



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์ที่ปรับปรุงใหม่
สำหรับยีนที่เป็นสาเหตุของโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (ADPKD):
วิธีตรวจที่มีประสิทธิภาพโดยใช้
denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

โดย อาจารย์ ดร. วรรณาทองนพคุณ

เดือน ปีที่เสร็จโครงการ
พฤศจิกายน 2555

สัญญาเลขที่ RMU5180045

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์ที่ปรับปรุงใหม่
สำหรับยีนที่เป็นสาเหตุของโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (ADPKD):
วิธีตรวจที่มีประสิทธิภาพโดยใช้
denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

ผู้วิจัย อาจารย์ ดร. วรณา ทองนพคุณ
สังกัด หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการผู้พิจารณาโครงการวิจัย และคณะผู้บริหารสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ รวมทั้งคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และมหาวิทยาลัยมหิดลที่มีส่วนส่งเสริมสนับสนุนให้เกิงานวิจัยนี้ ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์ แม้จะล่าช้ากว่ากำหนดไปมากเนื่องจากข้อจำกัดด้านเทคนิคและการรวบรวมจำนวนผู้ป่วยให้มากพอซึ่งต้องใช้เวลาานานมาก ประกอบกับการที่มีสถานการณ์น้ำท่วมปลายปี 2554 และการต้องย้ายสถานที่ทำการของห้องปฏิบัติการที่ทำการวิจัยทำให้เสียเวลาเพิ่มขึ้นอีกหลายเดือน

โครงการวิจัยนี้นับเป็นงานต่อเนื่องมายาวนานจากยุคบุกเบิกของงานด้านอนุพันธุศาสตร์ทางการแพทย์ในประเทศไทยโดยรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงจินตนา ศิรินาวัน อดีตหัวหน้าหน่วยอนุพันธุศาสตร์สถานส่งเสริมการวิจัย และอดีตหัวหน้าสาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ซึ่งอุทิศตนในการดูแลผู้ป่วยโรคพันธุกรรมด้วยความเอื้ออาทร เอาใจใส่ในรายละเอียด ถือเป็นแรงบันดาลใจให้ผู้วิจัยและคณะได้มีโอกาสสานต่อมาจนปัจจุบัน ด้วยเหตุผลที่โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (ADPKD) นี้เป็นโรคพันธุกรรมที่มีผลกระทบสูงที่สุดโรคหนึ่งในประชากรทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ประกอบกับความน่าสนใจในแง่องค์ความรู้เกี่ยวกับโรคนี้นี้ยังมีอย่างกว้างขวางไม่สิ้นสุดเพื่อเป้าหมายในการพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัวที่เป็นโรคนี้ให้ดีที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

ขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยในครั้งนี้ซึ่งอยู่ในคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลทุกท่าน อันประกอบด้วยรองศาสตราจารย์นายแพทย์เกรียงศักดิ์ วรวิเสสทิพย์ หัวหน้าสาขาวิชาวักกะวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ แพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคไตซึ่งทำหน้าที่ตรวจวินิจฉัย ดูแลรักษาผู้ป่วย ให้ข้อมูลทางคลินิก และรวบรวมตัวอย่างเลือด, อาจารย์นายแพทย์ชนินทร์ ลิ้มวงศ์ หัวหน้าหน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์มานพ พิทักษ์ภากร หัวหน้าสาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ ซึ่งทั้งสองท่านนี้เป็นแพทย์เวชพันธุศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วย, ศาสตราจารย์ ดร. เพทาย เย็นจิตโสมนัส หัวหน้าหน่วยอนุเวชศาสตร์สถานส่งเสริมการวิจัยผู้ให้คำปรึกษาแนะนำด้านวิชาการ และที่สำคัญ คือนางสาวดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ นักวิทยาศาสตร์สังกัดสาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ซึ่งปฏิบัติงานวิจัยในห้องปฏิบัติการอย่างเข้มแข็งด้วยความอุตสาหะเป็นอย่างยิ่งด้วยเหตุที่เป็นงานที่ทำได้ยากและมีจำนวนมาก นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณคุณชอลัดดา เมฆิยานนท์ พยาบาลประจำสาขาวิชาวักกะวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ ผู้ให้บริการเป็นเลิศในการช่วยรวบรวมและให้คำอธิบายแก่ผู้ป่วยด้วยดีตลอดมา

งานวิจัยนี้ถ้าปราศจากความร่วมมือเป็นอย่างดีจากผู้ป่วยโรค ADPKD และสมาชิกครอบครัวทุกท่าน คงไม่สามารถดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ได้ลุล่วง คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ อาณิสสอันใดที่จะเกิดจากโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยขออุทิศให้ครูบาอาจารย์ ผู้มีพระคุณ แพทย์พยาบาลผู้ดูแลผู้ป่วยรวมทั้งผู้ป่วยโรค ADPKD และครอบครัวทุกท่าน

