II-2, II-3, and II-5) also had the disease but with normal renal function. Her father was still healthy at the age of 81 years. Her mother died of cervical cancer at the age of 38 years. PKD might be inherited from her mother. Mobility shifts were found in the MRF-SSCP analysis of SI 7 fragment from PKD1 cDNA of the proband (II-1) (Figure 4D). The final sequence analysis in both cDNA and PKD1-specific DNA indicated a deletion of AT at codons 3080 and 3081 (c.9451_9452delAT or g.39376_39377delAT), resulting in a frameshift translation starting from codon 3082 (Figure 4E). This mutation abolishes an *Afl* III restriction site. Analysis of the mutation by *Afl* III digestion in the available members of family PK069 demonstrated that all four affected persons (II-1, II-2, II-3, and II-5) carried the mutation while two unaffected members (I-1 and II-4) did not (Figure 4F).

In-frame deletion

The proband (II-2) of family PK002 was diagnosed as having ADPKD at 24 years old. He developed ESRD at the age of 50 years old and has been commenced on hemodialysis at frequency of three times a week since then. He is now aged 56 years old. His father (I-1) experienced a long-standing hypertension and died at the age of 52 years. His elder sister (II-1) manifested polycystic kidney disease at the age of 37 years. She is now aged 60, being suffered from chronic renal failure (serum creatinine level 6 mg/dl). Further ultrasound work-up

revealed renal cysts in 3 out of 7 members in the subsequent generation. Obvious mobility shifts in the MRF-SSCP analysis were observed in SI-7 PCR product from PKD1 cDNA of an affected member (II-1) of this family when compared with the normal counterparts (Figure 5A). Direct sequencing revealed an in-frame deletion of CTC from c.10070_10072 (or g.41669_41671), resulting in a single amino acid (leucine) deletion at the position 3287 (L3287del) (Figure 5B).

Sequence alignments of polycystin-1 among distant species from human through worm (*Caenorhabditis elegans*) reveal that L3287 is highly conserved (Figure 5C). In addition, screening in our control set of 112 normal chromosomes did not show the L3287del in PKD1. The L3287del mutation could directly be detected by the heteroduplex analysis of the amplified PKD1-specific fragment. The presence of L3287del mutation in five affected members (II-1, II-2, III-2, III-4, and III-6) but its absence in eight unaffected members of PK002 family were demonstrated (Figure 5D).

Single nucleotide polymorphisms

Using the MRF-SSCP analysis for screening the entire PKD1-cDNA sequence, we found a considerable number of mobility shifts of single-stranded DNA fragments. Many of these mobility shifts were not taken for further analysis because they were common in several patients as well as in normal control individuals. Thus, they were likely to be common single nucleotide polymorphisms (SNPs). In the cases that the mobility shifts were unique in the patients or in families possible to be mutations, they were then subjected to the detailed analysis. However, instead of being disease mutations, several SNPs in the PKD1 gene were identified as presented in Table 4.

Discussion

We have developed a long RT-PCR method for amplification and isolation of the entire PKD1-coding sequence from its RNA transcripts prepared from peripheral blood lymphocytes, avoiding the interference from transcripts of PKD1-homologous genes [18]. This amplified full-length PKD1 cDNA is a useful material for mutation analysis. Since the amplified product was originated from PKD1 mRNA, abnormal transcripts resulted from mutations causing defective RNA splicing can directly be analyzed without the requirement for additional expression experiment. In addition, this amplified product can also be used for analysis of other PKD1 mutations. An LR-PCR for genomic-DNA amplification of 18 kb covering exons 13-34 region of PKD1 has also been developed for confirmatory mutation analysis in genomic DNA [19]. In our previous works, we have demonstrated the use of long RT-PCR and nested-PCR procedure and LR-PCR method for characterization of two PKD1 mutations causing splicing

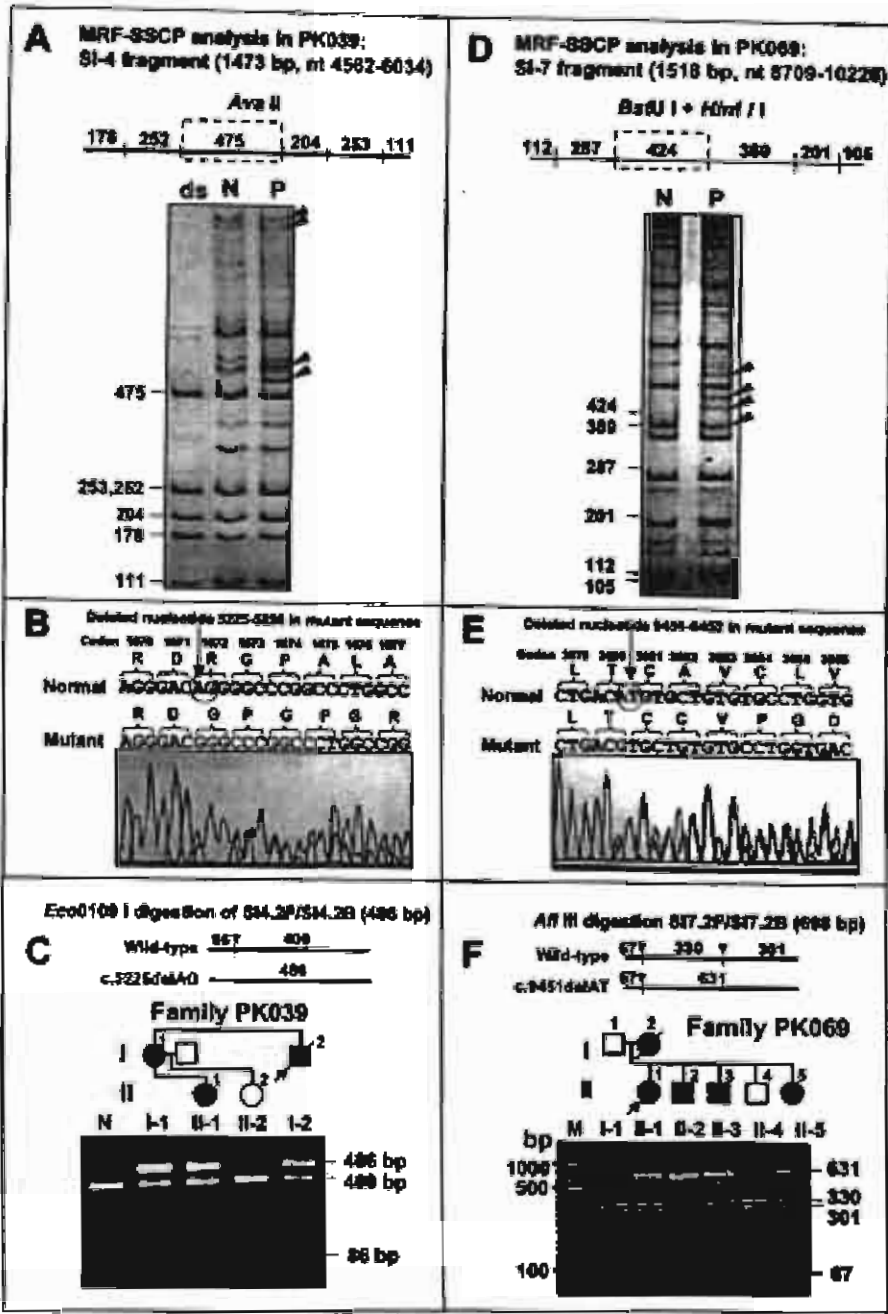


Figure 4
Frameshift deletions found in families PK039 (A-C) and PK069 (D-F). **A, D.** MRF-SSCP analyses of S1-4 and S1-7 fragments from the patients of families PK039 and PK069, respectively. The maps of restriction fragments obtained from digestions of PCR fragments by sets of endonucleases in two families are shown (upper). The MRF-SSCP analyses (lower) of the patients (P) from both families show mobility shifts of single-stranded DNAs (pointed) when compared with those of normal controls (N). These fragments are located in the dotted box of the upper map. **B, E.** Sequencing analyses of PKD1-cDNA from the two patients. The sequencing profiles of both families show different types of two nucleotide deletions (c. 5225_5226delAG and c.9451_9452delAT), resulting in frameshift translation, as compared with the normal sequence. **C, F.** Direct detection of the two deletions (g.29124_29125delAG and g.39376_39377delAT) in members of the families PK039 and PK069, respectively. The di-nucleotide deletions in PKD1 genomic-DNA in members of both families were detected by restriction analyses. The two mutations abolish recognition sites of Eco0109 I and Afl III, respectively. The presence of larger fragment in each case indicates the existence of mutation.

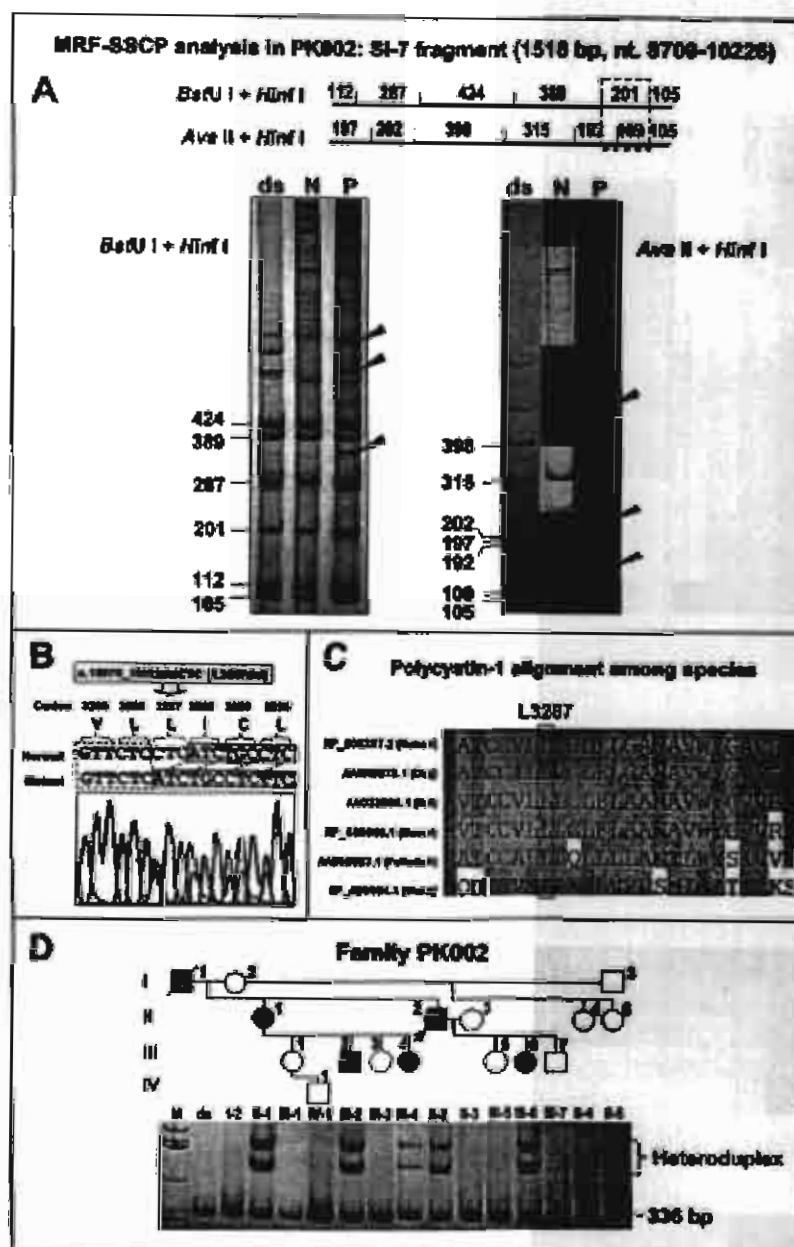


Figure 5
Novel in-frame deletion (L3287del) identified in family PK002. **A.** MRF-SSCP analysis of SI 7 fragment of the patient. The restriction map shows multiple fragment sizes obtained from digestions with two sets of restriction endonucleases (upper). The dotted square indicates the region with mobility shifts in the digested SI 7 fragment from the patient of family PK002. The SSCP patterns generated from digestions with two sets of enzymes (lower) and mobility shifts of single-stranded DNA (pointed) are shown. **B.** Direct sequencing analysis of PKD1-cDNA from the patient. The sequencing profile shows a deletion of three nucleotides (CTC; c.10070_10072del), resulting in an in-frame mutation. The CTC deletion causes missing of leucine at position 3287 in polycystin-1 (L3287del). **C.** Multiple sequence alignment of polycystin-1 from human, dog, rat, mouse, pufferfish and worm by using ClustalW program [33]. Amino acid residues around L3287 are shown. L3287 is highly conserved among distant species in which only in *C. elegans* that the residue is replaced by isoleucine, which is in the same group of amino acid. **D.** Direct detection for L3287del in members of the family PK002 by SSCP analysis. The L3287del could be detected by the presence of heteroduplex DNAs on the SSCP analysis. In the family PK002, five members carried the mutation while nine did not. M is standard DNA markers and ds is double-stranded DNA of a normal control.

Table 4: PKD1 polymorphisms detected in Thai population

Polymorphisms	Location	Nucleotide change	Amino acid change	Frequency (%)	Detection method	Presence in HGP*
c.1087C>T	Exon 29	g.4167C>T	C329C	66.4 (18/10)	BsaAI (+)	Yes
c.10120C>T	Exon 29	g.4171C>T	G330G	4.8 (3/10)	HphI (+)	Yes
c.10158G>A	Exon 30	g.4184G>A	S331N	15.5 (17/10)	Ssp1286I (+)	Yes
c.10318C>T	Exon 31	g.4266C>T	S336S	6.9 (1/14)	PvuII (-)	No
IVS41+20C>T	IVS41	g.4983C>T	-	1.0 (0/100)	ASAP	No

*Analyzed from multiple alignment of PKD1-genomic DNA with 6 homologous genes or pseudogenes [17,14]. +Allele specific amplification.

defects in two Thai families [19,20]. The advantage of simultaneous characterization of abnormal RNA splicing with the mutation has also been demonstrated in a recent work by Burley et al. [25] who developed a method for PKD1 mutation screening by RT-PCR and reported three splicing defects out of six mutations identified. Unlike our RT-PCR and nested-PCR method that require only 10 PCR reactions per one sample, the recently reported method [25] needs as many as 57 PCR reactions per one sample.

Another advantage of the method that we developed is that it uses reagents and equipments available in general molecular genetic laboratory. In addition, the mutation screening method can be modified to increase efficiency and to be suitable for each laboratory. However, several disadvantages are present in analysis of PKD1 transcript including difficulty in sample handling and storage because of its unstable nature making it unpopular for routine service laboratory, complicated experimental procedure in cDNA synthesis, and presence of false-positive results due to contamination of atypical illegitimate products which sometimes puzzle interpretation of result and make it necessary to analyze of PKD1-genomic DNA for confirmation of mutation.

In this study, we have further applied the developed long RT-PCR followed by nested PCR and long-range genomic-DNA amplification for analysis of mutation in the reiterated region of PKD1 in Thai families with ADPKD. The MRF-SSCP technique has been developed and preliminarily used for screening other types of mutations. This method is able to screen mutation in a long cDNA fragment (>1 kb) amplified by nested PCR and it is feasible to use for mutation screening in the entire sequence of PKD1 cDNA, reducing the numbers of PCR reactions and SSCP gels required for the analysis. In the application of long RT-PCR and mutation screening by MRF-SSCP in our study, we could detect PKD1 mutations in 5 out of 10 families (50%). The limitation of detection rate may be due to low sensitivity of SSCP for mutation screening in long cDNA fragments (>300 bp) usually present after the digestion of PCR products with restriction enzymes and also probably due to the use of only single SSCP condition. However, this detection rate is comparable to that of

protein-truncation test (PTT) which is about 52% [26,27] although it is lower than that of DGGE [28-30] and DHPLC [15] which are about 60% and 70%, respectively. In the MRF-SSCP analysis, false-positive mobility shifts of the digested-cDNA fragments were found to be about 10%, which could be mainly eliminated by repeating the screening experiment or performing the analysis in more than one affected members in the same family. Although PTT method can screen for a relatively large cDNA fragments (~2 kb) and the detected alterations are almost all pathogenic mutations, its major disadvantage is that missense mutations, which are a significant source of PKD1 mutation [27] or small in-frame changes are not detected. Thus, it may not be an ideal screening method for detection of all types of PKD1 mutations. DGGE and DHPLC are the methods of choice provided that the equipments are available and the detection conditions are well optimized. Direct sequencing of the entire PKD1 gene is however very expensive if mutation screening is not initially performed and it may not be appropriate for such a large gene as PKD1.

