

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5080059

ชื่อโครงการ : การศึกษาเพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมของผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำด้วยวิธีการตรวจทั้งจีโนมด้วยไมโครอาร์เรย์

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวัลยา จงเจริญประเสริฐ
สังกัดหน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : wallayaj@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

Thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis (THPP) เป็นโรคที่มีอาการอ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมต่ำในผู้ป่วยที่มีภาวะไทรอยด์เป็นพิษ พบบ่อยในชาวเอเชีย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค ตลอดจนการศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค THPP ในเซลล์ทดลอง ประชากรที่นำมาศึกษาประกอบด้วย 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มทดสอบประกอบด้วยผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษ THPP ทั้งสิ้น 81 และ ผู้ป่วยกลุ่มควบคุม 74 คน และกลุ่มยืนยันประกอบด้วย THPP 28 คนและ กลุ่มควบคุม 48 คน โดยวิธีการศึกษาประกอบด้วย 4 รูปแบบได้แก่ 1 genome-wide association study (GWAS) ร่วมกับ Pooled DNA โดย ตรวจ Whole genome genotyping ด้วย 500K DNA GeneChip microarrays 2. GWAS เป็นการตรวจ individual genotyping บน Illumina Human-Hap610 Genotyping BeadChip 3 Individual genotyping ของ Haplotype tagging SNPs (htSNPs) ของยีน *GABRA3*, *CACNA1S*, *SCN4A*, *DPP6*, และ *GLRA1* 4. การทดสอบผลของฮอร์โมนไทรอยด์และอินซูลินต่อการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อลาย ผลการศึกษา GWAS-Pooled DNA เบื้องต้นพบความสัมพันธ์ของ rs749120 ใกล้ยีน *DPP6* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน ที่ทำหน้าที่เป็น subunit ของ Kv4.2 potassium channel กับโรค THPP ($p=0.02$) แต่เมื่อผู้วิจัยได้ขยายการ genotyping ไปอีก 4 SNPs ใกล้ rs749120 ผลที่ได้ไม่ยืนยันความสัมพันธ์กับโรค ผลการวิจัย GWAS ทำให้เราพบ rs623011 ซึ่งตั้งอยู่ที่ 75-kb ห่างจาก 3'UTR ของ *KCNJ2* สัมพันธ์กับการเกิดโรคมากที่สุด ($P=3.23 \times 10^{-8}$, $OR=6.72$; 95%CI=3.11-14.5) และเมื่อทำการทดสอบยืนยันในกลุ่มประชากรที่ 2 ผลการศึกษายืนยันความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P=3.44 \times 10^{-5}$, $OR=5.13$; 95% CI=1.87-14.1) งานวิจัยนี้ยังพบความสัมพันธ์ของ 25 htSNPs ที่อยู่ใกล้ *GABRA3* กับโรค THPP ($P=2.23 \times 10^{-4}$, $OR=7.87$; 95%CI=2.23-27.76) และพบว่าทำให้ ฮอร์โมนไทรอยด์ T4 และอินซูลินไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลง รูปร่างและการหดตัวของ C2C12

สรุป งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงข้อดีของการศึกษาแบบ GWAS-pooled DNA และเป็นการศึกษาแรกในโลกที่ทำการตรวจ GWAS ในโรค THPP และพบความสัมพันธ์ของ SNP rs623011 ที่อยู่ใกล้ ยีน *KCNJ2* กับโรค THPP ในคนไทย และหากมีการทดสอบเพิ่มเติมในประชากรอื่นจะเป็นการยืนยันผลที่ได้

คำหลัก: Genome-wide association study, Hyperthyroidism, Hypokalemic Periodic Paralysis

Abstract

Project Code: RMU5080059
Project Title: Microarray based whole genome scan for genetic susceptibility of thyrotoxic periodic paralysis
Investigator: Assoc Prof Wallaya Jongjaroenprasert, MD
Endocrine Unit, Department of Medicine
Ramathibodi Hospital, Mahidol University
E-mail Address: wallayaj@gmail.com
Project Period: 3 years

In this study, for the first time we performed genome-wide association study (GWAS) to find the susceptible loci to THPP in Thais both individual genotyping and DNA pooling approaches. We also performed candidate gene association study by genotyping haplotype tagging SNPs (htSNP) and start set up functional study by using C2C12 cell. For GWAS-pooled DNA analysis, we quantified equal amount of DNA from 50 THPP cases and 50 hyperthyroid male without hypokalemia as controls and pooled into 2 groups. We genotyped with 500K DNA GeneChip microarrays. There are more than 100 SNPs found significant difference in estimated allele frequencies comparing between case and control pools. Among them, SNP rs749120 near *DPP6* was selected for individual genotyping. However, we could not confirm the association after we extended genotyping 4 htSNPs closed to rs749120 of *DPP6*. For candidate gene approach, we examined the association of htSNPs of *GABRA3*, *CACNA1S*, *SCN4A* (have previously been demonstrated associated with THPP), *DPP6*, and *GLRA1* with THPP. Totally 116 htSNPs was successfully genotyped using multiplex-PCR-based method on the Invader assay. Only 25 htSNPs located in the intron 3 of *GABRA3* were strongly associated with THPP ($P = 2.23 \times 10^{-4}$, OR 7.87, (95%CI; 2.23-27.76)). However, no mutation was found in the adjacent exons of *GABRA3* (exon2-4) by direct sequencing method. For GWAS, we genotyped 78 THPP cases and 74 controls with Illumina Human-Hap610 Genotyping BeadChip. Among the SNPs analyzed in the GWAS, rs312729 at chromosome 17 revealed the lowest P-value for association ($P = 2.09 \times 10^{-7}$). After fine mapping, we found rs623011; located at about 75-kb downstream of *KCNJ2* gene, was the most significant among the ten associated SNPs even after adjustment for multiple comparison ($P = 3.23 \times 10^{-8}$, OR = 6.72; 95% CI= 3.11-14.5). The association of rs623011 was replicated both in replication cohort and combined-analysis ($P = 3.44 \times 10^{-5}$, OR=5.13; 95% CI=1.87-14.1; combined-analysis $P = 3.71 \times 10^{-12}$, OR=5.46; 95% CI=3.04-9.83).

In summary: Our study demonstrates for the first time the association between rs623011 and THPP in Thais. Further study in different ethnic group will confirm these findings.

Keywords: Genome-wide association study, Hyperthyroidism, Hypokalemic Periodic Paralysis