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5180045

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

ชื่อหัวหน้าโครงการ: อาจารย์ ดร. วรณา 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 คุ่มค่า 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 โดยเลือกใช้ข้อมูลที่มีเหมาะสมต่อการเกิด partial denaturation ของแต่ละ amplicon ในเครื่อง DHPLC สำหรับวิเคราะห์หากการกลายพันธุ์ด้วยการเลือกลักษณะ 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) กับที่เคยมีรายงานแล้วอีก 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 ข้อมูลผลงานวิจัยที่ได้จะได้นำเสนอเข้าไปสมทบกับฐานข้อมูลสากล ADPKD mutation database ต่อไป เพื่อขยายขอบเขตของฐานข้อมูลให้กว้างขวางครอบคลุมกลุ่มประชากรโลกเพิ่มขึ้น และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ต่อไป จากงานวิจัยนี้ประเมินได้ว่า DHPLC เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง มีความไว เชื่อถือได้ ได้มาตรฐาน คุ่มค่า มีอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์อยู่ที่ประมาณร้อยละ 91.4 (64/70) โดยที่เป็น definite mutation ถึงร้อยละ 54.3 (38/70) และเป็น indeterminate variant ร้อยละ 37.1 (26/70) จึงนับเป็นเครื่องมือที่มีสมรรถนะสูงในการใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ของโรค ADPKD ซึ่งสมควรนำมาใช้จริงในงานบริการทางการแพทย์ อย่างไรก็ตาม 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, respectively. 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

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

ชื่อโครงการและผู้วิจัย	1
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	5
สารบัญภาพ (List of Figures)	6
สารบัญตาราง (List of Tables)	7
Executive Summary	8
บทนำ (Introduction)	10
วัตถุประสงค์ของโครงการ	18
วิธีการทดลอง (Methodology)	19
ผลการทดลองและวิจารณ์ (Results and Discussion)	35
- การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน <i>PKD1</i> ใน proband	35
- การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน <i>PKD2</i> ใน proband	54
ผลการวิเคราะห์การถ่ายทอดการกลายพันธุ์ในครอบครัวผู้ป่วย ADPKD โดยใช้วิธี DHPLC	61
บทวิจารณ์โดยรวมและข้อเสนอแนะ	71
ข้อสรุปที่ได้จากงานวิจัยนี้	81
หนังสืออ้างอิง (References)	84
Output ที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว	92
ภาคผนวก (Appendix)	95

สารบัญภาพ (List of Figures)

ภาพที่ 1.	โครงสร้างของยีน <i>PKD1</i> ที่ระดับ DNA, mRNA และโปรตีน Polycystin-1 (PC1)	12
ภาพที่ 2.	โครงสร้างของยีน <i>PKD2</i> ที่ระดับ DNA และ mRNA	12
ภาพที่ 3.	ปฏิสัมพันธ์ทาง C-terminus ของโปรตีน Polycystin-1 (PC1) และ Polycystin-2 (PC2)	13
ภาพที่ 4.	ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโปรตีน PC1 หรือ PC2	13
ภาพที่ 5.	แผนภูมิแสดงขั้นตอนหลักในการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ของยีน <i>PKD1</i> และ <i>PKD2</i>	19
ภาพที่ 6.	การตรวจวิเคราะห์ยีน <i>PKD1</i>	21
ภาพที่ 7.	PCR product ทั้งหมดใน genomic DNA ของยีน <i>PKD1</i> ที่ได้จากการทำ nested PCR	27
ภาพที่ 8.	PCR product ทั้งหมดของยีน <i>PKD2</i> ที่ได้จากการทำ PCR	27
ภาพที่ 9.	หลักการของ DHPLC ในการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ (mutation screening)	32
ภาพที่ 10-37.	ผลการตรวจ mutation analysis ในยีน <i>PKD1</i>	39-53
ภาพที่ 38-46.	ผลการตรวจ mutation analysis ในยีน <i>PKD2</i>	56-60
ภาพที่ 47-50.	การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>PKD1</i> ในครอบครัวผู้ป่วย	62-65
ภาพที่ 51-53.	การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน <i>PKD2</i> ในครอบครัวผู้ป่วย	66-68