Using the previously reported and this newly developed method, we have identified three novel (splicing, frameshift and in-frame) mutations and two known (nonsense and frameshift) alterations in five Thai families with ADPKD (Table 3 and Figure 6). Two of these (splicing and nonsense) changes are possibly *de novo* mutations. All these mutations located in the reiterated region which were confirmed by analyses of PKD1-genomic DNA using LR-PCR method and direct sequencing. A novel splicing defect that was identified in family PK066 is g.33184_33214del31 which resulted in exon 19 skipping, most likely because of the deletion of splice-donor site of intron 19. Missing of exon 19 sequence in PKD1 mRNA will cause a frameshift in polycystin-1 translation. The predicted protein would have a novel 50 amino-acid sequence after the residue 2497 and would terminate at the position 2548. Thus, the mutant protein would lack almost half of polycystin-1 in its C-terminus starting from the RE1 module. The second novel mutation is a frameshift deletion (c.9451_9452delAT) identified in family PK069, resulting in a frameshift translation after codon 3081. Novel 95 amino acids would be observed in

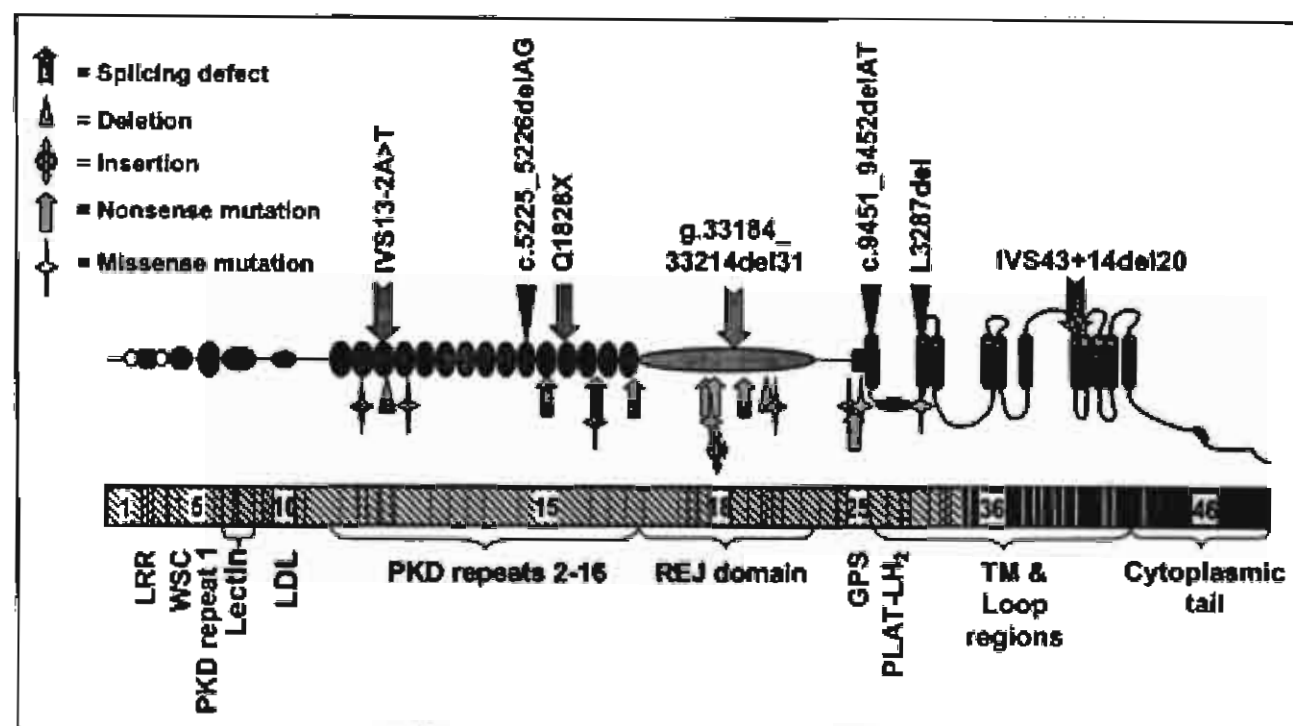


Figure 6

Distribution of *PKD1* mutations identified in Thai patients with ADPKD. Diagrams of polycystin-1 (upper) and *PKD1* gene (lower) show domain structures and coding regions for the protein domains, respectively. Seven *PKD1* mutations (above polycystin-1) were identified by our groups, while the other eighteen (under polycystin-1) were also reported in Thai patients by Phakdeekitcharoen et al. [31,32]. Majority of the mutations locate in the regions encoding PKD repeats, REJ and the beginning TM domains.

this mutant protein before premature termination at the position 3177, truncating all the C-terminus of polycystin-1 beginning from TM 1. The third novel mutation identified in family PK002 is an in-frame deletion (L3287del) affecting a highly conserved residue in TM2 domain of polycystin-1. The proband in the family had ESRD and the youngest affected member (III-6) was diagnosed at 7 years old (Figure 5). The frameshift mutation due to di-nucleotide deletion in exon 15 (c.5225_5226delAG) found in family PK039 has been previously reported in several unrelated Caucasian families [15,24]. The di-nucleotide deletion causes frameshift translation beginning at codon 1672, introducing novel 97 amino acids and premature termination at codon 1768. This mutation might associate with cerebral aneurysm [24] but this association was not seen in this reported Thai family. Instead, it is suspected to correlate to ESRD as observed in the proband. A nonsense (Q1828X) mutation in exon 15 identified in family PK031 has recently been reported in a European family (P 293) in which another nonsense mutation (S2164X) was concur-

rently identified on the same chromosome [15]. This nonsense (Q1828X) mutation in the Thai family should occur independently as a *de novo* event in the patient and inherited to his son and daughter, since this mutation and ADPKD were not observed in other 55 members of his kindred.

PKD1 mutations reported so far in Thai families appear to be heterogeneous, similar to other ethnic origins worldwide. However, some degree of clustering of mutations in the regions encoding the PKD repeats and REJ domain of polycystin-1 is noticed (Figure 6) [19,20,31,32]. The mutations that we identified in this and previous studies [19,20] consisted of splicing, frameshift, in-frame and nonsense alterations. We have not yet observed missense mutations which have already been reported in Thai patients with ADPKD by Phakdeekitcharoen et al. [31,32]. It is possible that our method has a low sensitivity for detecting missense mutation. However, as several single nucleotide polymorphisms (SNPs) could be identified (Table 4), we believe that our method is capable to also

identify this type of mutation. It is likely that no detectable missense mutation in our study may occur by chance. No relationship between specific mutation and clinical manifestations was found from our data, similar to that observed in many other reports. With our long RT-PCR and nested PCR and the mutation screening by MRF-SSCP method or other modifications to increase screening efficiency such as the use of DHPLC [15], we expect to identify majority of PKD1 mutations, if not all, in our patients for the benefits of better understanding of pathogenesis of ADPKD, development of rapid molecular genetic diagnosis, and improvement of preventive measure for the complications related to the disease.

Conclusions

This study is the first report using the long RT-PCR method in combination with MRF-SSCP for mutation screening of PKD1 cDNA and total five mutations were identified within the reiterated region. Three mutations (splicing defect, frameshift alteration and in-frame deletion) are novel. Two mutations (splicing defect and nonsense change) are possibly *de novo*. PKD1 mutations reported so far in Thai patients with ADPKD are heterogeneous but mutations in a majority group of patients are still unknown, requiring further characterization.

Competing interests

None declared

Authors' contributions

WT set up and carried out the molecular genetic studies, co-ordinated experimental work, and drafted the manuscript. CL as a clinical geneticist was responsible for clinical examinations, providing genetic counselling and consultation to the ADPKD patients and families, collecting clinical and family data. KV as a nephrologist was responsible for clinical and nephrological investigations, collections of clinical data and blood samples. CS as the first clinical geneticist initiated the medical care and clinical genetic studies, diagnosed and recruited the ADPKD families. DB took part in PKD1 mutation analysis. NR performed the linkage analysis. PY co-ordinated research activity, designed experimental studies, participated in discussion and interpretation of results, and corrected the manuscript. All authors have already read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank all ADPKD patients, family members, and laboratory personnel who participated and donated blood samples for the study. We also thank staff members of the Renal Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, for helping in the blood sample collection. This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) Post-Doctoral Research Grant (to W.T.), Mahidol University and National Research Coun-

cil of Thailand (NRCT) (to CL), and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand (to PY).

References

1. Delgado OZ: Bilateral polycystic disease of the kidneys: a follow-up of two hundred and eighty four patients and their families. *Acta Med Scand* 1937, 328:1-255.
2. Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993, 329:332-342.
3. The European Polycystic Kidney Disease Consortium: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994, 77:881-894.
4. Hughes J, Ward CJ, Feral B, Aspimwall R, Clark K, San Millan JL, Gemble V, Harris PC: The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Mol Genet* 1995, 10:151-160.
5. Burn TC, Connors TD, Dackowski WR, Peery LR, Van Raay TJ, Hill-holland JM, Venet M, Miller G, Haldim RH, Landas GM et al: Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium). *Hum Mol Genet* 1995, 4:575-582.
6. The International Polycystic Kidney Disease Consortium: Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 1995, 81:289-298.
7. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saito JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Florides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Delias CC, Peters DJ, Somlo S: PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996, 272:1339-1342.
8. Drouot MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S: Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 1995, 25:733-736.
9. Paterson AD, Pei Y: PKD3-to be or not to be? *Nephrol Dial Transplant* 1999, 14:2965-2966.
10. Naui SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, U X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J: Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Mol Genet* 2003, 33:129-137.
11. Pei Y, Paterson AD, Wang KR, He N, Hefferton D, Waznick T, Gershino GG, Parfrey P, Somlo S, St George-Hyslop P: Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001, 68:355-363.
12. Krawczak MCD: The Human Gene Mutation Database. *The Institute of Medical Genetics in Cardiff*. The University of Wales College of Medicine, *Trends Genet* 1997, 13:121-122.
13. Ding L, Zhang S, Qiu W, Xiao C, Wu S, Zhang G, Cheng L: Novel mutations of PKD1 gene in Chinese patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002, 17:75-80.
14. Eo HS, Lee JG, Ahn C, Cho JT, Hwang DY, Hwang YH, Lee EJ, Kim YS, Han JS, Kim S, Lee JS, Jeoung DL, Lee SE, Kim UK: Three novel mutations of the PKD1 gene in Korean patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Chn Genet* 2002, 62:169-174.
15. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggiu-Malik A, Winerle CG, Torres VE, Harris PC: A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 2002, 61:1588-1599.
16. Rossetti S, Burton S, Strmeck L, Pond GR, San Millan JL, Zerres K, Buratt TM, Ozon S, Torres VE, Bergstralh EJ, Winerle CG, Harris PC: The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13:1230-1237.
17. Bogdanova N, Markoff A, Garke V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B: Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 2001, 74:333-341.
18. Thongnoppakun W, Wilairat P, Varesangthip K, Yenchitsomanus PT: Long RT-PCR Amplification of the entire coding sequence of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene. *Bio-techniques* 1999, 26:126-132.
19. Thongnoppakun W, Rungroj N, Wilairat P, Varesangthip K, Sirinavis C, Yenchitsomanus PT: A novel splice-acceptor site mutation (IVS13-2A>T) of polycystic kidney disease 1 (PKD1)

- gene resulting in an RNA processing defect with a T4-nucleotide deletion in exon 14 of the mRNA transcript. *Hum Mutat* 2000, 15:115.
20. Rungroj N, Thongmopaldun W, Vareesangthip K, Sirinavin C, Wilairat P, Yenchitsomanus PT: Molecular defect of PKD1 gene resulting in abnormal RNA processing in a Thai family. *J Med Assoc Thai* 2001, 84:1308-1314.
 21. Lee HH, Lo WJ, Choo KB: Mutational analysis by a combined application of the multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism and the direct linear amplification DNA sequencing protocols. *Anal Biochem* 1992, 205:289-293.
 22. Ravine D, Gibson RN, Walker RG, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DP: Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease I. *Lancet* 1994, 343:824-827.
 23. Seidier JL, Hilliard PR, Rill RL: Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 1982, 126:374-380.
 24. Watrick T, Phakdeekitcharoen B, Johnson A, Gandolph M, Wang M, Briefel G, Klinger KW, Kimberling W, Gabow P, Germino GG: Mutation detection of PKD1 identifies a novel mutation common to three families with aneurysms and/or very-early-onset disease. *Am J Hum Genet* 1999, 65:1561-1571.
 25. Burley S, Lossi AM, Bayle J, Berland Y, Fontes M: Mutation screening of the PKD1 transcript by RT-PCR. *J Med Genet* 2002, 39:422-429.
 26. Peral B, Gamble V, Strong C, Ong AC, Sloane-Stanley J, Zarros K, Wineris CG, Harris PC: Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease I gene (PKD1) by a novel approach. *Am J Hum Genet* 1997, 60:1399-1410.
 27. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, Burton S, Sneddon V, Peral B, Roy S, Balkaloglu A, Konec R, Wineris CG, Harris PC: Mutation analysis of the entire PKD1 genes: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001, 68:46-63.
 28. Perrichot RA, Mancier B, Simon PM, Whebe B, Clodes J, Farac C: DGGE screening of PKD1 gene reveals novel mutations in a large cohort of 146 unrelated patients. *Hum Genet* 1999, 105:231-239.
 29. Perrichot R, Mancier B, Quere I, Carre A, Simon P, Whebe B, Clodes J, Farac C: Novel mutations in the duplicated region of PKD1 gene. *Eur J Hum Genet* 2000, 8:353-359.
 30. Peters DJ, Antyurek Y, van Dijk M, Brouning MH: Mutation detection for exons 2 to 10 of the polycystic kidney disease I (PKD1)-gene by DGGE. *Eur J Hum* 2001, 9:957-960.
 31. Phakdeekitcharoen B, Wernick TJ, Ahn C, Whang DY, Barkhart B, Germino GG: Thirteen novel mutations of the replicated region of PKD1 in an Asian population. *Kidney Int* 2000, 58:1400-1412.
 32. Phakdeekitcharoen B, Wernick TJ, Germino GG: Mutation analysis of the entire replicated portion of PKD1 using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:955-963.
 33. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22:4673-4680.
 34. Lofus BJ, Kim UJ, Sneddon VP, Kalush F, Brandon R, Fuhrmann J, Mason T, Crosby ML, Barnstead M, Cronin L, Deslattes Mays A, Cao Y, Xu RX, Kang HL, Mitchell S, Eichler EE, Harris PC, Venter JC, Adams MD: Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q. *Genomics* 1999, 60:295-308.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/5/2/prepub>

Publish with BioMed Central and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp





APPLICATION OF LONG RT-PCR FOR MUTATION ANALYSIS OF PKD1 IN THAI FAMILIES WITH AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

Wanna Thongnoppakhun¹, Chanin Limwongse^{1,2}, Kriengsak Vareesangthip²,
Nanyawan Rungroj¹, Chintana Sirinavin^{1,2}, and Pa-thai Yenchitsomanus¹

¹Department of Research and Development and ²Department of Medicine,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD; MIM 173900) is one of the most common inherited disorders in all human races, manifesting life-threatening symptoms which finally leading to renal failure in a considerable proportion of patients.

A majority of cases (85%) is caused by mutations in the PKD1 gene (OMIM 601242; approved symbol, PKD1), one of the most complicated genes as known so far, on chromosome 16p11.3.

Only about a quarter of PKD1-nucleotide sequence at 3' and (near 3'UTR) is unique, while the rest majority (near 3'UTR) has been almost totally masked by more than 8 homologous genes, rendering characterization of any mutation in this gene difficult, besides the other intricate features of this gene (Table 1).

Furthermore, PKD1 mutations occur throughout the gene with no clusters or "hot-spots".

