บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5180045

ชื่อโครงการ: การวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์ที่ปรับปรุงใหม่สำหรับยีนที่เป็นสาเหตุของโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (ADPKD): วิธีตรวจที่มีประสิทธิภาพโดยใช้ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

ชื่อหัวหน้าโครงการ: อาจารย์ ดร. วรรณา ทองนพคุณ
หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address: wanna.tho@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 4 ปี 6 เดือน (15 พฤษภาคม 2551 – 15 พฤศจิกายน 2555)

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD เป็นโรคพันธุกรรมที่คุกคามชีวิตซึ่งพบได้บ่อยที่สุดโรคหนึ่งในประชากรทั่วโลก เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ยีน *PKD1* หรือ *PKD2* ร้อยละ 85 และ 15 ตามลำดับ การตรวจยีนทั้งสองต้องทำให้ครบตลอดทั้งยีนก่อนที่จะสรุปผลได้ จึงทำให้เป็นงานที่ต้องใช้เวลามาก ต้องอาศัยเทคนิคอย่างสูงและค่าใช้จ่ายแพง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วยโรค ADPKD ในประเทศไทย โดยประยุกต์ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงคือ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) เพื่อพัฒนาแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐาน คุ้มค่า เหมาะสมกับสภาวะของผู้ป่วยไทย โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรค ADPKD รวม 70 ครอบครัวที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกัน การศึกษานี้ครอบคลุมบริเวณสำคัญทั้งหมดของยีนทั้งสอง รวมใช้ primer ทั้งสิ้น 78 คู่ เป็น primer สำหรับยีน *PKD1* จำนวน 61 คู่ (long-range PCR จำนวน 2 คู่ และ nested PCR จำนวน 59 คู่) และ primer สำหรับยีน *PKD2* จำนวน 17 คู่ โดยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิด partial denaturation ของแต่ละ amplicon ในเครื่อง DHPLC สำหรับวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ด้วยการเลือกลักษณะ peak ที่ผิดปกติออกมาเพื่อตรวจยืนยันด้วย DNA sequencing ผลการวิจัยพบข้อมูลการกลายพันธุ์ในยีนทั้งสองที่มีความหลากหลายมาก และแต่ละชนิดมักพบในครอบครัวเดียวเป็นส่วนใหญ่ ในส่วนของยีน *PKD1* มีการกลายพันธุ์ที่เป็นข้อมูลค้นพบใหม่ จำนวน 35 ชนิด (ซึ่งเป็น definite mutations 15 ชนิด) กับที่เคยมีรายงานแล้วอีก 11 ชนิด รวมเป็น 46 ชนิด ส่วนของยีน *PKD2* มีการกลายพันธุ์ที่พบใหม่จำนวน 5 ชนิด (เป็น definite mutation 2 ชนิด) กับที่เคยรายงานแล้วอีก 5 ชนิด รวมเป็น 10 ชนิด ซึ่งนับเป็นรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน *PKD2* เป็นครั้งแรกของประชากรชาวไทยซึ่งพบถึงร้อยละ 25.0 (16/64) ของการกลายพันธุ์ที่พบทั้งหมด อย่างไรก็ตาม การค้นพบ missense variants จำนวนมากในงานวิจัยนี้ยังคงต้องการการตรวจสอบเพิ่มเติมว่าเป็นสาเหตุของโรคจริงหรือไม่ ส่วนในผู้ป่วยที่ยังตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ใดๆ อาจเป็นเพราะมี large deletions หรือ points mutations ในบริเวณที่การตรวจครั้งนี้ครอบคลุมไปไม่ถึง ข้อมูลผลงานวิจัยที่ได้จะได้เสนอเข้าไปสมทบกับฐานข้อมูลสากล ADPKD mutation database ต่อไป เพื่อขยายขอบเขตของฐานข้อมูลให้กว้างขวางครอบคลุมกลุ่มประชากรโลกเพิ่มขึ้น และยังได้นำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ต่อไป จากงานวิจัยนี้ประเมินได้ว่า DHPLC เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง มีความไว เชื่อถือได้ ได้มาตรฐาน คุ้มค่า มีอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์อยู่ที่ประมาณร้อยละ 91.4 (64/70) โดยที่เป็น definite mutation ถึงร้อยละ 54.3 (38/70) และเป็น indeterminate variant ร้อยละ 37.1 (26/70) จึงนับเป็นเครื่องมือที่มีสมรรถนะสูงในการใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ของโรค ADPKD ซึ่งสมควรนำมาใช้จริงในงานบริการทางการแพทย์ อย่างไรก็ดี แนวทางและวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองยีนนี้ยังสามารถพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นได้อีกในอนาคต โดยอาศัยเทคนิคอื่นมาช่วยประกอบเพื่อช่วยลดเวลาและแรงงานในการตรวจวิเคราะห์ลงได้อีก

คำหลัก: autosomal dominant polycystic kidney disease, *PKD1, PKD2,* DHPLC, ADPKD

Abstract

Project Code: RMU5180045

Project Title: Improved molecular analysis of the genes causing autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): an efficient approach using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

Investigator: Lecturer Dr. Wanna Thongnoppakhun

E-mail address: wanna.tho@mahidol.ac.th

Project Period: 4 years 6 months (15 May 2008 – 15 November 2012)

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most common life-threatening disorder caused by mutations in *PKD1* and *PKD2* genes which are responsible for about 85% and 15% of all ADPKD cases, recpectively. Complete mutation analysis in both genes must be performed before giving a definite diagnosis. This makes identification of *PKD1* and *PKD2* mutations time consuming, technically demanding and expensive. This study aimed to apply the efficient technique, denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) to develop the standard and cost-effective strategy and method which are appropriate for Thai population via mutation screening in blood samples obtained from 70 unrelated ADPKD patients. The experimental design covers all coding sequences of *PKD1* and *PKD2* comprising a total of 78 amplicons (of which 61 in *PKD1*: 2 long-range PCR and 59 nested PCR, and 17 PCR amplicons in *PKD2*). A range of optimum temperatures for partial fragment denaturation of each amplicon in DHPLC system was used in the mutation analysis. Mutations were identified by their distinct elution peak patterns (non-wild-type profiles) on the chromatogram and were confirmed by DNA sequencing. Heterogeneous mutations in both genes were identified, most of them were found in a single family. For *PKD1* mutations, 35 out of 46 were novel (of which 15 were definite), while the rest 11 were reported. For *PKD2* mutations, 5 out of 10 were novel (of which 2 were definite), while the rest 5 were reported. This study is the first report for *PKD2* mutations in Thai population which account for 25.0% (16/64) of all identified mutations. However, a large number of missense variants found in this study requires more approval whether they were pathogenic. In the patients whose mutations could not be identified, the causative changes might be large deletions or points mutations located in regulatory elements and/or intronic regions distant from the coding region that are not covered by the test. The mutation data from this project will be submitted to the ADPKD mutation database to extend the database for more ethnic groups and further used in clinical practice as well as for genetic counseling. DHPLC technique was evaluated to be efficient, sensitive, reliable, standard, cost-effective and having a high mutation detection rate of 91.4% (64/70), of which 54.3% (38/70) were definite mutations and 37.1% (26/70) were indeterminate variants, thus being a powerful method for molecular diagnosis of ADPKD that should be implemented as a routine test for proper clinical care. Nevertheless, the strategy and method for mutation detection of *PKD1* and *PKD2* could be better developed in the future by any modified techniques to save the time and labor of the genetic testing.

Keywords: autosomal dominant polycystic kidney disease, *PKD1, PKD2,* DHPLC, ADPKD