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1.	รายละเอียดของไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน <i>PKD1</i>	22
ตารางที่ 2.	รายละเอียดไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน <i>PKD2</i>	26
ตารางที่ 3.	สภาวะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ทั้งหมดของยีน <i>PKD1</i>	29
ตารางที่ 4.	สภาวะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ทั้งหมดของยีน <i>PKD2</i>	31
ตารางที่ 5.	สรุปผลการตรวจพบ <i>PKD1</i> mutations และ SNPs ในผู้ป่วย ADPKD (ตามลำดับ exon)	36
ตารางที่ 6.	สรุปผลการตรวจพบ <i>PKD2</i> mutations และ SNPs จากผู้ป่วย ADPKD	55
ตารางที่ 7.	สรุปผลการตรวจพบ definite mutations, indeterminate variants และ polymorphisms ทั้งในยีน <i>PKD1</i> และ <i>PKD2</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทย 70 ครอบครัวและอัตราการตรวจพบในงานวิจัยนี้	69
ตารางที่ 8.	Definite mutations ที่ตรวจพบในยีน <i>PKD1</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (23 <i>PKD1</i> mutations in 27 ADPKD Families)	71
ตารางที่ 9.	Indeterminate variants ที่ตรวจพบในยีน <i>PKD1</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (22 <i>PKD1</i> variants in 21 ADPKD Families)	72
ตารางที่ 10.	Definite mutations ที่ตรวจพบในยีน <i>PKD2</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (6 <i>PKD2</i> mutations in 11 ADPKD Families)	73
ตารางที่ 11.	Indeterminate variants ที่ตรวจพบในยีน <i>PKD2</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (4 <i>PKD2</i> variants in 5 ADPKD Families)	73
ตารางที่ 12.	Polymorphisms ที่พบในยีน <i>PKD1</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (90 SNPs)	74
ตารางที่ 13.	Polymorphisms ที่พบในยีน <i>PKD2</i> จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (9 SNPs)	76
ตารางที่ 14.	สัดส่วนของประเภทการกลายพันธุ์ในยีน <i>PKD1</i> และ <i>PKD2</i> ที่ตรวจพบจากงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นที่ทำในประชากรกลุ่มใหญ่ๆ	79
ตารางที่ 15.	อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน <i>PKD1</i> และ <i>PKD2</i> จากงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นที่ใช้วิธีการเดียวกันและวิธีการอื่นๆ ที่ใช้กันในปัจจุบัน	80

Executive Summary

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมประเภทคุกคามชีวิตที่พบบ่อยที่สุดโรคหนึ่งในประชากรทั่วโลก ประเมินว่ามีคนไทยเป็นโรคนี้ไม่น้อยกว่า 65,000-160,000 คน โรค ADPKD เป็นสาเหตุของภาวะไตวายระยะสุดท้าย (end-stage renal failure, ESRD) ถึงร้อยละ 10 ของภาวะไตวายทั้งหมด ส่งผลกระทบต่อชีวิต การงาน ครอบครัว สังคม และเศรษฐกิจทั้งของผู้ป่วยและของประเทศชาติโดยรวม ในปัจจุบัน การรักษาโรค ADPKD ทำได้เพียงรักษาตามอาการและประคับประคองไม่ให้อาการรุนแรงขึ้น แต่วิธีที่ดีที่สุดคือ การควบคุมและป้องกันการถ่ายทอดโรคสู่รุ่นลูกหลานด้วยการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling) เกี่ยวกับอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคและทางเลือกในการวางแผนครอบครัว การวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำในแต่ละครอบครัวจึงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการดูแลรักษาผู้ป่วยและญาติ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อหาการกลายพันธุ์ที่ยีน *PKD1* หรือ *PKD2* ที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ร้อยละ 85 และ 15 ตามลำดับ แต่ยีน *PKD1* มีธรรมชาติด้านโครงสร้างที่ทำให้การศึกษายีนนี้ทำได้ยากที่สุดยีนหนึ่ง กล่าวคือมี GC content สูง, CT tract ที่ใหญ่มาก, มี pseudogenes ถึง 6 ยีนที่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ และมีการกระจายตัวของอาการกลายพันธุ์ทั่วทั้งยีน รวมทั้งของยีน *PKD2* ด้วย การตรวจยีนทั้งสองต้องทำให้ครบตลอดทั้งยีนก่อนที่จะสรุปผลได้ จึงทำให้เป็นงานที่ต้องใช้เวลามาก ต้องใช้เทคนิคยุ่งยาก และราคาค่าตรวจแพง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิด และอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วยโรค ADPKD ในประเทศไทย โดยประยุกต์ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงคือ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) แทนวิธีที่เคยใช้อยู่เดิม (คือ multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism, MRF-SSCP) เพื่อพัฒนาแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐาน คุ่มค่า เหมาะสมกับสภาวะของผู้ป่วยไทย โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค ADPKD รวม 70 ครอบครัวที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกัน งานวิจัยนี้เน้นการศึกษาที่ระดับ genomic DNA และยีนย่นด้วย mRNA ภายหลังในกรณีที่จำเป็น โดยใช้ PCR primer สำหรับ genomic DNA ของยีน *PKD1* และยีน *PKD2* ซึ่งครอบคลุมบริเวณสำคัญทั้งหมดของยีนทั้งสอง รวมทั้งสิ้น 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 และได้ทำการทดลองปรับค่าตัวแปรต่างๆ จนได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ทั้งหมด สำหรับการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ (mutation screening) ด้วยวิธี DHPLC

งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ของผู้ป่วยโรค ADPKD ในประเทศไทย ซึ่งจะได้เสนอเข้าไปสมทบกับฐานข้อมูลสากล ADPKD mutation database (<http://pkdb.mayo.edu>) ต่อไป เพื่อขยายขอบเขตของฐานข้อมูลให้กว้างขวางครอบคลุมกลุ่มประชากรโลกเพิ่มขึ้น การกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองมีความหลากหลาย (heterogeneity) มาก และแต่ละชนิดมักพบในครอบครัวเดียวเท่านั้นเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ ในส่วนของยีน *PKD1* มีการกลายพันธุ์ที่ถือเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อน (novel mutations) จำนวน 34 ชนิด (ซึ่งเป็น definite mutations 15 ชนิด) กับ