Table 1. Characteristics of the PKD1 gene

Issues	Details
Presence of at least 8 homologous and (very nearby) on chromosome 16p11.3	PKD1, PKD2, PKD3, PKD4, PKD5, PKD6, PKD7, PKD8, PKD9, PKD10, PKD11, PKD12, PKD13, PKD14, PKD15, PKD16, PKD17, PKD18, PKD19, PKD20, PKD21, PKD22, PKD23, PKD24, PKD25, PKD26, PKD27, PKD28, PKD29, PKD30, PKD31, PKD32, PKD33, PKD34, PKD35, PKD36, PKD37, PKD38, PKD39, PKD40, PKD41, PKD42, PKD43, PKD44, PKD45, PKD46, PKD47, PKD48, PKD49, PKD50, PKD51, PKD52, PKD53, PKD54, PKD55, PKD56, PKD57, PKD58, PKD59, PKD60, PKD61, PKD62, PKD63, PKD64, PKD65, PKD66, PKD67, PKD68, PKD69, PKD70, PKD71, PKD72, PKD73, PKD74, PKD75, PKD76, PKD77, PKD78, PKD79, PKD80, PKD81, PKD82, PKD83, PKD84, PKD85, PKD86, PKD87, PKD88, PKD89, PKD90, PKD91, PKD92, PKD93, PKD94, PKD95, PKD96, PKD97, PKD98, PKD99, PKD100, PKD101, PKD102, PKD103, PKD104, PKD105, PKD106, PKD107, PKD108, PKD109, PKD110, PKD111, PKD112, PKD113, PKD114, PKD115, PKD116, PKD117, PKD118, PKD119, PKD120, PKD121, PKD122, PKD123, PKD124, PKD125, PKD126, PKD127, PKD128, PKD129, PKD130, PKD131, PKD132, PKD133, PKD134, PKD135, PKD136, PKD137, PKD138, PKD139, PKD140, PKD141, PKD142, PKD143, PKD144, PKD145, PKD146, PKD147, PKD148, PKD149, PKD150, PKD151, PKD152, PKD153, PKD154, PKD155, PKD156, PKD157, PKD158, PKD159, PKD160, PKD161, PKD162, PKD163, PKD164, PKD165, PKD166, PKD167, PKD168, PKD169, PKD170, PKD171, PKD172, PKD173, PKD174, PKD175, PKD176, PKD177, PKD178, PKD179, PKD180, PKD181, PKD182, PKD183, PKD184, PKD185, PKD186, PKD187, PKD188, PKD189, PKD190, PKD191, PKD192, PKD193, PKD194, PKD195, PKD196, PKD197, PKD198, PKD199, PKD200, PKD201, PKD202, PKD203, PKD204, PKD205, PKD206, PKD207, PKD208, PKD209, PKD210, PKD211, PKD212, PKD213, PKD214, PKD215, PKD216, PKD217, PKD218, PKD219, PKD220, PKD221, PKD222, PKD223, PKD224, PKD225, PKD226, PKD227, PKD228, PKD229, PKD230, PKD231, PKD232, PKD233, PKD234, PKD235, PKD236, PKD237, PKD238, PKD239, PKD240, PKD241, PKD242, PKD243, PKD244, PKD245, PKD246, PKD247, PKD248, PKD249, PKD250, PKD251, PKD252, PKD253, PKD254, PKD255, PKD256, PKD257, PKD258, PKD259, PKD260, PKD261, PKD262, PKD263, PKD264, PKD265, PKD266, PKD267, PKD268, PKD269, PKD270, PKD271, PKD272, PKD273, PKD274, PKD275, PKD276, PKD277, PKD278, PKD279, PKD280, PKD281, PKD282, PKD283, PKD284, PKD285, PKD286, PKD287, PKD288, PKD289, PKD290, PKD291, PKD292, PKD293, PKD294, PKD295, PKD296, PKD297, PKD298, PKD299, PKD300, PKD301, PKD302, PKD303, PKD304, PKD305, PKD306, PKD307, PKD308, PKD309, PKD310, PKD311, PKD312, PKD313, PKD314, PKD315, PKD316, PKD317, PKD318, PKD319, PKD320, PKD321, PKD322, PKD323, PKD324, PKD325, PKD326, PKD327, PKD328, PKD329, PKD330, PKD331, PKD332, PKD333, PKD334, PKD335, PKD336, PKD337, PKD338, PKD339, PKD340, PKD341, PKD342, PKD343, PKD344, PKD345, PKD346, PKD347, PKD348, PKD349, PKD350, PKD351, PKD352, PKD353, PKD354, PKD355, PKD356, PKD357, PKD358, PKD359, PKD360, PKD361, PKD362, PKD363, PKD364, PKD365, PKD366, PKD367, PKD368, PKD369, PKD370, PKD371, PKD372, PKD373, PKD374, PKD375, PKD376, PKD377, PKD378, PKD379, PKD380, PKD381, PKD382, PKD383, PKD384, PKD385, PKD386, PKD387, PKD388, PKD389, PKD390, PKD391, PKD392, PKD393, PKD394, PKD395, PKD396, PKD397, PKD398, PKD399, PKD400, PKD401, PKD402, PKD403, PKD404, PKD405, PKD406, PKD407, PKD408, PKD409, PKD410, PKD411, PKD412, PKD413, PKD414, PKD415, PKD416, PKD417, PKD418, PKD419, PKD420, PKD421, PKD422, PKD423, PKD424, PKD425, PKD426, PKD427, PKD428, PKD429, PKD430, PKD431, PKD432, PKD433, PKD434, PKD435, PKD436, PKD437, PKD438, PKD439, PKD440, PKD441, PKD442, PKD443, PKD444, PKD445, PKD446, PKD447, PKD448, PKD449, PKD450, PKD451, PKD452, PKD453, PKD454, PKD455, PKD456, PKD457, PKD458, PKD459, PKD460, PKD461, PKD462, PKD463, PKD464, PKD465, PKD466, PKD467, PKD468, PKD469, PKD470, PKD471, PKD472, PKD473, PKD474, PKD475, PKD476, PKD477, PKD478, PKD479, PKD480, PKD481, PKD482, PKD483, PKD484, PKD485, PKD486, PKD487, PKD488, PKD489, PKD490, PKD491, PKD492, PKD493, PKD494, PKD495, PKD496, PKD497, PKD498, PKD499, PKD500, PKD501, PKD502, PKD503, PKD504, PKD505, PKD506, PKD507, PKD508, PKD509, PKD510, PKD511, PKD512, PKD513, PKD514, PKD515, PKD516, PKD517, PKD518, PKD519, PKD520, PKD521, PKD522, PKD523, PKD524, PKD525, PKD526, PKD527, PKD528, PKD529, PKD530, PKD531, PKD532, PKD533, PKD534, PKD535, PKD536, PKD537, PKD538, PKD539, PKD540, PKD541, PKD542, PKD543, PKD544, PKD545, PKD546, PKD547, PKD548, PKD549, PKD550, PKD551, PKD552, PKD553, PKD554, PKD555, PKD556, PKD557, PKD558, PKD559, PKD560, PKD561, PKD562, PKD563, PKD564, PKD565, PKD566, PKD567, PKD568, PKD569, PKD570, PKD571, PKD572, PKD573, PKD574, PKD575, PKD576, PKD577, PKD578, PKD579, PKD580, PKD581, PKD582, PKD583, PKD584, PKD585, PKD586, PKD587, PKD588, PKD589, PKD590, PKD591, PKD592, PKD593, PKD594, PKD595, PKD596, PKD597, PKD598, PKD599, PKD600, PKD601, PKD602, PKD603, PKD604, PKD605, PKD606, PKD607, PKD608, PKD609, PKD610, PKD611, PKD612, PKD613, PKD614, PKD615, PKD616, PKD617, PKD618, PKD619, PKD620, PKD621, PKD622, PKD623, PKD624, PKD625, PKD626, PKD627, PKD628, PKD629, PKD630, PKD631, PKD632, PKD633, PKD634, PKD635, PKD636, PKD637, PKD638, PKD639, PKD640, PKD641, PKD642, PKD643, PKD644, PKD645, PKD646, PKD647, PKD648, PKD649, PKD650, PKD651, PKD652, PKD653, PKD654, PKD655, PKD656, PKD657, PKD658, PKD659, PKD660, PKD661, PKD662, PKD663, PKD664, PKD665, PKD666, PKD667, PKD668, PKD669, PKD670, PKD671, PKD672, PKD673, PKD674, PKD675, PKD676, PKD677, PKD678, PKD679, PKD680, PKD681, PKD682, PKD683, PKD684, PKD685, PKD686, PKD687, PKD688, PKD689, PKD690, PKD691, PKD692, PKD693, PKD694, PKD695, PKD696, PKD697, PKD698, PKD699, PKD700, PKD701, PKD702, PKD703, PKD704, PKD705, PKD706, PKD707, PKD708, PKD709, PKD710, PKD711, PKD712, PKD713, PKD714, PKD715, PKD716, PKD717, PKD718, PKD719, PKD720, PKD721, PKD722, PKD723, PKD724, PKD725, PKD726, PKD727, PKD728, PKD729, PKD730, PKD731, PKD732, PKD733, PKD734, PKD735, PKD736, PKD737, PKD738, PKD739, PKD740, PKD741, PKD742, PKD743, PKD744, PKD745, PKD746, PKD747, PKD748, PKD749, PKD750, PKD751, PKD752, PKD753, PKD754, PKD755, PKD756, PKD757, PKD758, PKD759, PKD760, PKD761, PKD762, PKD763, PKD764, PKD765, PKD766, PKD767, PKD768, PKD769, PKD770, PKD771, PKD772, PKD773, PKD774, PKD775, PKD776, PKD777, PKD778, PKD779, PKD780, PKD781, PKD782, PKD783, PKD784, PKD785, PKD786, PKD787, PKD788, PKD789, PKD790, PKD791, PKD792, PKD793, PKD794, PKD795, PKD796, PKD797, PKD798, PKD799, PKD800, PKD801, PKD802, PKD803, PKD804, PKD805, PKD806, PKD807, PKD808, PKD809, PKD810, PKD811, PKD812, PKD813, PKD814, PKD815, PKD816, PKD817, PKD818, PKD819, PKD820, PKD821, PKD822, PKD823, PKD824, PKD825, PKD826, PKD827, PKD828, PKD829, PKD830, PKD831, PKD832, PKD833, PKD834, PKD835, PKD836, PKD837, PKD838, PKD839, PKD840, PKD841, PKD842, PKD843, PKD844, PKD845, PKD846, PKD847, PKD848, PKD849, PKD850, PKD851, PKD852, PKD853, PKD854, PKD855, PKD856, PKD857, PKD858, PKD859, PKD860, PKD861, PKD862, PKD863, PKD864, PKD865, PKD866, PKD867, PKD868, PKD869, PKD870, PKD871, PKD872, PKD873, PKD874, PKD875, PKD876, PKD877, PKD878, PKD879, PKD880, PKD881, PKD882, PKD883, PKD884, PKD885, PKD886, PKD887, PKD888, PKD889, PKD890, PKD891, PKD892, PKD893, PKD894, PKD895, PKD896, PKD897, PKD898, PKD899, PKD900, PKD901, PKD902, PKD903, PKD904, PKD905, PKD906, PKD907, PKD908, PKD909, PKD910, PKD911, PKD912, PKD913, PKD914, PKD915, PKD916, PKD917, PKD918, PKD919, PKD920, PKD921, PKD922, PKD923, PKD924, PKD925, PKD926, PKD927, PKD928, PKD929, PKD930, PKD931, PKD932, PKD933, PKD934, PKD935, PKD936, PKD937, PKD938, PKD939, PKD940, PKD941, PKD942, PKD943, PKD944, PKD945, PKD946, PKD947, PKD948, PKD949, PKD950, PKD951, PKD952, PKD953, PKD954, PKD955, PKD956, PKD957, PKD958, PKD959, PKD960, PKD961, PKD962, PKD963, PKD964, PKD965, PKD966, PKD967, PKD968, PKD969, PKD970, PKD971, PKD972, PKD973, PKD974, PKD975, PKD976, PKD977, PKD978, PKD979, PKD980, PKD981, PKD982, PKD983, PKD984, PKD985, PKD986, PKD987, PKD988, PKD989, PKD990, PKD991, PKD992, PKD993, PKD994, PKD995, PKD996, PKD997, PKD998, PKD999, PKD1000, PKD1001, PKD1002, PKD1003, PKD1004, PKD1005, PKD1006, PKD1007, PKD1008, PKD1009, PKD1010, PKD1011, PKD1012, PKD1013, PKD1014, PKD1015, PKD1016, PKD1017, PKD1018, PKD1019, PKD1020, PKD1021, PKD1022, PKD1023, PKD1024, PKD1025, PKD1026, PKD1027, PKD1028, PKD1029, PKD1030, PKD1031, PKD1032, PKD1033, PKD1034, PKD1035, PKD1036, PKD1037, PKD1038, PKD1039, PKD1040, PKD1041, PKD1042, PKD1043, PKD1044, PKD1045, PKD1046, PKD1047, PKD1048, PKD1049, PKD1050, PKD1051, PKD1052, PKD1053, PKD1054, PKD1055, PKD1056, PKD1057, PKD1058, PKD1059, PKD1060, PKD1061, PKD1062, PKD1063, PKD1064, PKD1065, PKD1066, PKD1067, PKD1068, PKD1069, PKD1070, PKD1071, PKD1072, PKD1073, PKD1074, PKD1075, PKD1076, PKD1077, PKD1078, PKD1079, PKD1080, PKD1081, PKD1082, PKD1083, PKD1084, PKD1085, PKD1086, PKD1087, PKD1088, PKD1089, PKD1090, PKD1091, PKD1092, PKD1093, PKD1094, PKD1095, PKD1096, PKD1097, PKD1098, PKD1099, PKD1100, PKD1101, PKD1102, PKD1103, PKD1104, PKD1105, PKD1106, PKD1107, PKD1108, PKD1109, PKD1110, PKD1111, PKD1112, PKD1113, PKD1114, PKD1115, PKD1116, PKD1117, PKD1118, PKD1119, PKD1120, PKD1121, PKD1122, PKD1123, PKD1124, PKD1125, PKD1126, PKD1127, PKD1128, PKD1129, PKD1130, PKD1131, PKD1132, PKD1133, PKD1134, PKD1135, PKD1136, PKD1137, PKD1138, PKD1139, PKD1140, PKD1141, PKD1142, PKD1143, PKD1144, PKD1145, PKD1146, PKD1147, PKD1148, PKD1149, PKD1150, PKD1151, PKD1152, PKD1153, PKD1154, PKD1155, PKD1156, PKD1157, PKD1158, PKD1159, PKD1160, PKD1161, PKD1162, PKD1163, PKD1164, PKD1165, PKD1166, PKD1167, PKD1168, PKD1169, PKD1170, PKD1171, PKD1172, PKD1173, PKD1174, PKD1175, PKD1176, PKD1177, PKD1178, PKD1179, PKD1180, PKD1181, PKD1182, PKD1183, PKD1184, PKD1185, PKD1186, PKD1187, PKD1188, PKD1189, PKD1190, PKD1191, PKD1192, PKD1193, PKD1194, PKD1195, PKD1196, PKD1197, PKD1198, PKD1199, PKD1200, PKD1201, PKD1202, PKD1203, PKD1204, PKD1205, PKD1206, PKD1207, PKD1208, PKD1209, PKD1210, PKD1211, PKD1212, PKD1213, PKD1214, PKD1215, PKD1216, PKD1217, PKD1218, PKD1219, PKD1220, PKD1221, PKD1222, PKD1223, PKD1224, PKD1225, PKD1226, PKD1227, PKD1228, PKD1229, PKD1230, PKD1231, PKD1232, PKD1233, PKD1234, PKD1235, PKD1236, PKD1237, PKD1238, PKD1239, PKD1240, PKD1241, PKD1242, PKD1243, PKD1244, PKD1245, PKD1246, PKD1247, PKD1248, PKD1249, PKD1250, PKD1251, PKD1252, PKD1253, PKD1254, PKD1255, PKD1256, PKD1257, PKD1258, PKD1259, PKD1260, PKD1261, PKD1262, PKD1263, PKD1264, PKD1265, PKD1266, PKD1267, PKD1268, PKD1269, PKD1270, PKD1271, PKD1272, PKD1273, PKD1274, PKD1275, PKD1276, PKD1277, PKD1278, PKD1279, PKD1280, PKD1281, PKD1282, PKD1283, PKD1284, PKD1285, PKD1286, PKD1287, PKD1288, PKD1289, PKD1290, PKD1291, PKD1292, PKD1293, PKD1294, PKD1295, PKD1296, PKD1297, PKD1298, PKD1299, PKD1300, PKD1301, PKD1302, PKD1303, PKD1304, PKD1305, PKD1306, PKD1307, PKD1308, PKD1309, PKD1310, PKD1311, PKD1312, PKD1313, PKD1314, PKD1315, PKD1316, PKD1317, PKD1318, PKD1319, PKD1320, PKD1321, PKD1322, PKD1323, PKD1324, PKD1325, PKD1326, PKD1327, PKD1328, PKD1329, PKD1330, PKD1331, PKD1332, PKD1333, PKD1334, PKD1335, PKD1336, PKD1337, PKD1338, PKD1339, PKD1340, PKD1341, PKD1342, PKD1343, PKD1344, PKD1345, PKD1346, PKD1347, PKD1348, PKD1349, PKD1350, PKD1351, PKD1352, PKD1353, PKD1354, PKD1355, PKD1356, PKD1357, PKD1358, PKD1359, PKD1360, PKD1361, PKD1362, PKD1363, PKD1364, PKD1365, PKD1366, PKD1367, PKD1368, PKD1369, PKD1370, PKD1371, PKD1372, PKD1373, PKD1374, PKD1375, PKD1376, PKD1377, PKD1378, PKD1379, PKD1380, PKD1381, PKD1382, PKD1383, PKD1384, PKD1385, PKD1386, PKD1387, PKD1388, PKD1389, PKD1390, PKD1391, PKD1392, PKD1393, PKD1394, PKD1395, PKD1396, PKD1397, PKD1398, PKD1399, PKD1400, PKD1401, PKD1402, PKD1403, PKD1404, PKD1405, PKD1406, PKD1407, PKD1408, PKD1409, PKD1410, PKD1411, PKD1412, PKD1413, PKD1414, PKD1415, PKD1416, PKD1417, PKD1418, PKD1419, PKD1420, PKD1421, PKD1422, PKD1423, PKD1424, PKD1425, PKD1426, PKD1427, PKD1428, PKD1429, PKD1430, PKD1431, PKD1432, PKD1433, PKD1434, PKD1435, PKD1436, PKD1437, PKD1438, PKD1439, PKD1440, PKD1441, PKD1442, PKD1443, PKD1444, PKD1445, PKD1446, PKD1447, PKD1448, PKD1449, PKD1450, PKD1451, PKD1452, PKD1453, PKD1454, PKD1455, PKD1456, PKD1457, PKD1458, PKD1459, PKD1460, PKD1461, PKD1462, PKD1463, PKD1464, PKD1465, PKD1466, PKD1467, PKD1468, PKD1469, PKD1470, PKD1471, PKD1472, PKD1473, PKD1474, PKD1475, PKD1476, PKD1477, PKD1478, PKD1479, PKD1480, PKD1481, PKD1482, PKD1483, PKD1484, PKD1485, PKD1486, PKD1487, PKD1488, PKD1489, PKD1490, PKD1491, PKD1492, PKD1493, PKD1494, PKD1495, PKD1496, PKD1497, PKD1498, PKD1499, PKD1500, PKD1501, PKD1502, PKD1503, PKD1504, PKD1505, PKD1506, PKD1507, PKD1508, PKD1509, PKD1510, PKD1511, PKD1512, PKD1513, PKD1514, PKD1515, PKD1516, PKD1517, PKD1518, PKD1519, PKD1520, PKD1521, PKD1522, PKD1523, PKD1524, PKD1525, PKD1526, PKD1527, PKD1528, PKD1529, PKD1530, PKD1531, PKD1532, PKD1533, PKD1534, PKD1535, PKD1536, PKD1537, PKD1538, PKD1539, PKD1540, PKD1541, PKD1542, PKD1543, PKD1544, PKD1545, PKD1546, PKD1547, PKD1548, PKD1549, PKD1550, PKD1551, PKD1552, PKD1553, PKD1554, PKD1555, PKD1556, PKD1557, PKD1558, PKD1559, PKD1560, PKD1561, PKD1562, PKD1563, PKD1564, PKD1565, PKD1566, PKD1567, PKD1568, PKD1569, PKD1570, PKD1571, PKD1572, PKD1573, PKD1574, PKD1575, PKD1576, PKD1577, PKD1578, PKD1579, PKD1580, PKD1581, PKD1582, PKD1583, PKD1584, PKD1585, PKD1586, PKD1587, PKD1588, PKD1589, PKD1590, PKD1591, PKD1592, PKD1593, PKD1594, PKD1595, PKD1596, PKD1597, PKD1598, PKD1599, PKD1600, PKD1601, PKD1602, PKD1603, PKD1604, PKD1605, PKD1606, PKD1607, PKD1608, PKD1609, PKD1610, PKD1611, PKD1612, PKD1613, PKD1614, PKD1615, PKD1616, PKD1617, PKD1618, PKD1619, PKD1620, PKD1621, PKD1622, PKD1623, PKD1624, PKD1625, PKD1626, PKD1627, PKD1628, PKD1629, PKD1630, PKD1631, PKD1632, PKD1633, PKD1634, PKD1635, PKD1636, PKD1637, PKD1638, PKD1639, PKD1640, PKD1641, PKD1642, PKD1643, PKD1644, PKD1645, PKD1646, PKD1647, PKD1648, PKD1649, PKD1650, PKD1651, PKD1652, PKD1653, PKD1654, PKD1655, PKD1656, PKD1657, PKD1658, PKD1659, PKD1660, PKD1661, PKD1662, PKD1663, PKD1664, PKD1665, PKD1666, PKD1667, PKD1668, PKD1669, PKD1670, PKD1671, PKD1672, PKD1673, PKD1674, PKD1675, PKD1676, PKD1677, PKD1678, PKD1679, PKD1680, PKD1681, PKD1682, PKD1683, PKD1684, PKD1685, PKD1686, PKD1687, PKD1688, PKD1689, PKD1690, PKD1691, PKD1692, PKD1693, PKD1694, PKD1695, PKD1696, PKD1697, PKD1698, PKD1699, PKD1700, PKD1701, PKD1702, PKD1703, PKD1704, PKD1705, PKD1706, PKD1707, PKD1708, PKD1709, PKD1710, PKD1711, PKD1712, PKD1713, PKD1714, PKD1715, PKD1716, PKD1717, PKD1718, PKD1719, PKD1720, PKD1721, PKD1722, PKD1723, PKD1724, PKD1725, PKD1726, PKD1727, PKD1728, PKD1729, PKD1730, PKD1731, PKD1732, PKD1733, PKD1734, PKD1735, PKD1736, PKD1737, PKD1738, PKD1739, PKD1740, PKD1741, PKD1742, PKD1743, PKD1744, PKD1745, PKD1746, PKD1747, PKD1748, PKD1749, PKD1750, PKD1751, PKD1752, PKD1753, PKD1754, PKD1755, PKD1756, PKD1757, PKD1758, PKD1759, PKD1760, PKD1761, PKD1762, PKD1763, PKD1764, PKD1765, PKD1766, PKD1767, PKD1768, PKD1769, PKD1770, PKD1771, PKD1772, PKD1773, PKD1774, PKD1775, PKD1776, PKD1777, PKD1778, PKD1779, PKD1780, PKD1781, PKD1782, PKD1783, PKD1784, PKD1785, PKD1786, PKD1787, PKD1788, PKD1789, PKD1790, PKD1791, PKD1792, PKD1793, PKD1794, PKD1795, PKD1796, PKD1797, PKD1798, PKD1799, PKD1800, PKD

การวินิจฉัยโรคไตเป็นถุงน้ำชนิดเด่น (ADPKD) โดยใช้เทคโนโลยีทางอณูพันธุศาสตร์

วรรณาทองนพคุณ¹, ดวงกมล ปันจิตวรณีย์², วรรณวรางค์ ทวีโชคปี³, นันทวรรณ รุ่งโรจน์⁴,

เพทาย เย็นจิตโสมนัส^{1,5}, จินตนา ศิริมาวัน^{1,2}, ธนินทร์ สีม่วงศรี²

¹หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถาบันส่งเสริมการวิจัย, ²สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์,

³หน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ สถาบันส่งเสริมการวิจัย, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิดที่มีการถ่ายทอดแบบอัติกษณะเด่น (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อย ผู้ป่วยจะมีถุงน้ำที่ไตจำนวนมากซึ่งเพิ่มขึ้นตามอายุ และครึ่งหนึ่งมักเสียชีวิตจากภาวะไตวายระยะสุดท้าย ร้อยละ 85 ของโรคนี้มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ที่ยีน *PKD1* จึงเรียกกลุ่มนี้ว่าโรค PKD1 ในทางคลินิกโรค ADPKD วินิจฉัยได้จากการตรวจพบถุงน้ำที่ไตโดยการทำอัลตราซาวด์ซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในรายที่อายุน้อยหรือยังไม่ปรากฏอาการ ดังนั้นเทคโนโลยีทางห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยและตรวจหาผู้เป็นโรคก่อนมีอาการ คณะผู้วิจัยได้ตรวจการถ่ายทอดของยีน *PKD1* ที่ผลิตปกติโดยการวิเคราะห์ลิ้งค์เกจ (DNA linkage analysis) ร่วมกับการตรวจหามิวเตชันของยีนโดยตรง (direct mutation detection) งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นโรค ADPKD และสมาชิกครอบครัวรวม 358 คนจาก 47 ครอบครัว วิธีการศึกษาเริ่มจากการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อแยกสกัดสารพันธุกรรม (อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ) แล้วทำการวิเคราะห์ลิ้งค์เกจเพื่อติดตามการถ่ายทอดยีน *PKD1* ที่ผลิตปกติในแต่ละครอบครัวโดยดูรูปแบบการถ่ายทอดของอัลลีลเป็นชุด (haplotype) ประกอบกับข้อมูลทางคลินิก ผลการวิเคราะห์ลิ้งค์เกจพบ 21 ครอบครัวมีการถ่ายทอดของโรคไปกับ haplotype ของยีน *PKD1*, อีก 10 ครอบครัวมีความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดไปด้วยกัน, ส่วน 3 ครอบครัวไม่มีการถ่ายทอดไปด้วยกัน และยังไม่สามารถสรุปผลได้ 13 ครอบครัวเนื่องจากได้ข้อมูลไม่เพียงพอ การตรวจมิวเตชันของยีน *PKD1* ใน 21 ครอบครัวที่ผลการวิเคราะห์ลิ้งค์เกจบ่งชี้ว่ามีการถ่ายทอดยีน *PKD1* ที่ผลิตปกติไปกับโรคสามารถระบุชนิดของมิวเตชันได้ใน 7 ครอบครัว ส่วนที่เหลืออยู่ในระหว่างดำเนินการตรวจ ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้คือการนำผลการตรวจไปใช้วินิจฉัยแยกโรค ทำนายโรคก่อนมีอาการเพื่อให้แพทย์สามารถวางแผนการรักษาและป้องกันภาวะแทรกซ้อน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจญาติพี่น้องที่จะบิโรคได้ให้ผู้ป่วยว่าปรกติจริงหรือไม่ การวิเคราะห์ลิ้งค์เกจเพียงอย่างเดียวมีข้อจำกัดในกรณีที่มีข้อมูลไม่เพียงพอในการแปลผล จึงควรตรวจหามิวเตชันของยีน *PKD1* โดยตรงร่วมด้วย การทราบชนิดของมิวเตชันในผู้ป่วยทำให้สามารถพัฒนาวิธีตรวจที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับสมาชิกอื่น ๆ ในครอบครัวนั้น และยังเป็นการขยายฐานข้อมูลความรู้เกี่ยวกับมิวเตชันของยีนนี้ อันจะช่วยเพิ่มความเข้าใจกลไกการเกิดโรคที่ระดับโมเลกุลเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาต่อไปในอนาคต

มิวเตชันชนิดที่กิดซ้ำในยีน polycystic kidney disease 1 (PKD1) ในผู้ป่วยไทย

Recurrent mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene in Thai patients

ดวงกมล บัณฑิตวรฤณ¹, วรณา ทองนพคุณ¹, วรณวรรณ หิรัญโคปี^{1,2}, ชรินทร์ อิมวงค์^{1,2}, จินตนา สิรินวัน^{1,2}, เกรียงศักดิ์ วรณสงหิพย์³, วลัยลักษณ์ จัยบุตร⁴, เพทพย ยืนจิตโสภณ^{1,5}

Duangkamon Banditworapoon¹, Wannan Thongnoppakorn¹, Wanwarang Hirirakopi^{1,2}, Charin Limwongse^{1,2}, Chintana Sirinavai^{1,2}, Kriangsak Varcasangthip³, Walailak Chalyasoot⁴, Pa-thai Yenchitsommanus^{1,5}

บทคัดย่อ

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมชนิดที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบถาวรและมีผลกระทบต่อไตและอวัยวะอื่นๆ หลายระบบ มิวเตชันในยีน *PKD1* เป็นสาเหตุใหญ่ของโรค ADPKD เท่าที่มีรายงานในลำดับเบสของยีน *PKD1* ทั้งหมดไม่พบบริเวณที่มีมิวเตชันเกิดขึ้นบ่อยๆ อย่างเด่นชัด มิวเตชันแต่ละชนิดในยีน *PKD1* มักเกิดจำเพาะในครอบครัวเดียวกัน มีเพียงเล็กน้อยที่เกิดซ้ำในครอบครัวอื่นที่ไม่ได้เป็นเครือญาติกัน ดังนั้นการตรวจหาความผิดปกติระดับยีนในผู้ป่วย ADPKD โดยทั่วไปจึงจำเป็นต้องตรวจกรองตลอดทั้งยีน คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจกรองมิวเตชันที่เป็นต้นเหตุของโรคในทุกส่วนของยีน *PKD1* ในผู้ป่วย ADPKD ที่ไม่ได้เป็นญาติกันจำนวน 9 ราย โดยวิธี long reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และ multiple-fragment single-strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) analysis และได้ตรวจพบที่อนคิเอ็นเอที่เคลื่อนที่ผิดปกติในผู้ป่วยจากครอบครัว PK039 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสปรากฏว่าเป็นมิวเตชันชนิด frameshift คือ c.5225delAG ใน exon 15 ซึ่งซ้ำกับที่เคยมีรายงานแล้วถึง 5 ครั้งในประชากรผิวขาว คณะผู้วิจัยจึงได้ตรวจหามิวเตชันชนิดอื่นๆ ที่ยังพบกิดซ้ำในยีน *PKD1* ด้วยวิธีการตรวจที่จำเพาะกับมิวเตชันที่ทราบชนิดแล้วในผู้ป่วย ADPKD จำนวน 76 รายจากต่างครอบครัว ผลปรากฏว่า มิวเตชันชนิด IVS13-2A>T ซึ่งเคยพบแล้วในผู้ป่วยหนึ่งครอบครัว (PK015) เกิดซ้ำขึ้นอีกในครอบครัว PK035 โดยที่ผลการวิเคราะห์ haplotype ครอบครัวบริเวณยีน *PKD1* ในสองครอบครัวนี้บ่งชี้ว่ามิวเตชันน่าจะมิต้นกำเนิดต่างกัน มิวเตชันชนิด IVS13-2A>T ได้เคยถูกตรวจพบในผู้ป่วย ADPKD ชาวยุโรปอีกหนึ่งคนด้วย จากผลงานวิจัยนี้และที่เคยมีมาก่อนแสดงว่าในบางตำแหน่งของยีน *PKD1* มิวเตชันที่เกิดซ้ำ ดังนั้นการตรวจมิวเตชันที่เคยพบแล้วในแต่ละประชากรก่อนการตรวจกรองใน *PKD1* หมดทั้งยีนในครอบครัวใหม่อาจจะเป็นวิธีที่ควรพิจารณาใช้ในการศึกษามิวเตชันของยีนนี้

¹หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถาบันวิจัยการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

²สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

³หน่วยไต ภาควิชาเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Renal Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

⁴สาขาวิชารังสีวินิจฉัย ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Division of Diagnostic Radiology, Department of Radiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

⁵หน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ สถาบันวิจัยการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

ABSTRACT

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a life-threatening disorder inherited as an autosomal dominant, affecting either renal or multiple extra-renal systems. Mutations in *PKD1* account for a majority of ADPKD cases. Mutations reported over the entire sequence of the *PKD1* gene have no apparent significant clustering. Most *PKD1* mutations are unique to individual families but a few recurrent events have been reported in unrelated families, and therefore it is generally necessary to screen the whole gene to determine the molecular defect in ADPKD patients. We have searched for disease-causing mutations in the entire *PKD1* gene in 9 unrelated ADPKD index cases by using the long reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and multiple-fragment single-strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) analysis. Aberrant bands were detected in a patient from PK039. Sequencing revealed a frameshift mutation (c.5225delAG) in exon 15, a recurrent mutation which was previously described 5 times in Caucasian population. Therefore, we aimed to identify any recurrent mutations in *PKD1* by using detection methods specific for our known mutations in 76 unrelated ADPKD patients. One recurrent mutation, IVS13-2A>T, previously reported in an affected family (PK015), was identified in PK035 family. Results of haplotype studies revealed that the mutations preferably existed on different allelic backgrounds in the two families, however, IVS13-2A>T has been also described in one European ADPKD patient. Our results and previous studies indicate that recurrent mutations did occur in some regions of *PKD1*. Given the relatively frequent nature of these two recurrent mutations reported here, Thai patients with ADPKD should be screened initially for these nucleotide changes by the specific detection method before more exhaustive screening of the entire *PKD1* gene.

คำนำ

โรคไตเป็นดุน้ำโรค autosomal dominant (ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อย มีอุบัติการณ์ประมาณ 1 ใน 400-1,000 ในประชากรทุกเชื้อชาติ อาการหลักของโรคคือพบถุงน้ำในไตทั้ง 2 ข้าง และอาจมีอาการแสดงออกที่อวัยวะอื่น ๆ ได้ด้วย อาทิ เส้นเลือดโป่งพองที่สมอง ถุงน้ำในตับ หรือความผิดปกติที่ลิ้นหัวใจ เป็นต้น โรคนี้เป็นสาเหตุประมาณร้อยละ 10 ของภาวะไตวายระยะสุดท้าย (1) ประมาณร้อยละ 85 ของผู้ป่วย ADPKD มีสาเหตุจากความผิดปกติของยีน *PKD1* บนโครโมโซมที่ 16 (16p13.3) (2) ส่วนที่เหลือเกิดจากความผิดปกติของยีน *PKD2* บนโครโมโซมที่ 4 (4q22) (3) ยีน *PKD1* มีขนาด genomic DNA รวม 54 กิโลเบสซึ่งประกอบด้วย 46 exon และ mRNA มีขนาดใหญ่ถึง 14,148 เบส (4-7) ยีน *PKD1* กำหนดการสร้าง polycystin-1 ซึ่งเป็นโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ งานวิจัยล่าสุดเชื่อว่า polycystin-1 ทำหน้าที่ในกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณทางกลศาสตร์ร่วมกับผลิตภัณฑ์ของยีน *PKD2* คือ polycystin-2 โดยมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน และมีบทบาทร่วมในการรับรู้ต่อการไหลของของเหลวผ่าน primary cilium ในเซลล์เยื่อหุ้มไต (renal epithelium) ถ้าโปรตีนตัวใดตัวหนึ่งสูญเสียหน้าที่ไป ก็จะทำให้เกิดโรค ADPKD ได้เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถรับรู้ถึงการเคลื่อนไหวที่มีอิทธิพลควบคุมกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อตามปกติ (8)

การศึกษามิวตาชันของยีน *PKD1* จำเป็นต้องใช้เทคนิคเพื่อแยกลำดับเบสของยีน *PKD1* ออกจาก homologous genes ที่มีอยู่ไม่ต่ำกว่า 6 ยีนให้ได้ก่อน (9) มีนักวิจัยหลายกลุ่มได้พัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อศึกษามิวตาชันของยีน *PKD1* ได้สำเร็จรวมทั้งกลุ่มของผู้วิจัยในรายงานนี้เอง (10) ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบมิวตาชันในยีน

PKD1 รวม 171 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมักพบในผู้ป่วยเพียงครอบครัวเดียวเท่านั้น มีเพียงประมาณ 20 ชนิดที่มีการค้นพบซ้ำในราว 2-3 ครอบครัวที่ไม่ใช่ญาติกัน มีเคสที่พบซ้ำบ่อยที่สุดถึง 7 ครั้งคือ Q4041X (11)

งานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค long RT-PCR เพิ่มจำนวนจุด *PKD1*-cDNA ที่สมบูรณ์อย่างจำเพาะทำให้สามารถศึกษาไมโครแซนของยีน *PKD1* ที่เป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วย *PKD1* ได้ตลอดทั้งยีน นอกจากนี้ เพื่อศึกษาการเกิดซ้ำของไมโครแซนที่ทราบชนิดแล้ว ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคอื่นๆ ที่พัฒนาขึ้นเองสำหรับตรวจไมโครแซนชนิดนั้นๆ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาไมโครแซนในคีนอื่นเอของผู้ป่วย ADPKD เท่าที่มีอยู่โดยตรง และได้พบไมโครแซน 2 ชนิดที่เคยมีรายงานการค้นพบมาแล้วทั้งคู่ ซึ่งต่างจากที่คาดการณ์ไว้ว่าน่าจะพบแค่ไมโครแซนชนิดใหม่ๆ ในยีนนี้

ผู้ป่วยที่ศึกษาและวิธีการ

ผู้ป่วยที่ศึกษาเป็นผู้ป่วยโรค ADPKD ที่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาที่คลินิกพันธุศาสตร์ หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย และผู้ป่วยนอกของสาขาเวชพันธุศาสตร์และโรคทางพันธุกรรม ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งได้รับการวินิจฉัยโรคโดยการตรวจดูน้ำในไตด้วยอัลตราซาวนด์และการทำ DNA linkage study โดยใช้ polymorphic markers หลายชนิดที่ linked กับยีน *PKD1* ด้วยอย่างเลือกของผู้ป่วยถูกนำมาแยกเม็คเลือดขาวเพื่อสกัดอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ แล้วทำ long RT-PCR จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เพื่อเพิ่มจำนวนจุดของ full-length cDNA ของยีน *PKD1* (ความยาว 13.6 kb) จากนั้นจึงทำ nested PCR จาก long PCR-product ด้วย PCR primer จำนวน 9 คู่เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นส่วนของยีน 9 ส่วนซึ่งเชื่อมกันตลอดความยาวของยีนมีขนาดตั้งแต่ 1,352-1,678 bp แล้วจึงย่อย nested PCR product ด้วยเอนไซม์รีสตริกชัน (restriction endonuclease) อย่างน้อย 2 จุดให้เป็นท่อนดีเอ็นเอที่เล็กลงหลายๆ ขนาดก่อนนำไปทำการตรวจกรองหาไมโครแซนโดยวิธี single-strand conformation polymorphism (SSCP) ซึ่งย้อมติดด้วย silver staining แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธี DNA sequencing หลังจากนั้นวิเคราะห์ความผิดปกติของ genomic DNA โดยการทำให้ PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอในส่วนที่สงสัยว่ามีความผิดปกติ แล้ววิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

ในกรณีที่เป็นการตรวจไมโครแซนที่ทราบชนิดแล้ว ได้ใช้วิธี long-range PCR amplification of genomic DNA ตามด้วยวิธีจำเพาะตามตำแหน่งของไมโครแซน ได้แก่ allele-specific amplification (ASA), restriction site analysis หรือ SSCP เพื่อตรวจการถ่ายทอดไมโครแซนในสมาชิกครอบครัวทั้งหมดที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอให้ศึกษา

ผลและวิจารณ์

จากการทำ long RT-PCR และ nested PCR ของยีน *PKD1* จากอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปตรวจกรองด้วยวิธี multiple-fragment single-strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) analysis และย้อมด้วย silver staining พบว่าตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยจากครอบครัว PK035 มีการกลายพันธุ์ที่ผิดปกติของท่อนดีเอ็นเอจาก nested PCR product ส่วนที่ 4 (ครอบคลุมส่วนของ exon 15) (ภาพที่ 1 ก) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสปรากฏว่าเป็นไมโครแซนชนิด frameshift คือ c.5225delAG ใน exon 15 (ภาพที่ 1 ข) ซึ่งซ้ำกับที่เคยมีรายงานแล้วถึง 5 ครั้งในประชากรผิวขาว (ตารางที่ 1) การเกิดซ้ำบ่อยๆ ของไมโครแซนชนิดนี้ไม่น่าจะเป็นเหตุบังเอิญจากโอกาสเกิดแบบสุ่ม ทำให้น่าสงสัยว่าอาจมีลำดับเบสบางตำแหน่งในบริเวณนี้เป็นตัวชักนำให้เกิดการจัดเรียงตัวที่ไม่ตรงกัน (misalignment) ของสายดีเอ็นเอที่กำลังจะมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (DNA replication) เป็นเหตุให้เบสทั้งสองนี้ขาดหายไปบ่อยครั้ง การที่พบไมโครแซนชนิดนี้ใน 3 ครอบครัวชาวอเมริกันซึ่ง 2 ใน 3 มีอาการหลอดเลือดในสมองโป่งพอง (aneurysms) และ 2 ใน 3 มีอาการรุนแรงตั้งแต่อายุน้อย (very-early onset) (12) ทำให้คิดว่า c.5225delAG อาจสัมพันธ์กับอาการดังกล่าว ถึงแม้จะมีสมาชิกบางคนที่มีอาการในเกณฑ์ทั่วไปของโรค แต่อย่างไรก็ดี ในผู้ป่วยไทยจากครอบครัว PK035 ยังไม่

พบผู้ใดแสดงอาการหลอดเลือดในสมองโป่งพอง มีเพียงผู้ป่วยคนหนึ่งที่มีประวัติจากภาวะไตวายเท่านั้น รายงานการพบมิวเคชั่นนี้โดย Rossetti และคณะ (13) ก็ไม่ได้กล่าวถึงความสัมพันธ์กับอาการดังกล่าวแต่อย่างใด

ส่วนการตรวจหามิวเคชั่นชนิดอื่นที่อาจเกิดซ้ำในยีน *PKD1* ด้วยวิธีการตรวจที่จำเพาะกับมิวเคชั่นที่ทราบชนิดแล้วนั้นๆ โดยตรงในผู้ป่วย ADPKD จำนวน 76 ราย ผลพบว่าในครอบครัว PK035 มีมิวเคชั่นที่เกิดซ้ำชนิด IVS13-2A>T ซึ่งตรวจได้ด้วยเทคนิค ASA (ภาพที่ 2) ซึ่งเคยพบแล้วในผู้ป่วยไทยหนึ่งครอบครัว โดยผลการศึกษาการถ่ายทอดโรค (haplotype analysis) ในสองครอบครัวนี้แสดงว่ามิวเคชั่นเกิดบนอัลลีลที่น่าจะมีต้นกำเนิดต่างกัน กล่าวคือ ในครอบครัว PK015 เกิดบน haplotype ที่มีขนาดของ polymorphic markers (KG8, SM6, 16AC2.5, SM7) เป็น 123, 121, 169, 98 ส่วนครอบครัว PK015 เกิดบน haplotype ที่เป็น 123, 123, 169, 92 แม้ว่าสองครอบครัวนี้จะมีอัลลีลที่เหมือนกันสำหรับ KG8 (123) และ 16AC2.5 (169) แต่ขนาดทั้งสองนี้เป็นขนาดที่พบได้ค่อนข้างบ่อยที่สุดในประชากรทั่วไป นอกจากนี้ IVS13-2A>T ยังเคยถูกตรวจพบในประชากรเชื้อชาติอื่นคือชาวยุโรปด้วย จึงมีความเป็นไปได้ว่ามิวเคชั่นที่พบในผู้ป่วยไทยสองครอบครัวนี้มีต้นกำเนิดต่างกัน (independent origins)