ที่เคยมีรายงานแล้วอีก 11 ชนิด รวมเป็น 45 ชนิด ส่วนของยีน *PKD2* มีการกลายพันธุ์ชนิดที่พบใหม่จำนวน 5 ชนิด (เป็น definite mutation 2 ชนิด) กับที่เคยรายงานแล้วอีก 5 ชนิด รวมเป็น 10 ชนิด ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน *PKD2* เป็นครั้งแรกของประชากรชาวไทย การค้นพบการกลายพันธุ์ชนิด in-frame deletions/insertions และ missense mutations ในยีน *PKD1* จำนวน 26 ชนิด (เป็น novel mutations 22 ชนิด) และในยีน *PKD2* 4 ชนิด (เป็น novel mutations 3 ชนิด) ถือเป็นข้อมูลสำคัญที่อาจแสดงถึงตำแหน่งกรดอะมิโนหรือบริเวณของโปรตีน polycystins ที่มีความสำคัญในการทำหน้าที่ในเซลล์และช่วยให้ความกระจ่างถึงกลไกระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิดถุงน้ำในไตในโรค ADPKD โดยเฉพาะในผู้ป่วยรายที่ชนิดของการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์ไปกับลักษณะทางคลินิกของโรค (genotype-phenotype relationship) อย่างชัดเจน ความเข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดโรคนี้สามารถนำไปสู่การป้องกันและรักษาที่ได้ผลดีต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตาม missense variants จำนวนมากที่พบในงานวิจัยนี้ยังคงต้องการการตรวจสอบเพิ่มเติมว่าเป็นสาเหตุของโรคจริงหรือไม่ ด้วยข้อจำกัดในแง่สมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยซึ่งไม่สามารถหามาช่วยยืนยันได้ และความยากลำบากในการศึกษายีน *PKD1* ที่มีโครงสร้างซ้ำซ้อน การพิสูจน์ missense variants จึงยังทำได้ไม่สมบูรณ์ และให้ถือว่า missense variants เป็น indeterminate variants ไว้ก่อน

ในแง่ความก้าวหน้าเชิงเทคโนโลยี การศึกษายีน *PKD1* และ *PKD2* ในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง มีความไว เชื่อถือได้ ใช้งานได้สะดวกรวดเร็วแบบกึ่งอัตโนมัติ คือ DHPLC อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ (mutation detection rate) อยู่ที่ประมาณร้อยละ 90 สำหรับการกลายพันธุ์รวมทุกชนิด จึงนับว่า DHPLC เป็นแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐาน, คุ่มค่ากว่าหลายวิธีที่เคยใช้มาก่อนหน้านี้ และมีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ได้ทางปฏิบัติเหมาะสมกับการศึกษายีนขนาดใหญ่ๆ ในกรณีสองยีนนี้โดยเฉพาะถ้ามีจำนวน samples มากๆ ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก อย่างไรก็ตามแนวทางและวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองยีนนี้ยังสามารถพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นได้อีกในอนาคต โดยอาศัยเทคนิคอื่นมาช่วยประกอบ เพื่อช่วยลดเวลาและแรงงานในการตรวจวิเคราะห์ลงได้อีก

ข้อมูลผลงานวิจัยที่ได้จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เพื่อช่วยวินิจฉัยโรค การเฝ้าระวังการเกิดโรค การดูแลรักษาที่เหมาะสม และการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ต่อไป ในหลายๆ สถานการณ์ทางการแพทย์ ผลการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ของโรค ADPKD ถือเป็นข้อมูลที่ใช้รับรองได้ เช่น ใช้วินิจฉัยโรคที่แน่นอนในผู้ป่วยอายุน้อยที่ไม่มีประวัติคนเป็นโรค ADPKD ในครอบครัวเลยหรือในผู้ป่วยที่มีอาการแสดงไม่ชัดเจน ผลการตรวจดังกล่าวยังมีคุณค่าอย่างยิ่งในกรณีต้องตัดสินใจตัดสินสภาวะโรคของญาติผู้ป่วยที่ประสงค์จะบริจาคไตให้ผู้ป่วย ส่วนในเชิงวิชาการ ข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่ค้นพบในงานวิจัยนี้ ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นต้องมีก่อนที่จะมีการศึกษา genotype-phenotype correlation และข้อมูลการกลายพันธุ์ของสองยีนนี้จากประชากรชาวไทยและประชากรโดยรวมทุกเชื้อชาติจะได้ใช้เป็นองค์ความรู้สะสมใน ADPKD mutation database ซึ่งจะช่วยจัดกลุ่มในแง่ของศักยภาพในการก่อโรคของ DNA variants ที่จะถูกค้นพบอีกต่อไป ยิ่งไปกว่านั้น การที่สามารถระบุความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ และอธิบายกลไกการเกิดการกลายพันธุ์หรือกลไกการทำหน้าที่ระดับโมเลกุลที่เป็นสาเหตุของโรคได้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนายาที่ใช้รักษาโรคนี้ให้เหมาะสมเป็นรายบุคคลได้ (personalized medicine) ในอนาคต

บทนำ (Introduction)