มิวเคชั่นที่รายงานในงานวิจัยนี้เป็นชนิดที่เกิดซ้ำทั้งคู่ ซึ่งไม่พบในตัวอย่างตรวจปกติเกินกว่า 100 โครโมโซม ปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้ตรวจพบมิวเคชั่นในคนไทยรวมทั้งสิ้น 6 ชนิด (2 splicing mutations, 2 small deletions, 1 nonsense mutation และ 1 in-frame deletion) ในผู้ป่วย *PKD1* จำนวน 7 ครอบครัวที่ไม่ใช่ญาติกัน (14-16) ในจำนวนนี้มีมิวเคชั่น 4 ชนิดที่พบซ้ำมากกว่าหนึ่งครอบครัวในประชากรทั้งต่างประเทศและคนไทยด้วยกันเอง (ตารางที่ 1) การที่มีมิวเคชั่นบางชนิดเกิดได้ค่อนข้างบ่อยนี้ทำให้น่าพิจารณาถึงการตรวจกรองเบื้องต้นสำหรับมิวเคชั่นเหล่านี้ด้วยวิธีจำเพาะก่อนที่จะไปทำการตรวจกรอง *PKD1* หดทั้งยีน

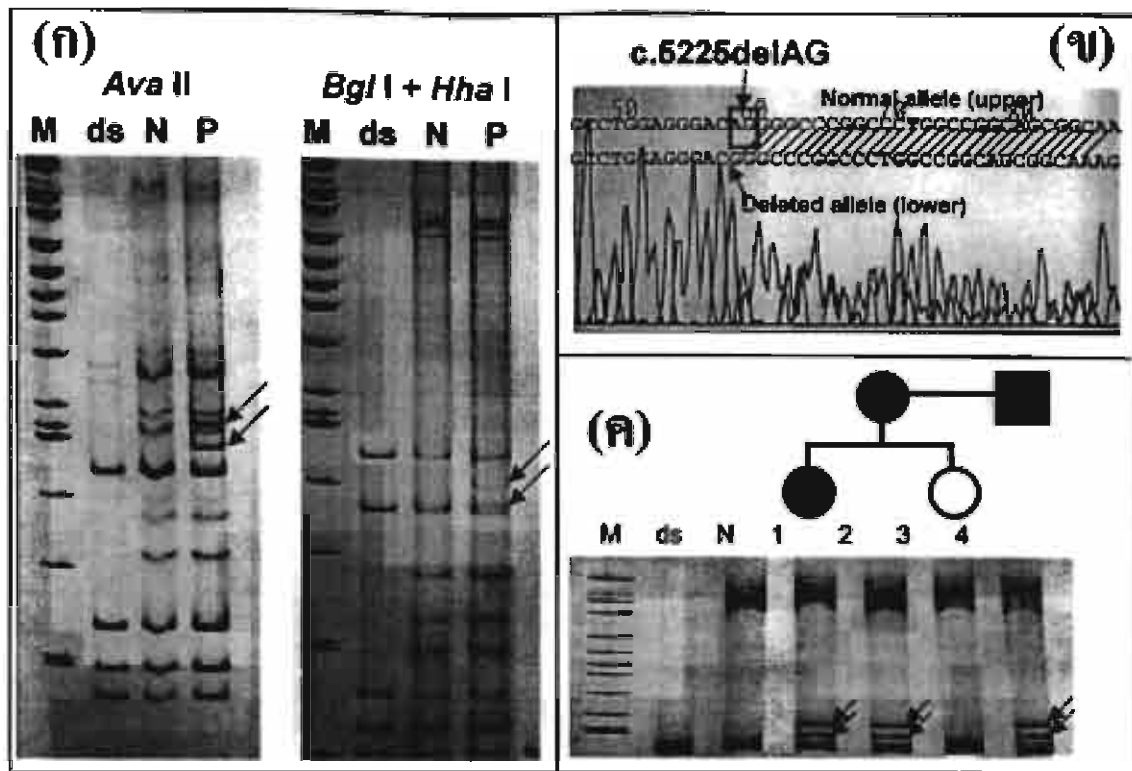
ตารางที่ 1 มิวเคชั่นของยีน *PKD1* ที่เกิดซ้ำซึ่งตรวจพบโดยคณะผู้วิจัยและนักวิจัยกลุ่มอื่น

Mutation	Location	RNA Splicing Defect	Effect on Polycystin-1	Family (Ethnic)	Reference
IVS13-2A>T	IVS13	Deletion of the first 74 nt in exon 14	FS at 1055 (PKD IV-terminal deletion)	PK035 (Thai) PK015 (Thai) Patient 1 (European)	This study Thongnoppakhun <i>et al</i> , 2000 (14) Burley <i>et al</i> , 2002 (17)
c.52254c1AG	Exon 15	-	FS at 1672 (PKD XI-terminal deletion)	PK039 (Thai) UC591 (American) UC138 (American) UC1334 (American) Pedigree 206 (Caucasian) Pedigree 376 (Caucasian)	This study Watnick <i>et al</i> , 1999 (12) Watnick <i>et al</i> , 1999 (12) Watnick <i>et al</i> , 1999 (12) Rossetti <i>et al</i> , 2002 (13) Rossetti <i>et al</i> , 2002 (13)
Q1828X (c.5693C>T)	Exon 15	-	Stop at 1828 (PKD XIII-terminal deletion)	PK031 (Thai) Pedigree 293 (Caucasian)	Thongnoppakhun <i>et al</i> , 2002 (16) Rossetti <i>et al</i> , 2002 (13)
IVS43-5del120	IVS43	Exon 43 skipping	In-frame deletion of 3904-4001 (TM 7-9)	PK009 (Thai) QX1054 (British) K97 (Japanese)	Rungroj <i>et al</i> , 2001 (15) Peral <i>et al</i> , 1995 (6) Mizoguchi <i>et al</i> , 2001 (18)

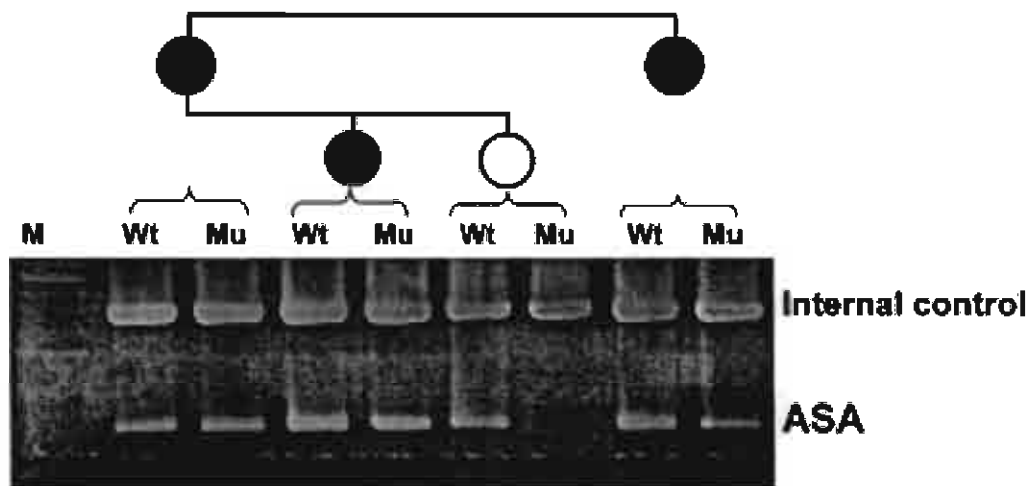
คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนวิจัยมุ่งเป้าหมายจากมหาวิทยาลัยมหิดลและสภากาชาดแห่งประเทศไทย (นพ. ชรินทร์ กิมมพ์ และคณะ) ทุนวิจัยหลังปริญญาเอกจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ดร. วรณา ทอณพคุณ) และ

1. Dalgaard OZ. Bilateral polycystic disease of the kidneys: a follow-up of two hundred and eighty four patients and their families. *Acta Med Scand* 1957;328:1-255.
2. Peters DJM, Sandkuijl LA. Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. *Contrib Nephrol* 1992;97:128-139.
3. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, et al. *PKD2*, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996;272(5266):1339-42.
4. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994;77(6):881-94.
5. Barn TC, Connors TD, Deckowski WR, Petty LR, Van Rasy TJ, Millholland JM, et al. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (*PKD1*) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American *PKD1* Consortium (APKD1 Consortium). *Hum Mol Genet* 1995;4(4):575-82.
6. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspöwall R, Clark K, San Millán JL, et al. The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995;10(2):151-60.
7. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: the complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 1995;81(2):289-98.
8. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 2003;33(2):129-37.
9. Bogdanova N, Markoff A, Oerks V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B. Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 2001;74(1):333-41.
10. Thongnoppakham W, Wilairat P, Vareesangthip K, Yenchitsomanus PT. Long RT-PCR Amplification of the entire coding sequence of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene. *Bio techniques* 1999;26(1):126-32.
11. Krawczak M CD. The Human Gene Mutation Database. In: *Trends Genet*; <http://archive.uwcm.ac.uk/wwcm/ing/march/120293.html> (for *PKD1*). 13:121-122, ed: The University of Wales College of Medicine (The Institute of Medical Genetics in Cardiff); 1997.
12. Watnick T, Phaladeckitcharoen B, Johnson A, Gandolph M, Wang M, Briefel G, et al. Mutation detection of *PKD1* identifies a novel mutation common to three families with aneurysms and/or very-early-onset disease. *Am J Hum Genet* 1999;65(6):1561-71.
13. Rocchetti S, Chauveau D, Walker D, Saggart-Malik A, Winears CG, Torres VE, et al. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 2002;61(5):1588-99.
14. Thongnoppakham W, Rungroj N, Wilairat P, Vareesangthip K, Sirinavin C, Yenchitsomanus PT. A novel splice-acceptor site mutation (IVS13-2A>T) of polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene resulting in an RNA processing defect with a 74-nucleotide deletion in exon 14 of the mRNA transcript. *Hum Mutat* 2000;15(1):115.
15. Rungroj N, Thongnoppakham W, Vareesangthip K, Sirinavin C, Wilairat P, Yenchitsomanus PT. Molecular defect of *PKD1* gene resulting in abnormal RNA processing in a Thai family. *J Med Assoc Thai* 2001;84(9):1308-16.
16. Thongnoppakham W, Limwongse C, Vareesangthip K, Rungroj N, Sirinavin C, and Yenchitsomanus P. Application of long RT-PCR for mutation analysis of *PKD1* in Thai families with autosomal dominant polycystic kidney disease. In: *The 4th HUGO Pacific Meeting and the 5th Asia-Pacific Conference on Human Genetics*; 2002 October 27-30, 2002; Arubazador City Jomtien, Pattaya, Chonburi, Thailand: Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University; 2002, p. 9G-07.
17. Burley S, Lissi AM, Bayle J, Berland Y, Foveas M. Mutation screening of the *PKD1* transcripts by RT-PCR. *J Med Genet* 2002;39(6):422-9.
18. Mizoguchi M, Tamura T, Yamaki A, Higashihara E, Shimizu Y. Mutations of the *PKD1* gene among Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients, including one heterozygous mutation identified in members of the same family. *J Hum Genet* 2001;46(9):511-7.



ภาพที่ 1 ก. ผล MRF-SSCP analysis จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชุดที่เชื่อมด้วย silver staining ในตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยจากครอบครัว PK035 (P) แสดงพ่นที่เห็นได้จาก nested RT-PCR product ที่ครอบคลุมบางส่วนของ exon 15 มีการเคลื่อนที่เปลี่ยนไป (ครี) เมื่อเทียบกับคนปกติ (N)
 ข. แสดงผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่เป็นมิวตาชันชนิด frameshift คือ c.5225delAG ใน exon 15
 ค. แสดงวิธีตรวจหา c.5225delAG โดยตรงในสมาชิกครอบครัว PK035 ซึ่งการขาดหายไป 2 เบสทำให้เกิดเป็น heteroduplex ใน polyacrylamide gel (ครี) ในกรณีที่ป่วยโรค



ภาพที่ 2 แสดงผลการตรวจหามิวตาชันชนิด IVS13-2 A>T โดยตรงด้วยวิธี ASA analysis พบว่าผู้ป่วยในครอบครัว 035 มีมิวตาชันชนิดนี้ และผลของ ASA สอดคล้องกับผลการตรวจพออนโดวรี linkage analysis



โรคไตเรื้อรังที่เกิดจากโรคไตอักเสบ poly cystic kidney disease (ADPKD) Recurrent mutations of the polycystic kidney disease - 3 (ADPKD-3)

ดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ¹, วรธนา ทองนพคุณ¹, วรณวรางค์ หิริโยตปี^{1,2}, ชนินทร์ คิมวงศ์^{1,2},
 จินตนา ศิรินาวัน^{1,2}, เกียรติศักดิ์ วารีนสงทิตย³, วลัยลักษณ์ ชัยสุตร⁴, เพฑาธ เชนจิตโสมนัย^{1,5}

¹หน่วยพันธุศาสตร์ สภาส่งเสริมการวิจัย, ²สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์, ³หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์,
⁴สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์, ⁵หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ สภาส่งเสริมการวิจัย
 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