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมประเภทคุกคามชีวิตที่พบบ่อยที่สุดโรคหนึ่งในประชากรทั่วโลก มีอุบัติการณ์ประมาณ 1: 400-1,000 (1) สำหรับประเทศไทย ประมาณว่ามีคนไทยเป็นโรคนี้ไม่น้อยกว่า 65,000-160,000 คน โรค ADPKD ถือเป็นโรคของอวัยวะหลายระบบ (systemic disorder) ลักษณะสำคัญของโรคคือมีถุงน้ำจำนวนมากที่ไตทั้งสองข้าง ร่วมกับภาวะแทรกซ้อนทางไต ได้แก่ ความดันโลหิตสูง ปัสสาวะเป็นเลือด ปวดหลัง ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ นิ่วในไตและเกิดภาวะไตวายตามมา (2) ซึ่งภาวะไตวายระยะสุดท้าย (end-stage renal failure, ESRD) ที่มีสาเหตุจากโรคนี้พบได้ร้อยละ 10 ของภาวะไตวายทั้งหมด (3) นอกจากความผิดปกติที่ไตแล้ว โรคนี้ยังอาจแสดงอาการที่อวัยวะอื่น เช่น ตับเป็นถุงน้ำ หลอดเลือดในสมองโป่งพอง ลิ้นหัวใจผิดปกติ และไส้เลื่อน เป็นต้น (4) อาการของโรคอาจปรากฏได้ตั้งแต่วัยเด็ก หรือวัยผู้ใหญ่ เมื่อผู้ป่วยเริ่มมีอาการจะต้องได้รับการดูแลรักษาไปตลอดชีวิต เป็นปัญหาด้านสุขภาพที่ทุกข์ทรมาน ส่งผลกระทบต่อชีวิต การงาน ครอบครัว สังคม และเศรษฐกิจทั้งของผู้ป่วยเอง และของประเทศชาติที่ต้องรับภาระในการดูแล โดยเฉพาะเรื่องการล้างไตและเปลี่ยนถ่ายไตซึ่งเสียค่าใช้จ่ายมาก ผู้ป่วยด้วยโรคนี้ครึ่งหนึ่งมักเสียชีวิตจากภาวะไตวายระยะสุดท้ายเมื่ออายุประมาณ 50 ปี และบางส่วนอาจเสียชีวิตจากภาวะหลอดเลือดในสมองแตก

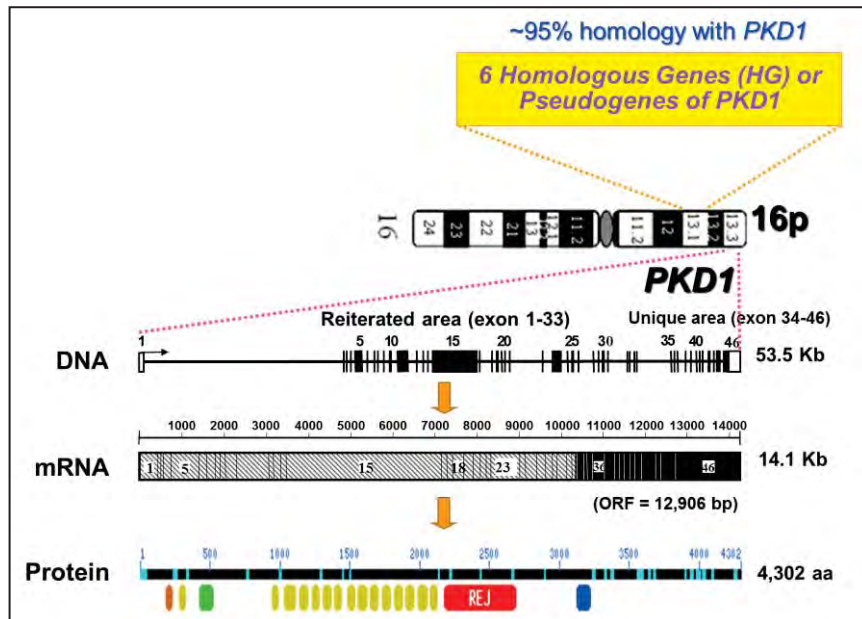
โรค ADPKD มีลักษณะอาการทางคลินิกที่แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือโรค PKD1 และโรค PKD2 (เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ตามลำดับ) แม้บางกรณีไม่สามารถจัดกลุ่มได้ เนื่องจากมีความคาบเกี่ยวกันอย่างมาก โดยทั่วไป โรค PKD1 เป็นกลุ่มที่มีอาการรุนแรงกว่า (อายุเฉลี่ยเมื่อเริ่มมี ESRD คือ 53 ปีใน PKD1 เทียบกับ 69 ปีใน PKD2) และพบได้บ่อยกว่าโรค PKD2 ถึง 6 เท่า (5) การรักษาโรค ADPKD ในปัจจุบันทำได้เพียงรักษาตามอาการและประคับประคองไม่ให้อาการรุนแรงขึ้น แต่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ วิธีที่ดีที่สุดคือ การควบคุมและป้องกันการเกิดโรคในครอบครัวด้วยการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling) ซึ่งเป็นการให้ข้อมูลแก่ผู้ป่วยและครอบครัวถึงอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคในครอบครัวและทางเลือกในการวางแผนครอบครัว เพื่อป้องกันการถ่ายทอดโรคจากชั่วคนหนึ่งไปยังอีกชั่วคนหนึ่ง รวมทั้งให้แนวทางการปฏิบัติตัวเพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากโรคและชะลอการเกิดภาวะไตวาย ดังนั้น การวินิจฉัยและพยากรณ์โรคที่ถูกต้องในแต่ละครอบครัวจึงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการดูแลรักษาผู้ป่วยและสมาชิกครอบครัวที่เป็นโรคนี้

การวินิจฉัยโรค ADPKD ที่แม่นยำต้องอาศัยการวินิจฉัยทางคลินิกโดยแพทย์ที่มีความชำนาญเฉพาะด้าน และใช้การตรวจวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์ประกอบในกรณีที่การตรวจด้วยอัลตราซาวนด์ (ultrasound) เพื่อดูถุงน้ำในไตไม่สามารถบอกผลที่ชัดเจนได้ หรือในกรณีที่ต้องการวินิจฉัยโรคก่อนมีอาการในรายที่อายุน้อยกว่า 30 ปี การตรวจทางอณูพันธุศาสตร์สำหรับ ADPKD ส่วนมากใช้การวิเคราะห์ linkage ด้วย polymorphic DNA markers ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *PKD1* ซึ่งทำได้ไม่ยาก แต่วิธีนี้เป็นการตรวจโดยอ้อมและมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ในรายที่มีผู้ป่วยเพียงคนเดียวในครอบครัวจะไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจได้ และข้อจำกัดที่สำคัญคือเรื่อง recombination ระหว่างยีนกับ markers ที่ใช้ซึ่งอาจทำให้ทำนายโรคผิดพลาดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเป็นกรณีของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ (de novo mutation) ที่พบได้

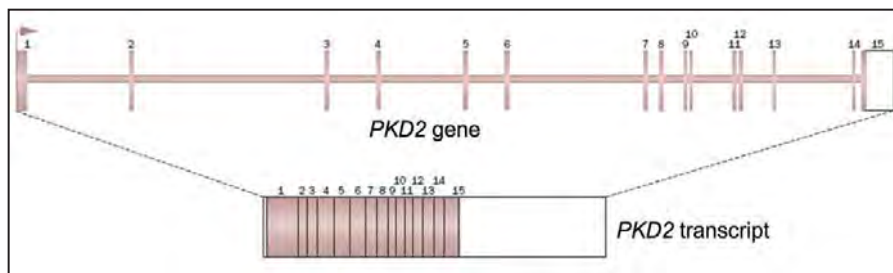
บ่อยในยีน *PKD1* จะยิ่งทำให้ยุ่งยากขึ้นอีก ในสถานการณ์ที่การตรวจดูน้ำในไตด้วยวิธี ultrasound ยังไม่มีความไวมากพอ และผู้ป่วยไม่มีสมาชิกครอบครัวจำนวนมากพอที่จะทำการวิเคราะห์ linkage ได้ การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ยีน *PKD1* จะสามารถให้ข้อมูลทางพันธุกรรมแก่ผู้ป่วยที่มีเพียงคนเดียวในครอบครัวได้

ยีนที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ที่ถูกค้นพบแล้วมีอยู่ 2 ยีน คือ ยีน *PKD1* บนโครโมโซมที่ 16 (16p13.3) (6) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค PKD1 (ซึ่งพบประมาณร้อยละ 85 ของโรค ADPKD ทั้งหมด) และยีน *PKD2* บนโครโมโซม 4 (4q21) (7) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค PKD2 ในผู้ป่วย ADPKD ประมาณร้อยละ 15 นอกจากนี้ เคยมีรายงานถึงความเป็นไปได้ของยีน *PKD3* ที่อาจเป็นสาเหตุของผู้ป่วย ADPKD ส่วนน้อยที่ไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือ *PKD2* (8) แต่ปัจจุบัน ยังไม่สามารถระบุได้ว่ายีนนั้นมียูจริงหรือไม่ นอกจากนี้ ยังพบว่าโรค ADPKD ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของทั้งสองยีนในลักษณะ trans-heterozygous (9) การวินิจฉัยแยกโรค PKD1 และ PKD2 โดยอาศัยอาการทางคลินิกบางครั้งทำได้ยาก เนื่องจากอาการของโรคทั้งสองคล้ายคลึงกันมาก แต่ดูเหมือนโรค PKD1 จะมีความรุนแรงมากกว่า เนื่องจากมักเกิดภาวะไตวายที่อายุน้อยกว่า (10) อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มโรคเดียวกัน อาการแสดงของโรคยังมีความแตกต่างกันอย่างมากในแต่ละครอบครัว หรือแม้แต่ครอบครัวเดียวกัน (11) ทำให้เชื่อว่ามีปัจจัยทางพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อมอื่นที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของโรคโดยกลไก "two-hit" ในการก่อให้เกิดดูน้ำในไตทั้งในโรค PKD1 (12) และ PKD2 (13) ด้วย