โรคไตเรื้อรังที่เกิดจากโรคไตอักเสบ poly cystic kidney disease (ADPKD) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้
 บ่อยประมาณ 1 ต่อ 400-1,000 ในคนไทยเชื้อชาติ ไทยประมาณ 8% ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังประมาณ
 10 ปีที่ผ่านมาพบ PKD ชนิด autosomal recessive (AR) ประมาณ 1% (16/1,000) (1) (2) ส่วนที่เหลือเป็น autosomal
 dominant (AD) PKD ประมาณ 99% (3) พบ PKD ประมาณ 40-60 คนในคนไทย (4) พบ PKD ประมาณ 54 คนใน
 ไทย (5) พบ PKD ประมาณ 100 คนในไทย (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113) (114) (115) (116) (117) (118) (119) (120) (121) (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128) (129) (130) (131) (132) (133) (134) (135) (136) (137) (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152) (153) (154) (155) (156) (157) (158) (159) (160) (161) (162) (163) (164) (165) (166) (167) (168) (169) (170) (171) (172) (173) (174) (175) (176) (177) (178) (179) (180) (181) (182) (183) (184) (185) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (195) (196) (197) (198) (199) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (218) (219) (220) (221) (222) (223) (224) (225) (226) (227) (228) (229) (230) (231) (232) (233) (234) (235) (236) (237) (238) (239) (240) (241) (242) (243) (244) (245) (246) (247) (248) (249) (250) (251) (252) (253) (254) (255) (256) (257) (258) (259) (260) (261) (262) (263) (264) (265) (266) (267) (268) (269) (270) (271) (272) (273) (274) (275) (276) (277) (278) (279) (280) (281) (282) (283) (284) (285) (286) (287) (288) (289) (290) (291) (292) (293) (294) (295) (296) (297) (298) (299) (300) (301) (302) (303) (304) (305) (306) (307) (308) (309) (310) (311) (312) (313) (314) (315) (316) (317) (318) (319) (320) (321) (322) (323) (324) (325) (326) (327) (328) (329) (330) (331) (332) (333) (334) (335) (336) (337) (338) (339) (340) (341) (342) (343) (344) (345) (346) (347) (348) (349) (350) (351) (352) (353) (354) (355) (356) (357) (358) (359) (360) (361) (362) (363) (364) (365) (366) (367) (368) (369) (370) (371) (372) (373) (374) (375) (376) (377) (378) (379) (380) (381) (382) (383) (384) (385) (386) (387) (388) (389) (390) (391) (392) (393) (394) (395) (396) (397) (398) (399) (400) (401) (402) (403) (404) (405) (406) (407) (408) (409) (410) (411) (412) (413) (414) (415) (416) (417) (418) (419) (420) (421) (422) (423) (424) (425) (426) (427) (428) (429) (430) (431) (432) (433) (434) (435) (436) (437) (438) (439) (440) (441) (442) (443) (444) (445) (446) (447) (448) (449) (450) (451) (452) (453) (454) (455) (456) (457) (458) (459) (460) (461) (462) (463) (464) (465) (466) (467) (468) (469) (470) (471) (472) (473) (474) (475) (476) (477) (478) (479) (480) (481) (482) (483) (484) (485) (486) (487) (488) (489) (490) (491) (492) (493) (494) (495) (496) (497) (498) (499) (500) (501) (502) (503) (504) (505) (506) (507) (508) (509) (510) (511) (512) (513) (514) (515) (516) (517) (518) (519) (520) (521) (522) (523) (524) (525) (526) (527) (528) (529) (530) (531) (532) (533) (534) (535) (536) (537) (538) (539) (540) (541) (542) (543) (544) (545) (546) (547) (548) (549) (550) (551) (552) (553) (554) (555) (556) (557) (558) (559) (560) (561) (562) (563) (564) (565) (566) (567) (568) (569) (570) (571) (572) (573) (574) (575) (576) (577) (578) (579) (580) (581) (582) (583) (584) (585) (586) (587) (588) (589) (590) (591) (592) (593) (594) (595) (596) (597) (598) (599) (600) (601) (602) (603) (604) (605) (606) (607) (608) (609) (610) (611) (612) (613) (614) (615) (616) (617) (618) (619) (620) (621) (622) (623) (624) (625) (626) (627) (628) (629) (630) (631) (632) (633) (634) (635) (636) (637) (638) (639) (640) (641) (642) (643) (644) (645) (646) (647) (648) (649) (650) (651) (652) (653) (654) (655) (656) (657) (658) (659) (660) (661) (662) (663) (664) (665) (666) (667) (668) (669) (670) (671) (672) (673) (674) (675) (676) (677) (678) (679) (680) (681) (682) (683) (684) (685) (686) (687) (688) (689) (690) (691) (692) (693) (694) (695) (696) (697) (698) (699) (700) (701) (702) (703) (704) (705) (706) (707) (708) (709) (710) (711) (712) (713) (714) (715) (716) (717) (718) (719) (720) (721) (722) (723) (724) (725) (726) (727) (728) (729) (730) (731) (732) (733) (734) (735) (736) (737) (738) (739) (740) (741) (742) (743) (744) (745) (746) (747) (748) (749) (750) (751) (752) (753) (754) (755) (756) (757) (758) (759) (760) (761) (762) (763) (764) (765) (766) (767) (768) (769) (770) (771) (772) (773) (774) (775) (776) (777) (778) (779) (780) (781) (782) (783) (784) (785) (786) (787) (788) (789) (790) (791) (792) (793) (794) (795) (796) (797) (798) (799) (800) (801) (802) (803) (804) (805) (806) (807) (808) (809) (810) (811) (812) (813) (814) (815) (816) (817) (818) (819) (820) (821) (822) (823) (824) (825) (826) (827) (828) (829) (830) (831) (832) (833) (834) (835) (836) (837) (838) (839) (840) (841) (842) (843) (844) (845) (846) (847) (848) (849) (850) (851) (852) (853) (854) (855) (856) (857) (858) (859) (860) (861) (862) (863) (864) (865) (866) (867) (868) (869) (870) (871) (872) (873) (874) (875) (876) (877) (878) (879) (880) (881) (882) (883) (884) (885) (886) (887) (888) (889) (890) (891) (892) (893) (894) (895) (896) (897) (898) (899) (900) (901) (902) (903) (904) (905) (906) (907) (908) (909) (910) (911) (912) (913) (914) (915) (916) (917) (918) (919) (920) (921) (922) (923) (924) (925) (926) (927) (928) (929) (930) (931) (932) (933) (934) (935) (936) (937) (938) (939) (940) (941) (942) (943) (944) (945) (946) (947) (948) (949) (950) (951) (952) (953) (954) (955) (956) (957) (958) (959) (960) (961) (962) (963) (964) (965) (966) (967) (968) (969) (970) (971) (972) (973) (974) (975) (976) (977) (978) (979) (980) (981) (982) (983) (984) (985) (986) (987) (988) (989) (990) (991) (992) (993) (994) (995) (996) (997) (998) (999) (1000) (1001) (1002) (1003) (1004) (1005) (1006) (1007) (1008) (1009) (1010) (1011) (1012) (1013) (1014) (1015) (1016) (1017) (1018) (1019) (1020) (1021) (1022) (1023) (1024) (1025) (1026) (1027) (1028) (1029) (1030) (1031) (1032) (1033) (1034) (1035) (1036) (1037) (1038) (1039) (1040) (1041) (1042) (1043) (1044) (1045) (1046) (1047) (1048) (1049) (1050) (1051) (1052) (1053) (1054) (1055) (1056) (1057) (1058) (1059) (1060) (1061) (1062) (1063) (1064) (1065) (1066) (1067) (1068) (1069) (1070) (1071) (1072) (1073) (1074) (1075) (1076) (1077) (1078) (1079) (1080) (1081) (1082) (1083) (1084) (1085) (1086) (1087) (1088) (1089) (1090) (1091) (1092) (1093) (1094) (1095) (1096) (1097) (1098) (1099) (1100) (1101) (1102) (1103) (1104) (1105) (1106) (1107) (1108) (1109) (1110) (1111) (1112) (1113) (1114) (1115) (1116) (1117) (1118) (1119) (1120) (1121) (1122) (1123) (1124) (1125) (1126) (1127) (1128) (1129) (1130) (1131) (1132) (1133) (1134) (1135) (1136) (1137) (1138) (1139) (1140) (1141) (1142) (1143) (1144) (1145) (1146) (1147) (1148) (1149) (1150) (1151) (1152) (1153) (1154) (1155) (1156) (1157) (1158) (1159) (1160) (1161) (1162) (1163) (1164) (1165) (1166) (1167) (1168) (1169) (1170) (1171) (1172) (1173) (1174) (1175) (1176) (1177) (1178) (1179) (1180) (1181) (1182) (1183) (1184) (1185) (1186) (1187) (1188) (1189) (1190) (1191) (1192) (1193) (1194) (1195) (1196) (1197) (1198) (1199) (1200) (1201) (1202) (1203) (1204) (1205) (1206) (1207) (1208) (1209) (1210) (1211) (1212) (1213) (1214) (1215) (1216) (1217) (1218) (1219) (1220) (1221) (1222) (1223) (1224) (1225) (1226) (1227) (1228) (1229) (1230) (1231) (1232) (1233) (1234) (1235) (1236) (1237) (1238) (1239) (1240) (1241) (1242) (1243) (1244) (1245) (1246) (1247) (1248) (1249) (1250) (1251) (1252) (1253) (1254) (1255) (1256) (1257) (1258) (1259) (1260) (1261) (1262) (1263) (1264) (1265) (1266) (1267) (1268) (1269) (1270) (1271) (1272) (1273) (1274) (1275) (1276) (1277) (1278) (1279) (1280) (1281) (1282) (1283) (1284) (1285) (1286) (1287) (1288) (1289) (1290) (1291) (1292) (1293) (1294) (1295) (1296) (1297) (1298) (1299) (1300) (1301) (1302) (1303) (1304) (1305) (1306) (1307) (1308) (1309) (1310) (1311) (1312) (1313) (1314) (1315) (1316) (1317) (1318) (1319) (1320) (1321) (1322) (1323) (1324) (1325) (1326) (1327) (1328) (1329) (1330) (1331) (1332) (1333) (1334) (1335) (1336) (1337) (1338) (1339) (1340) (1341) (1342) (1343) (1344) (1345) (1346) (1347) (1348) (1349) (1350) (1351) (1352) (1353) (1354) (1355) (1356) (1357) (1358) (1359) (1360) (1361) (1362) (1363) (1364) (1365) (1366) (1367) (1368) (1369) (1370) (1371) (1372) (1373) (1374) (1375) (1376) (1377) (1378) (1379) (1380) (1381) (1382) (1383) (1384) (1385) (1386) (1387) (1388) (1389) (1390) (1391) (1392) (1393) (1394) (1395) (1396) (1397) (1398) (1399) (1400) (1401) (1402) (1403) (1404) (1405) (1406) (1407) (1408) (1409) (1410) (1411) (1412) (1413) (1414) (1415) (1416) (1417) (1418) (1419) (1420) (1421) (1422) (1423) (1424) (1425) (1426) (1427) (1428) (1429) (1430) (1431) (1432) (1433) (1434) (1435) (1436) (1437) (1438) (1439) (1440) (1441) (1442) (1443) (1444) (1445) (1446) (1447) (1448) (1449) (1450) (1451) (1452) (1453) (1454) (1455) (1456) (1457) (1458) (1459) (1460) (1461) (1462) (1463) (1464) (1465) (1466) (1467) (1468) (1469) (1470) (1471) (1472) (1473) (1474) (1475) (1476) (1477) (1478) (1479) (1480) (1481) (1482) (1483) (1484) (1485) (1486) (1487) (1488) (1489) (1490) (1491) (1492) (1493) (1494) (1495) (1496) (1497) (1498) (1499) (1500) (1501) (1502) (1503) (1504) (1505) (1506) (1507) (1508) (1509) (1510) (1511) (1512) (1513) (1514) (1515) (1516) (1517) (1518) (1519) (1520) (1521) (1522) (1523) (1524) (1525) (1526) (1527) (1528) (1529) (1530) (1531) (1532) (1533) (1534) (1535) (1536) (1537) (1538) (1539) (1540) (1541) (1542) (1543) (1544) (1545) (1546) (1547) (1548) (1549) (1550) (1551) (1552) (1553) (1554) (1555) (1556) (1557) (1558) (1559) (1560) (1561) (1562) (1563) (1564) (1565) (1566) (1567) (1568) (1569) (1570) (1571) (1572) (1573) (1574) (1575) (1576) (1577) (1578) (1579) (1580) (1581) (1582) (1583) (1584) (1585) (1586) (1587) (1588) (1589) (1590) (1591) (1592) (1593) (1594) (1595) (1596) (1597) (1598) (1599) (1600) (1601) (1602) (1603) (1604) (1605) (1606) (1607) (1608) (1609) (1610) (1611) (1612) (1613) (1614) (1615) (1616) (1617) (1618) (1619) (1620) (1621) (1622) (1623) (1624) (1625) (1626) (1627) (1628) (1629) (1630) (1631) (1632) (1633) (1634) (1635) (1636) (1637) (1638) (1639) (1640) (1641) (1642) (1643) (1644) (1645) (1646) (1647) (1648) (1649) (1650) (1651) (1652) (1653) (1654) (1655) (1656) (1657) (1658) (1659) (1660) (1661) (1662) (1663) (1664) (1665) (1666) (1667) (1668) (1669) (1670) (1671) (1672) (1673) (1674) (1675) (1676) (1677) (1678) (1679) (1680) (1681) (1682) (1683) (1684) (1685) (1686) (1687) (1688) (1689) (1690) (1691) (1692) (1693) (1694) (1695) (1696) (1697) (1698) (1699) (1700) (1701) (1702) (1703) (1704) (1705) (1706) (1707) (1708) (1709) (1710) (1711) (1712) (1713) (1714) (1715) (1716) (1717) (1718) (1719) (1720) (1721) (1722) (1723) (1724) (1725) (1726) (1727) (1728) (1729) (1730) (1731) (1732) (1733) (1734) (1735) (1736) (1737) (1738) (1739) (1740) (1741) (1742) (1743) (1744) (1745) (1746) (1747) (1748) (1749) (1750) (1751) (1752) (1753) (1754) (1755) (1756) (1757) (1758) (1759) (1760) (1761) (1762) (1763) (1764) (1765) (1766) (1767) (1768) (1769) (1770) (1771) (1772) (1773) (1774) (1775) (1776) (1777) (1778) (1779) (1780) (1781) (1782) (1783) (1784) (1785) (1786) (1787) (1788) (1789) (1790) (1791) (1792) (1793) (1794) (1795) (1796) (1797) (1798) (1799) (1800) (1801) (1802) (1803) (1804) (1805) (1806) (1807) (1808) (1809) (1810) (1811) (1812) (1813) (1814) (1815) (1816) (1817) (1818) (1819) (1820) (1821) (1822) (1823) (1824) (1825) (1826) (1827) (1828) (1829) (1830) (1831) (1832) (1833) (1834) (1835) (1836) (1837) (1838) (1839) (1840) (1841) (1842) (1843) (1844) (1845) (1846) (1847) (1848) (1849) (1850) (1851) (1852) (1853) (1854) (1855) (1856) (1857) (1858) (1859) (1860) (1861) (1862) (1863) (1864) (1865) (1866) (1867) (1868) (1869) (1870) (1871) (1872) (1873) (1874) (1875) (1876) (1877) (1878) (1879) (1880) (1881) (1882) (1883) (1884) (1885) (1886) (1887) (1888) (1889) (1890) (1891) (1892) (1893) (1894) (1895) (1896) (1897) (1898) (1899) (1900) (1901) (1902) (1903) (1904) (1905) (1906) (1907) (1908) (1909) (1910) (1911) (1912) (1913) (1914) (1915) (1916) (1917) (1918) (1919) (1920) (1921) (1922) (1923) (1924) (1925) (1926) (1927) (1928) (1929) (1930) (1931) (1932) (1933) (1934) (1935) (1936) (1937) (1938) (1939) (1940) (1941) (1942) (1943) (1944) (1945) (1946) (1947) (1948) (1949) (1950) (1951) (1952) (1953) (1954) (1955) (1956) (1957) (1958) (1959) (1960) (1961) (1962) (1963) (1964) (1965) (1966) (1967) (1968) (1969) (1970) (1971) (1972) (1973) (1974) (1975) (1976) (1977) (1978) (1979) (1980) (1981) (1982) (1983) (1984) (1985) (1986) (1987) (1988) (1989) (1990) (1991) (1992) (1993) (1994) (1995) (1996) (1997) (1998) (1999) (2000) (2001) (2002) (2003) (2004) (2005) (2006) (2007) (2008) (2009) (2010) (2011) (2012) (2013) (2014) (2015) (2016) (2017) (2018) (2019) (2020) (2021) (2022) (2023) (2024) (2025) (2026) (2027) (2028) (2029) (2030) (2031) (2032) (2033) (2034) (2035) (2036) (2037) (2038) (2039) (2040) (2041) (2042) (2043) (2044) (2045) (2046) (2047) (2048) (2049) (2050) (2051) (2052) (2053) (2054) (2055) (2056) (2057) (2058) (2059) (2060) (2061) (2062) (2063) (2064) (2065) (2066) (2067) (2068) (2069) (2070) (2071) (2072) (2073) (2074) (2075) (2076) (2077) (2078) (2079) (2080) (2081) (2082) (2083) (2084) (2085) (2086) (2087) (2088) (2089) (2090) (2091) (2092) (2093) (2094) (2095) (2096) (2097) (2098) (2099) (2100) (2101) (2102) (2103) (2104) (2105) (2106) (2107) (2108) (2109) (2110) (2111) (2112) (2113) (2114) (2115) (2116) (2117) (2118) (2119) (2120) (2121) (2122) (2123) (2124) (2125) (2126) (2127) (2128) (2129) (2130) (2131) (2132) (2133) (2134

Molecular and Genetic Basis of Single-Gene Disorders:

The Implication for Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease

วรรณมา ทองนพคุณ

หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถาบันส่งเสริมการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ชื่อโรค: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease

ลักษณะทางคลินิกของโรค

โรคไตเป็นถุงน้ำในผู้ใหญ่หรือโรคไตเป็นถุงน้ำชนิดเด่น (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อยที่สุดโรคหนึ่งในประชากรทั่วโลก มีอุบัติการณ์ประมาณ 1 ต่อ 400-1,000 สำหรับประเทศไทยประมาณว่ามีผู้เป็นโรคนี้ไม่น้อยกว่า 60,000-150,000 คน ADPKD เป็นโรคของอวัยวะหลายระบบ (systemic disorder) อาการแสดงสำคัญ ได้แก่ มีถุงน้ำจำนวนมากที่เนื้อไตทั้งสองข้าง ร่วมกับภาวะแทรกซ้อนทางไต อาทิ ความดันโลหิตสูง ปัสสาวะเป็นเลือด ปวดหลัง คิดเชื่อที่ทางเดินปัสสาวะ นิ่วในไตและอาจมีภาวะไตวายระยะสุดท้าย (end-stage renal failure) ซึ่งพบได้ร้อยละ 10 ของภาวะไตวายจากทุกสาเหตุ นอกจากนี้ในผู้ป่วย ADPKD ยังอาจแสดงอาการที่อวัยวะอื่น เช่น ตับเป็นถุงน้ำ หอบคั่งเลือดในสมองโป่งพอง ถิ่นหัวใจผิดปกติ และไส้เลื่อน เป็นต้น โดยทั่วไป อาการของโรคมักปรากฏในวัยผู้ใหญ่ แต่อาจพบได้ตั้งแต่อยู่ในครรภ์ หรือวัยเด็ก อาการแสดงอาจแตกต่างกันได้อย่างมากในแต่ละครอบครัวหรือแม้แต่นีครอบครัวเดียวกันเอง ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วย ADPKD มักเสียชีวิตจากภาวะไตวายระยะสุดท้ายเมื่ออายุประมาณ 50 ปี และบางส่วนอาจเสียชีวิตจากภาวะหลอดเลือดในสมองแตก

จากข้อมูลทางคลินิก โรค ADPKD มีอาการแสดงที่ต่างกันเป็น 2 กลุ่ม เรียกว่าโรค PKD1 และ PKD2 อาการของทั้งสองโรคมีความคล้ายคลึงและคาบเกี่ยวกันค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตาม ถ้าดูเหมือนโรค PKD1 จะมีความรุนแรงมากกว่าเนื่องจากมักเกิดภาวะไตวายที่อายุน้อยกว่า และจะพบ PKD1 ได้บ่อยกว่า PKD2 ถึง 6 เท่า เคยมีรายงานถึงโรคกลุ่มที่ 3 ซึ่งเรียกเป็น PKD3 แต่ปัจจุบันไม่แน่ใจว่ามีจริงหรือไม่เนื่องจากยังไม่พบยีนที่เป็นสาเหตุจนบัดนี้

ตำแหน่งและโครงสร้างของยีนที่เป็นสาเหตุ

เป็นที่ทราบกันว่าโรค PKD1 เกิดจากความผิดปกติของยีน *PKD1* ซึ่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม 16 (16p13.3) ส่วนโรค PKD2 เกิดจากความผิดปกติของยีน *PKD2* ซึ่งอยู่บนโครโมโซม 4 (4q21-23) ยีน *PKD1* นอกจากจะเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่แล้วยังมีโครงสร้างซับซ้อน กล่าวคือ มี genomic DNA ขนาดยาว 54 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วย 46 exons และมี mRNA ขนาด 14,148 เบส, ลำดับเบสของยีนมีปริมาณ guanosine และ cytosine (GC content) สูง, มีลำดับเบสที่เป็น polypyrimidine tract ขนาดใหญ่ที่สุดที่เจอพบคือ 2.5 kb ใน intron 21 และ 0.5 kb ใน intron 22 และที่สำคัญที่สุด คือลำดับเบสของยีน *PKD1* ประมาณ 3 ใน 4 ทางด้าน 5' (ประมาณ 40 kb ของ genomic DNA หรือ 10 kb ของ mRNA) เริ่มจาก exon 1 ถึง exon 32 เป็นส่วนที่เหมือนกับยีนอื่นอีกไม่ต่ำกว่า 6 ยีนที่ตำแหน่ง 16p13.1 บนโครโมโซมเดียวกัน (เรียกว่า homologous genes) โดยที่ยีนเหล่านี้มีความเหมือน (homology)

กับ *PKD1* transcript มากกว่าร้อยละ 95 ทำให้การแยกแยะที่มาของนิวคลีอไทด์ที่ต้องการศึกษาในยีน *PKD1* ทำได้ยากเป็นอย่างมาก

ยีน *PKD1* ถอดรหัสเป็นโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วย amino acid 4,302 กรด ชื่อว่า polycystin-1 ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าอาจมีบทบาทในการถ่ายทอดสัญญาณจากภายนอกเซลล์โดยจับกับ ligand บางชนิดแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ion transport ภายในเซลล์ โดยทำงานร่วมกับผลผลิตของยีน *PKD2* ชื่อ polycystin-2 ด้วยการมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันทาง C-terminus ของทั้งคู่ ด้วยเหตุนี้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งจึงเป็นสาเหตุให้เกิดอาการแสดงของโรคขึ้นได้เหมือนกัน

กลไกการเกิดมิวเตชัน

ส่วนใหญ่ของผู้ป่วย ADPKD คือประมาณร้อยละ 85 มีสาเหตุจากความผิดปกติของยีน *PKD1* ส่วนที่เหลือเพียงร้อยละ 15 มีสาเหตุจากยีน *PKD2* ดังนั้นความสนใจในการตรวจหาพันธุกรรมจึงมุ่งไปที่ยีน *PKD1*

มิวเตชันของยีน *PKD1* มักเป็นประเภทที่ทำให้เกิด premature termination ของโปรตีน polycystin-1 ได้แก่ frameshift mutation, nonsense mutation และ splicing defect จึงทำให้เชื่อว่ายีน *PKD1* ที่มีมิวเตชันน่าจะสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ (loss-of-function) ที่น่าสนใจ คือ มิวเตชันของยีน *PKD1* แต่ละชนิดตรวจพบในครอบครัวผู้ป่วยเพียงหนึ่งครอบครัว มีเหตุไม่ถนัดกันที่พบซ้ำกันมากกว่าหนึ่งครอบครัว ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีน *PKD1* มีอัตราการเกิดมิวเตชันที่สูงมากในประชากร และมิวเตชันมีความหลากหลาย (heterogeneity) มาก ไม่มีตำแหน่งใดที่เป็น hot spot ในยีนนี้