ยีน *PKD1* เป็นยีนขนาดใหญ่ มี genomic DNA ขนาด 53.5 กิโลเบส ประกอบด้วย 46 exons และมี mRNA ขนาด 14,148 เบส (6, 14, 15) (ภาพที่ 1) ถอดรหัสเป็นโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) ชื่อ polycystin-1 (PC1) ซึ่งเชื่อว่าอาจเป็น receptor ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่าง cell กับ cell และ/หรือระหว่าง cell กับ matrix PC1 มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วย 4,302 amino acids แบ่งโครงสร้างได้เป็น 3 ส่วนหลัก คือ extracellular N-terminus (ประกอบด้วย leucine-rich repeats, lectin-binding domains, Ig-like (PKD) domains และ sea urchin receptor for Egg Jelly, REJ); membrane-spanning region (11 transmembrane domains) และ cytoplasmic C-terminus ส่วนยีน *PKD2* มี genomic DNA ขนาด 68 กิโลเบส ประกอบด้วย 15 exons และมี mRNA ขนาด 5.4 กิโลเบส (ภาพที่ 2) ถอดรหัสเป็น transmembrane protein ที่ประกอบด้วย 968 amino acids ชื่อ polycystin-2 (PC2) (7, 16) ซึ่งอยู่ใน transient receptor potential channel superfamily ทำหน้าที่เป็น non-selective cation channel ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณ Ca^{2+} ภายในเซลล์ (17)

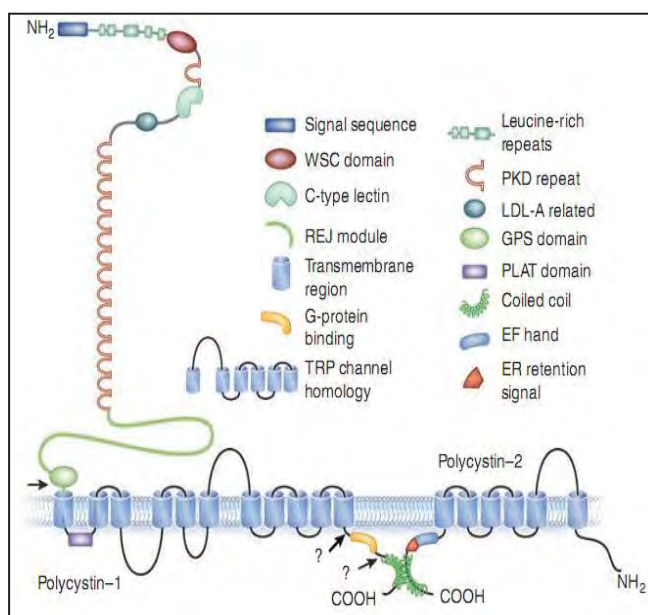


ภาพที่ 1. โครงสร้างของยีน *PKD1* ที่ระดับ DNA, mRNA และโปรตีน Polycystin-1 (PC1)



ภาพที่ 2. โครงสร้างของยีน *PKD2* ที่ระดับ DNA และ mRNA (18)

โปรตีน PC1 และ PC2 เป็นองค์ประกอบของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณซึ่งซับซ้อนมาก (multifunctional signaling pathway) (17) โดยต้องทำงานร่วมกันผ่านปฏิสัมพันธ์ต่อกันทาง C-terminus ของโปรตีนทั้งสอง (ภาพที่ 3) ทั้งคู่มีตำแหน่งที่อยู่ใน primary cilia เหมือนกันกับโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดถุงน้ำ (19) การประกอบกันเป็น complex นี้อาจทำหน้าที่เป็นตัวรับความรู้สึก (flow-dependent mechanosensor) ซึ่งควบคุมสถานะการเจริญพัฒนา (differentiation) ของเซลล์เยื่อบุท่อไต (renal tubular epithelium) (20) การที่โปรตีนทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันทำให้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโปรตีนใดโปรตีนหนึ่งย่อมเป็นสาเหตุให้การเจริญพัฒนาของท่อไตผิดปกติ จนเกิดเป็นถุงน้ำ (renal cyst) รวมทั้งอาการแสดงของโรคในอวัยวะอื่นขึ้นได้เหมือนกัน (ภาพที่ 4) ซึ่งมีหลักฐานทางพันธุศาสตร์โดยตรงว่า polycystin ทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันจริง โดยแสดงให้เห็นว่าถุงน้ำจากไตของผู้ป่วย *PKD1* บางส่วนมีสาเหตุจาก somatic mutation ของยีน *PKD1* ขณะที่บางส่วนเกิดจาก somatic mutation ของยีน *PKD2* ซึ่งกรณีหลังนี้เมื่อประกอบกับ germline mutation ของยีน *PKD1* เรียกว่าเป็น transheterozygous state ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน 2 ยีนเป็นสาเหตุ (21)



ภาพที่ 3. ปฏิสัมพันธ์ทาง C-terminus ของโปรตีน Polycystin-1 (PC1) และ Polycystin-2 (PC2) (22)

Polycystin and ADPKD

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is due to mutations in one of two genes, PKD1 and PKD2, which code for the linked transmembrane proteins polycystin 1 and polycystin 2, found on the primary cilium present on almost all renal tubular cells (not on the intercalated cells) and collecting ducts. Polycystin 1 is expressed predominantly in the distal convoluted tubule and collecting ducts, while polycystin 2 is expressed predominantly in the distal convoluted tubule and loop of Henle.