การที่อาการแสดงของโรค ADPKD ทั้ง *PKD1* และ *PKD2* มีความแตกต่างกันมากระหว่างครอบครัว (มีมิวเตชันต่างชนิดกันในยีนเดียวกัน) หรือแม้กระทั่งภายในครอบครัวเดียวกันเอง (มีมิวเตชันชนิดเดียวกันในยีนเดียวกัน) ทำให้เชื่อว่ายังมีปัจจัยทางพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อมอื่นที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของโรคด้วย ต่อมาพบหลักฐานสนับสนุนกลไก "two-hit" โดยการค้นพบ somatic mutation ใน wild-type allele ของยีนที่เป็นสาเหตุ นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงกลไก "transheterozygous mutation" ในการก่อให้เกิดถุงน้ำในไตของคนเป็นโรค *PKD1* และ *PKD2* ซึ่งเป็นสถานะที่มีมิวเตชันทั้งในยีน *PKD1* และ *PKD2* ในต่าง allele ของผู้ป่วยคนเดียวกัน โดยอาจเป็น germline mutation ของทั้งสองยีนหรือเป็น germline mutation ของยีนหนึ่งร่วมกับ somatic mutation ของอีกยีนหนึ่งก็ได้

วิธีการตรวจหาพันธุกรรม

ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะการศึกษาในยีน *PKD1* ที่ผ่านมาการตรวจวินิจฉัยโรค *PKD1* ทางห้องปฏิบัติการอยู่พันธุศาสตร์สามารถทำได้ก่อนที่ผู้ป่วยจะมีอาการโดยการวิเคราะห์ linkage ด้วย polymorphic DNA markers ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *PKD1* แต่วิธีนี้เป็นการศึกษาโดยอ้อมและมีข้อจำกัดหลายประการ ที่สำคัญคือปัญหาเรื่อง recombination ระหว่างยีนกับ linked markers ซึ่งอาจทำให้ทำนายโรคผิดพลาดได้

ปัจจุบันมีวิธีการเพื่อตรวจหามิวเตชันของยีน *PKD1* ให้ได้ตลอดทั้งยีนที่พัฒนาขึ้นโดยคณะนักวิจัยหลายกลุ่มทั่วโลก ซึ่งเป็นการศึกษาใน genomic DNA เป็นส่วนใหญ่ โดยใช้หลักการเดียวกันคือต้องแยกลำดับเบสเฉพาะของยีน *PKD1* ทั้งหมดออกมาศึกษาให้ได้โดยไม่ให้มีลำดับเบสของ homologous genes เจ้ามุ่งเกี่ยว ทั้งนี้ได้อาศัยประโยชน์จากการที่ยีน *PKD1* บางส่วนมีลำดับเบสเฉพาะตัวที่ไม่เหมือนกับลำดับเบสของ homologous genes โดยตรง ทำให้สามารถออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีน *PKD1* เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนชุดของยีนใน reiterated region บริเวณต่างๆ กันได้ ซึ่งเป็นหลักการของ allele specific amplification วิธีการนี้อาจใช้ร่วมกับ

เทคนิค long-range PCR (LR-PCR) เพื่อลดจำนวนการทำ primary PCR ลง หลังจากที่ได้ *PKD1*-specific template เป็น primary PCR product แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทำ secondary nested PCR ให้มีขนาดเล็กลงเหมาะแก่การตรวจกรองมิวตาชัน (mutation screening) ซึ่งมีวิธีการที่นิยมใช้กันมากคือ single strand conformational polymorphism (SSCP), protein truncation test (PTT) และ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) เป็นต้น เมื่อทราบตำแหน่งที่น่าจะมีมิวตาชันโดยประมาณแล้วจึงทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยละเอียดต่อไป

วิธีการตรวจหามิวตาชัน

ในปี พ.ศ.2542 ห้องปฏิบัติการของหน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถาบันส่งเสริมการวิจัยร่วมกับสาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ได้พัฒนาวิธีการเพื่อตรวจหามิวตาชันในยีน *PKD1* ตลอดทั้งยีนขึ้นเป็นผลสำเร็จ โดยใช้เทคนิค long reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ขนาด 13.6 กิโลเบสเพิ่มจำนวนชุดของ coding sequence ทั้งหมดของยีน *PKD1* จาก mRNA ที่เตรียมจาก lymphocytes หลักการใช้คือคู่ของ PCR primer ซึ่งหนึ่งมีความจำเพาะกับ reiterated sequence ทางปลายด้าน 5' ของยีน *PKD1* ส่วนอีกข้างหนึ่งจำเพาะกับ unique sequence ทางปลายด้าน 3' ของยีน *PKD1* ซึ่ง primer ข้างนี้เป็นตัวกำหนดค่าให้ PCR product ถอนแบบมาจากยีน *PKD1* เทียบยีนเดียวกันเท่านั้น จึงตัดปัญหาเรื่อง homologous genes ออกไปได้ สำหรับการศึกษาค้นคว้าโดยใช้ mRNA มีข้อดีคือลดปัญหาเรื่องขนาดของยีนลง (จาก 54 kb ที่ต้องศึกษาใน DNA เป็น 14 kb ใน mRNA) และสามารถศึกษาความผิดปกติในกระบวนการตัดต่ออาร์เอ็นเอ (RNA processing defect) ได้ด้วย ในขณะที่การใช้ DNA ไม่สามารถแสดงให้เห็นได้ แต่ข้อเสียคือศึกษาได้ยากกว่า DNA เนื่องจาก mRNA ไม่เสถียร ต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษในการทำงาน และต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมในการแปลง mRNA ให้เป็น cDNA ก่อนด้วยวิธี reverse transcription จึงจะทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไปได้ โดยทั่วไปจึงไม่นิยมตรวจหามิวตาชันโดยใช้ mRNA โดยเฉพาะในงานบริการ แต่วิธีนี้จะเป็นประโยชน์มากสำหรับงานวิจัย

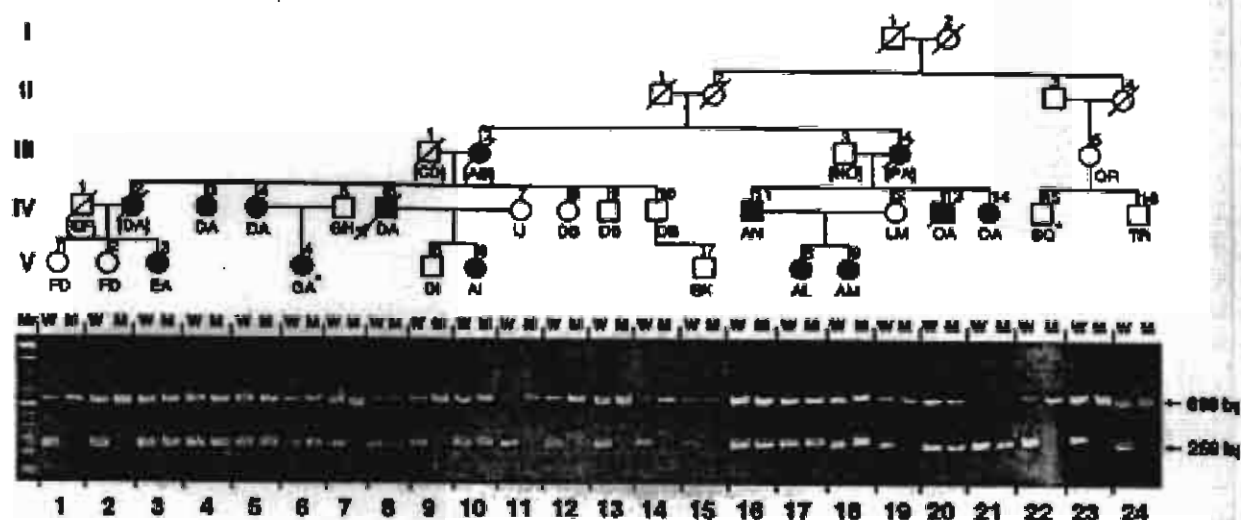
การตรวจหามิวตาชันของยีน *PKD1* โดยใช้ mRNA เริ่มจากการทำ long RT-PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของ full-length cDNA ของยีน *PKD1* หลังจากนั้นจึงแยกส่วนด้วยวิธี nested PCR ให้มีขนาดเล็กลงเหลือประมาณ 1.5 kb และเชื่อมกันตลอดทั้งยีนจำนวน 9 ชิ้นและตรวจด้วยวิธี electrophoresis ในขั้นตอนมีถ้าพบขนาดของ nested PCR product ที่ผิดปกติ จะวิเคราะห์ความผิดปกติด้วยวิธี restriction endonuclease analysis แล้ววิเคราะห์ลำดับเบส ส่วนกรณีที่ไม่พบความผิดปกติของขนาด PCR product ที่ได้จาก cDNA จะนำ PCR product ทั้ง 9 ชิ้นไปตรวจกรองเพื่อหามิวตาชันด้วยวิธี SSCP โดยย่อย PCR product ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะก่อน เพื่อให้มีขนาดเล็กลงเหมาะสมกับความไวของวิธี SSCP เมื่อพบว่า PCR product ชิ้นใดมีการเคลื่อนที่ใน polyacrylamide gel ผิดปกติ (mobility shift) จึงนำ PCR product ชิ้นนั้นไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบส ผลที่ได้จะทำให้ภาคเคมบริวของ genomic DNA ที่น่าจะมีความผิดปกติได้

ในการวิเคราะห์ความผิดปกติใน genomic DNA ด้านบริเวณที่น่าสงสัยอยู่ใน reiterated area ของยีน *PKD1* ต้องทำ long-range PCR เพื่อให้ได้ primary PCR product ที่เป็น *PKD1*-specific template ก่อนให้ครอบคลุมบริเวณที่น่าสงสัย หลังจากนั้นจึงทำ nested PCR และหาลำดับเบสเพื่อให้ทราบชนิดของมิวตาชัน ส่วนในกรณีที่เป็นบริเวณที่สงสัยอยู่ใน unique area ของยีน *PKD1* สามารถทำ PCR ครอบคลุมบริเวณนั้น และหาลำดับเบสได้โดยตรง

ตัวอย่างผลการตรวจหามิวตาชัน และการแปลผล

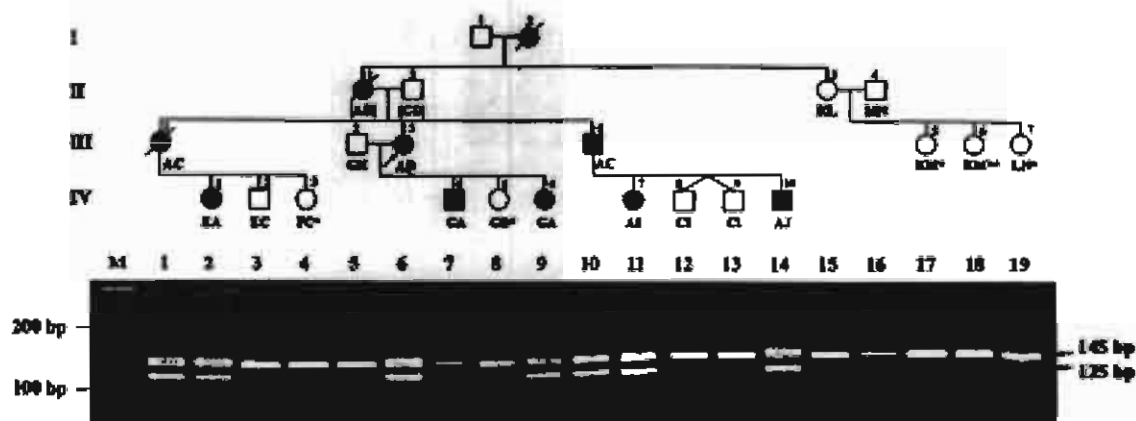
การทราบชนิดของมิวตาชันจากการตรวจในระดับ genomic DNA ทำให้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค PKD1 ที่ง่ายและรวดเร็วได้ ตัวอย่างเช่น การตรวจหามิวตาชันใน donor splice site ของ intron 13 ของ

จีน *PKD1* ในครอบครัว PK015 ที่ทำให้เกิด 74-bp deletion ใน exon 13 (IVS13-2A>T) ซึ่งผลปรากฏว่าตรวจพบในสมาชิกครอบครัว 11 คนที่เป็นโรค แต่ไม่พบใน 13 คนที่ไม่เป็นโรค (ภาพที่ 1) และการตรวจหา 20-bp deletion ใน intron 43 ของจีน *PKD1* ในครอบครัว PK009 ที่ทำให้เกิด exon 43 skipping (IVS43(+5 to +14)del20) ซึ่งตรวจพบในสมาชิกครอบครัว 8 คนที่เป็นโรค แต่ไม่พบใน 11 คนที่ไม่เป็นโรค (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 การตรวจหา IVS13-2A>T ของยีน *PKD1* ที่พบในครอบครัว PK015 โดยวิธี allele specific amplification (ASA) analysis ใน genomic DNA

ภาพแสดงพงศาวลีของครอบครัว PK015 และ haplotypes ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี linkage analysis โดยใช้ polymorphic marker ที่ linked กับยีน *PKD1* จำนวน 5 marker (หาค่าด้วยคอมพิวเตอร์จากฐานข้อมูลของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย) DNA ของแต่ละคนถูกวิเคราะห์โดยทำ PCR แยกเป็น 2 ปฏิกริยาคือ primer ที่จำเพาะกับ wild-type (W) allele และที่จำเพาะกับ mutant (M) allele ซึ่งให้ PCR-product ขนาด 259 bp เท่านั้น ปฏิกริยาให้ product แสดงว่ามี allele ชนิดนั้นอยู่ ส่วน PCR-product ขนาด 698 bp ใช้เป็นตัวประกันความผิดพลาดทางเทคนิค (internal control) ในทั้ง 2 ปฏิกริยา PCR product ของผู้ที่ไม่เป็นโรคมีเพียง wild-type allele ของผู้ที่ป่วยเป็นโรคมีทั้ง wild-type และ mutant allele การตรวจ DNA ในสมาชิกครอบครัว 24 คน พบมีผลข้างในผู้ที่เป็นโรคจำนวน 11 คน แต่ไม่พบในผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 13 คน (M แทน DNA marker ขนาด 100 bp DNA ladder)



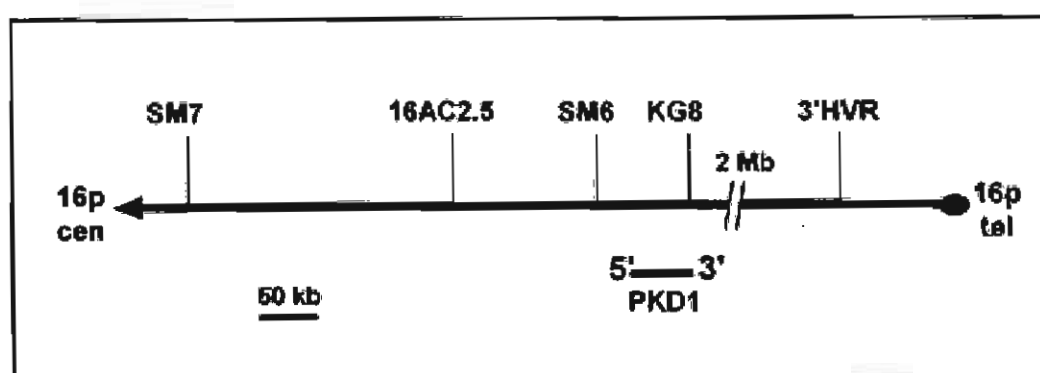
ภาพที่ 2 การตรวจการขาดหายของดีเอ็นเอจำนวน 20 เบสใน intron 43 ของยีน *PKD1* ในครอบครัว PK009 โดยวิธี genomic DNA amplification

ภาพพงศาวลีของครอบครัว PK009 และ haplotypes ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี linkage analysis การตรวจดีเอ็นเอในสมาชิกครอบครัว 19 คน พบการขาดหายของดีเอ็นเอใน intron 43 ในผู้ที่เป็นโรคจำนวน 8 คน แต่ไม่พบในผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 11 คน PCR product ของผู้ที่ไม่เป็นโรคมีเพียงขนาดเดียว คือ 145 bp ส่วน PCR product ของผู้ที่เป็นโรคมีทั้งขนาด 145 bp และ 125 bp ซึ่งเกิดจากการขาดหายของดีเอ็นเอจำนวน 20 เบส (M แทน DNA marker ขนาด 100 bp DNA ladder)

การวิเคราะห์ linkage

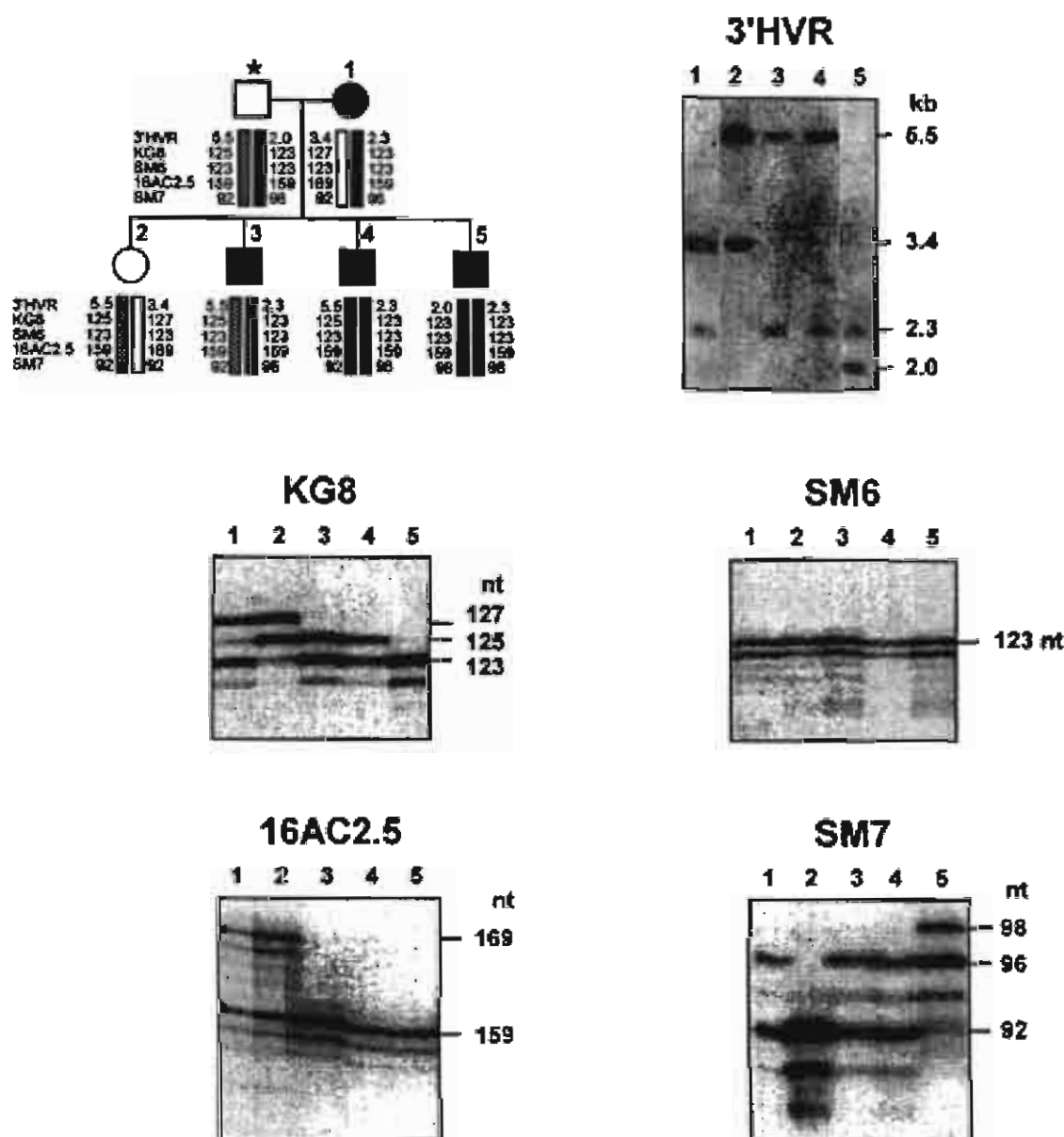
หลักการของการวิเคราะห์ linkage คือการเลือก DNA markers ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *PKD1* ทำให้มีโอกาสถ่ายทอดไปกับยีน *PKD1* สูง รวมทั้งมีความหลากหลาย (polymorphism) มาก ๆ จึงจะให้ข้อมูลที่ประโยชน์ (informative) ต่อการทำนายโรค 3' HVR probe เป็น marker ที่มี polymorphism มาก แต่อยู่ห่างจากยีน *PKD1* มากกว่า 2 Mb และต้องตรวจสอบด้วยวิธี Southern-blot hybridization ซึ่งมีขั้นตอนการทำยุ่งยาก ส่วน DNA markers อื่น ๆ ที่เลือกใช้อีก 4 ตำแหน่ง คือ KG8, SM6, 16AC2.5, และ SM7 เป็นจำพวก microsatellite ซึ่งตรวจได้ง่ายกว่า (ภาพที่ 3) การใช้ DNA markers ร่วมกันยิ่งมากขึ้น จะยิ่งช่วยให้การติดตามการถ่ายทอดของยีนผิดปกติมีความแม่นยำขึ้น

การวิเคราะห์ linkage ทำได้โดยสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดมาศึกษา 3' HVR DNA polymorphism ด้วยวิธี Southern-blot hybridization โดยย่อย genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pvu II* ก่อนทำ agarose gel electrophoresis เพื่อแยกขนาดของ DNA fragments แล้วจึงจับย้าย DNA จาก gel ลงบน nylon membrane จากนั้นจึงทำ hybridization ด้วย 3' HVR probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (^{32}P -labeled) แล้วประทับฟิล์มเอกซเรย์เพื่อให้ปรากฏเป็นแถบดำของ DNA fragments ที่ probe สามารถจับได้ (autoradiography) และอ่านผลโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างในขนาดของ DNA fragments ที่ถูกเอนไซม์ตัดซึ่งเรียกว่า restriction fragment length polymorphism (RFLP) ส่วนการวิเคราะห์ linkage ด้วย microsatellite DNA markers (KG8, SM6, 16AC2.5, และ SM7) ใช้การทำ PCR ที่ติดฉลากสารกัมมันตรังสีไว้ที่ปลาย 5' ของ primer แล้วนำ PCR products ซึ่งมีสารกัมมันตรังสีติดอยู่ไปทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และ autoradiography ตามลำดับ และอ่านผลโดยดูความแตกต่างของขนาด PCR products ที่ปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ซึ่งต่างกันเพียงไม่กี่เบสซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนชุดของ microsatellite ที่มัลติพลอคมีอยู่ใน DNA markers ตำแหน่งนั้น ๆ



ภาพที่ 3. แผนภูมิแสดงตำแหน่งของยีน *PKD1* และ DNA markers (SM7, 16AC2.5, SM6, KG8, และ 3' HVR) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ DNA linkage ในครอบครัวผู้ป่วย ADPKD

ตัวอย่างผลการตรวจวิเคราะห์ linkage และการแปลผล



ภาพที่ 4 ตัวอย่างผลการศึกษา DNA linkage ด้วย DNA markers 5 ชนิด ได้แก่ 3'HVR, KG8, SM6, 16AC2.5, และ SM7 ในครอบครัว ADPKD อื่น PKD1 ที่มีประวัติในครอบครัวนี้ด้วยสอดคล้องกับ haplotype ที่มี allele ขนาด 2.3 kb, 123 nt, 123 nt, 159 nt, และ 96 nt ลำดับของสมาชิกครอบครัวใน pedigree ซึ่งแสดงโดยหมายเลข (1-5) ตรงกับลำดับในการตรวจของ marker บิดาของครอบครัวนี้ (*) ไม่ได้ DNA มาสำหรับการตรวจ

ข้อบ่งชี้ในการตรวจ

การตรวจความผิดปกติของยีน *PKD1* จะกระทำในผู้ป่วยและญาติสายตรงในครอบครัวที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค ADPKD จากการซักประวัติครอบครัว การตรวจร่างกาย และการตรวจถุงน้ำที่ไตโดยวิธี ultrasonography การตรวจไม่พบถุงน้ำในบุคคลที่อายุน้อยยังไม่สามารถสรุปได้ว่าจะไม่เป็นโรค เนื่องจากการเกิดถุงน้ำที่ไตมีความสัมพันธ์กับอายุ ในกรณีเช่นนี้การวิเคราะห์ DNA linkage เพื่อตรวจการถ่ายทอดของยีน *PKD1* ที่

คิดปรกติสามารถช่วยวินิจฉัยโรคได้ ส่วนการตรวจหาไมวเคชั่นของยีน *PKD1* จะกระทำในกรณีที่มีวิเคราะห์ linkage แล้วพบว่าเป็นโรค *PKD1* ยกเว้นในรายที่ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ linkage ได้หรือใช้แล้วไม่ได้ผล เช่น มีผู้เป็นโรคเพียงคนเดียวในครอบครัว สมาชิกครอบครัวมีน้อย หรือผลการวิเคราะห์ linkage ไม่ให้ข้อมูลที่เพียงพอ (non-informative) เป็นต้น ในกรณีเหล่านี้ อาจทำการตรวจหาไมวเคชั่นของยีน *PKD1* ได้ทันที

ประสบการณ์ที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการ

นับตั้งแต่ปี พ.ศ.2531 เป็นต้นมา มีผู้ป่วยโรค ADPKD มารับการรักษาที่ ร.พ. ศิริราชมากกว่า 60 ครอบครัว ห้องปฏิบัติการหน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัยร่วมกับสาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ได้ทำการวิเคราะห์ DNA linkage ในผู้ป่วยและสมาชิกครอบครัวจาก 38 ครอบครัว จำนวน 218 คน พบว่า 23 ครอบครัวมี linkage กับยีน *PKD1* 5 ครอบครัวมีความเป็นไปได้ที่จะ link ไปกับยีน *PKD1* 1 ครอบครัวไม่มี linkage กับยีน *PKD1* ส่วนอีก 9 ครอบครัวยังไม่สามารถสรุปผล linkage ได้ เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ ประโยชน์ที่ได้จากการวิเคราะห์ DNA linkage กับครอบครัวผู้ป่วยโรค ADPKD ที่ผ่าน มาคือสามารถช่วยวินิจฉัยโรคในกรณีที่อาการแสดงคลุมเครือเพื่อให้การดูแลรักษาได้ถูกต้อง ช่วยทำนายโรคก่อนมี อาการสำหรับผู้ที่ต้องการทราบให้สามารถรับมือกับโรคอย่างถูกต้องและวางแผนชีวิตได้ ช่วยลดความวิตกกังวลใน รายที่คิดว่าตนเองได้รับถ่ายทอดโรคซึ่งที่ไม่ได้รับ และช่วยตรวจหาผู้บริจาคไต (donor) จากญาติพี่น้องให้ผู้ป่วยเพื่อ เปลี่ยนถ่ายไต

ส่วนการตรวจหาไมวเคชั่นของยีน *PKD1* ห้องปฏิบัติการฯ ได้ใช้เทคนิค long RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นมา ประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยโรค *PKD1* และได้รายงานการตรวจพบไมวเคชั่นที่ไม่เคยพบมาก่อนของยีนนี้ในคนไทยเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2543 และรายงานต่อมาในปี พ.ศ.2544 ไมวเคชั่นทั้งคู่ทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการคัดต่อ ออร์เอ็นเอ ซึ่งพบได้น้อย

การตรวจไมวเคชั่นของยีน *PKD1* เป็นประโยชน์โดยตรงต่อการวินิจฉัยโรคในสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วย เมื่อทราบชนิดไมวเคชั่นแล้วสามารถใช้วิธีตรวจทางดัดในผู้ที่ต้องการทราบสถานะโรคของตนเองได้ทันที นอกจากนี้ การตรวจหาไมวเคชั่นของยีน *PKD1* ยังช่วยให้ความกระจ่างเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคได้โดยจะช่วยขยายฐานข้อมูล เกี่ยวกับไมวเคชั่นของยีน *PKD1* และอาจได้ข้อมูลที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการแสดงของโรคกับชนิดของ ไมวเคชั่น (phenotype-genotype correlation) ซึ่งอธิบายผลของไมวเคชั่นต่ออาการแสดงของโรคได้ ฐานข้อมูลไมว เคชั่น ของยีน *PKD1* ที่สมบูรณ์จะช่วยให้เข้าใจถึงส่วนประกอบในโมเลกุลของ polycystin-1 ที่มีความสำคัญในการ ทำหน้าที่และนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจพยาธิกำเนิดระดับของโรคต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิงที่เป็นเอกสารหลัก (key reference)

- Burn TC, Connors TD, Deckowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Millholland JM, Venet M, Miller G, Hakim RM, Landes GM, Klinger KW, Qian F, Osochtis LF, Welnick T, Germino GG, Doggett NA. 1995. Analysis of the genomic sequence for the autosomal polycystic kidney disease (*PKD1*) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 4:575-582.
- Dacoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S. 1995. Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25:733-736.
- European Polycystic Kidney Disease Consortium. 1994. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77:881-894.
- Gabow PA. 1990. Autosomal dominant polycystic kidney disease: more than renal disease. *Am J Kidney Dis* 16:403-413.
- Germino GG, Somlo S, Weinstein-Saslow D, Reeders ST. 1993. Positional cloning approach to the autosomal dominant polycystic kidney disease gene, *PKD1*. *Kidney Int* 43 (Suppl 39):S20-S25.

- Harris PC, Thomas S, Ratcliffe PJ, Breuning MH, Coto E, Lopez LC. 1991. Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *Lancet* 338:1484-1487.
- Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gambile V, Harris PC. 1995. The polycystic kidney disease gene (*PKD1*) encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 10:151-160.
- International Polycystic Kidney Disease Consortium. 1995. Polycystic Kidney Disease: the complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 81:289-298.
- Koptides M, Mean R, Demetriou K, Pierides A, Deltas CC. Genetic evidence for a trans-heterozygous model for cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2000;9(3):447-52.
- Pei Y, Paterson AD, Wang KR, Ho N, Hefferton D, Watnick T, Germino GG, Parfrey P, Somlo S, St George-Hyslop P. Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001 Feb;68(2):355-63.
- Peral B, Ward CJ, San Millan JL, Thomas S, Stallings RL, Moreno F, Harris PC. 1994. Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease I population. *Am J Hum Genet* 54:899-908.
- Peters DJM, Spruit L, Ravine D, Sandhuji LA, Fosdal R, Botrama J, Eijk R van, Norby, Constantinou-Deltas CD, Pierides A, Brisseenden JE, Ommen GJB van, Breuning MH. 1993. Chromosome 4 location of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genet* 5:359-362.
- Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Germino GG. Mutation analysis of the entire replicated portion of *PKD1* using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(5):955-63.
- Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jurman AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ. 1985. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317:542-544.
- Rossetti S, Strmecki L, Gambile V, Burton S, Sneddon V, Peral B, Roy S, Bakaloglu A, Komel R, Wiscaris CG, Harris PC. Mutation analysis of the entire *PKD1* gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001;68(1):46-63.
- Rungroj N, Thongnoppakham W, Vareesangthip K, Sirinavin C, Wilairat P, Yenchitsommanus P. Molecular defect of *PKD1* gene resulting in abnormal RNA processing in a Thai family. *J Med Assoc Thai* 2001;84(9):1308-16.
- Thompson AD, Shen Y, Holman K, Sutherland GR, Callen DF, Richards RI. 1992. Isolation and characterization of (AC) microsatellite genetic marker from human chromosome 16. *Genomics* 13:402-408.
- Thongnoppakham W, Wilairat P, Vareesangthip K, Yenchitsommanus P. Long RT-PCR amplification of the entire coding sequence of the polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene. *BioTechniques* 1999;26(1):126-32.
- Thongnoppakham W, Rungroj N, Wilairat P, Vareesangthip K, Sirinavin C and Yenchitsommanus P. A novel splice-acceptor site mutation (IVS13-2A>T) of polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene resulting in RNA processing defect with 74-nucleotide deletion in exon 14 of the mRNA transcript. *Human Mutation* 2000; 15(1):113 (Online: Mutation in Brief #281, 1999).
- Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klingler KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 1998 Aug;2(2):247-51.
- Watnick T, He N, Wang K, Liang Y, Parfrey P, Hefferton D, St George-Hyslop P, Germino G, Pei Y. Mutations of *PKD1* in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations. *Nat Genet* 2000 Jun;25(2):143-4.

เรื่องน่ารู้สำหรับผู้ป่วย โรคไตเป็นถุงน้ำในผู้ใหญ่ และครอบครัว

จัดทำโดย

สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ และสาขาวิชา วัณโรควิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์

และ หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถาบันส่งเสริมการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

โรคไตเป็นถุงน้ำในผู้ใหญ่ หรืออีกชื่อหนึ่งคือ **โรคไตเป็นถุงน้ำชนิดเด่น** (ภาษาอังกฤษเรียกว่า autosomal dominant polycystic kidney disease) เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประชากรต่าง ๆ ทั่วโลก สำหรับประเทศไทยประมาณว่ามีผู้เป็นโรคนี้ 60,000 ถึง 150,000 คน

อาการของโรค

ผู้ที่เป็นโรคนี้มีถุงน้ำจำนวนมากที่เนื้อไตทั้ง 2 ข้าง ทำให้เกิดอาการผิดปกติ ได้แก่ ความดันเลือดสูง ปวดบั้นเอว ถ่ายปัสสาวะเป็นเลือด คลำพบก้อนในท้อง มีการติดเชื้อที่ไต เกิดนิ่วในไต และหน้าที่ของไตเสื่อมลง ผู้ป่วยโรคนี้ประมาณครึ่งหนึ่งเกิดภาวะไตวายตามมา

นอกจากนี้ไดยังพบถุงน้ำได้ที่อวัยวะอื่น ๆ อาทิ ตับและตับอ่อน แต่มักไม่ทำให้มีอาการ ผู้ป่วยบางรายมีหลอดเลือดโป่งพองในสมอง หรือความผิดปกติที่ลิ้นหัวใจ หรือไส้เลื่อน ร่วมด้วย

โดยทั่วไปอาการของโรคมักจะแสดงออกในวัยผู้ใหญ่ ในช่วงอายุประมาณ 25-30 ปี อาการและความรุนแรงของโรคอาจแตกต่างกันได้มาก ๆ ในผู้ป่วยแต่ละคน แม้แต่ในครอบครัวเดียวกันก็อาจมีอาการมากน้อยต่างกัน แต่บางคนก็ไม่มีอาการผิดปกติใด ๆ และมีชีวิตยืนยาวถึงแก่กรรมไป

สาเหตุที่ทำให้เกิดโรค

โรคไตเป็นถุงน้ำในผู้ใหญ่เกิดจากความผิดปกติของหน่วยพันธุกรรม ที่เรียกว่า ยีน ยีนของมนุษย์มีอยู่ทั้งหมด 3.2 หมื่น ยีน ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ และถ่ายทอดต่อไปยังลูกหลาน

โครงสร้างของยีนเป็นสารเคมีที่เรียกว่า "ดีเอ็นเอ" (DNA ย่อมาจาก deoxy-ribonucleic acid) ถ้าดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจาก "การกลายพันธุ์" หรือ "การผ่าเหล่า" ยีนก็จะทำหน้าที่ไม่ได้และเกิดเป็นโรคพันธุกรรมขึ้น

การถ่ายทอดโรคและความเสี่ยงต่อการเป็นโรค

ผู้ที่เป็นโรคไตเป็นถุงน้ำมีปัสสาวะที่กลายพันธุ์หนึ่งปัสสาวะ ซึ่งอาจได้รับถ่ายทอดมาจากบิดาหรือมารดา และสามารถถ่ายทอดต่อไปให้ลูกและหลานได้ ทั้งเพศชายและเพศหญิง ผู้ที่มีบิดาหรือมารดาเป็นโรค เสี่ยงต่อการเป็นโรคเท่ากับ 1 ต่อ 2 หรือ 50%

การปฏิบัติรักษา

ในปัจจุบันแพทย์สามารถวินิจฉัยโรคไตเป็นถุงน้ำได้ก่อนที่จะมีอาการ และการปฏิบัติรักษาที่เหมาะสมแต่เนิ่น ๆ จะช่วยป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากโรค

การรักษาที่สำคัญได้แก่ การใส่ยาเพื่อควบคุมความดันเลือดสูง การรักษาการติดเชื้อที่ไต รวมทั้งการผ่าตัดรักษาโรคไต จะช่วยชะลอการเสื่อมหน้าที่ของไตได้

การป้องกันและหลีกเลี่ยงการเกิดโรคในครอบครัว

สมาชิกครอบครัวผู้ป่วยโรคไตเป็นถุงน้ำควรมาพบแพทย์เพื่อตรวจว่าตนเองเป็นโรคหรือไม่ เพราะนอกจากประโยชน์ในด้านการรักษาแล้ว แพทย์ยังสามารถให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับความเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรค รวมทั้งทางเลือกต่าง ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการมีลูกเป็นโรค

สมาชิกครอบครัวที่ควรมาพบแพทย์

ผู้ที่เป็นญาติสายตรงของผู้ป่วยโรคไตเป็นถุงน้ำ ได้แก่ พ่อแม่ พี่น้อง และลูก ทั้งเพศชายและหญิง ควรมาพบแพทย์เพื่อรับการตรวจและคำปรึกษาแนะนำ

การนัดเพื่อตรวจโรคไตเป็นถุงน้ำ

ติดต่อขอนัดได้ที่

คลินิกพันธุศาสตร์

หน่วยอนุพันธุศาสตร์ ดีกอดูมเดรวิกรม ชั้น 10

โรงพยาบาลศิริราช ถนนพrawnนง บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

โทรศัพท์ 0-2418-3565 หรือ 0-2419-7000 ต่อ 6630 และ 6633

โทรสาร 0-2418-3565

เอกสารที่ควรนำมาด้วยเมื่อมาตรวจ

- บัตรประจำตัวประชาชน สำเนาทะเบียนบ้าน
- จดหมายส่งตัวจากแพทย์ที่ดูแลรักษาอยู่
- ประวัติการเจ็บป่วยที่ขอจากแพทย์หรือโรงพยาบาล และผลการตรวจต่าง ๆ ที่เคยทำมาแล้ว (เช่น การตรวจเลือด ปัสสาวะ เอ็กซเรย์หรืออัลตราซาวนด์ไต)

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header.

Main body of handwritten text, organized into several columns and rows, likely a list or table.

Handwritten text on the left side of the page, possibly a margin or a separate column.

Handwritten text at the bottom of the page, possibly a footer or a concluding note.