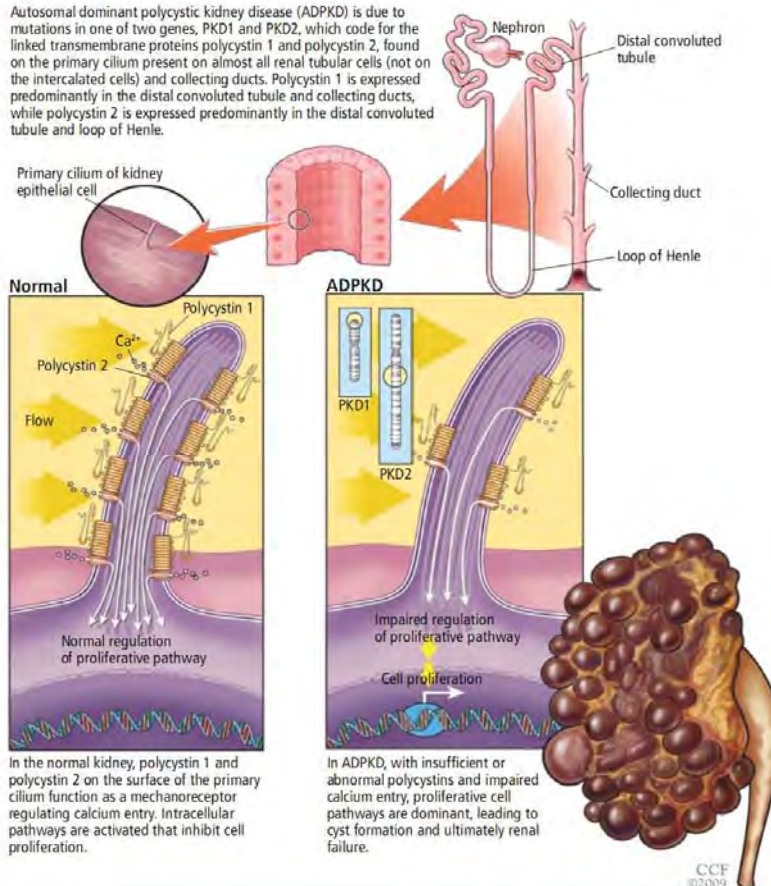


FIGURE 1

Medical Illustrator: David Schumick

CLEVELAND CLINIC JOURNAL OF MEDICINE VOLUME 76 NUMBER 2 FEBRUARY 2009 99

ภาพที่ 4. ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโปรตีน PC1 หรือ PC2 (ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันเป็น polycystin complex บน primary cilium ของเซลล์เยื่อบุท่อไตเพื่อถ่ายทอดสัญญาณผ่านการควบคุมระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์) เป็นสาเหตุให้การเจริญพัฒนาของท่อไตผิดปกติ จนเกิดเป็นถุงน้ำและภาวะไตวายได้ในที่สุด (23)

การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* เป็นสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรค ADPKD โดยตรง และอาจช่วยให้ความกระจ่างเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคและส่วนที่ทำหน้าที่สำคัญของ polycystin ทั้งสองได้ แต่ในทางปฏิบัติ การตรวจยีน *PKD1* ทำได้ยากมาก เนื่องจากลักษณะของยีนที่ใหญ่และจำนวน exon มีมาก (genomic DNA ประมาณ 54 กิโลเบส, mRNA มีความยาว 14,148 เบส, 46 exons), และที่สำคัญที่สุด มีความซับซ้อนของลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างมาก กล่าวคือ ประมาณ 3 ใน 4 ของยีน *PKD1* ทางด้าน 5' (ประมาณ 40 กิโลเบสของ genomic DNA หรือ 10 กิโลเบสของ mRNA) เริ่มจาก exon 1 ถึง exon 33 เป็นส่วนที่มีความซ้ำซ้อน (reiterated region) กับ homologous genes (*HG*) จำนวน 6 ยีน (*PKD1P1-P6*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันที่ตำแหน่ง 16p13.1 ห่างจากยีน *PKD1* ประมาณ 13–16 Mb ทางด้าน proximal โดยที่ยีนเหล่านี้มีโครงสร้างที่เหมือน (homology) กับ *PKD1* transcript ถึงร้อยละ 95-98 (24, 25) (ดูภาพที่ 1) ลักษณะเช่นนี้ทำให้วิธีตรวจพื้นฐานที่ใช้กันทั่วไปไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างได้เมื่อต้องการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ทำให้การศึกษายีน *PKD1* ในระยะแรกทำได้เพียงการตรวจวิเคราะห์ในส่วนด้าน 3' ของยีนที่มีลำดับเบสไม่ซ้ำซ้อนกับยีนใดเท่านั้น (26, 27) ยิ่งไปกว่านั้น ยีน *PKD1* ยังมีโครงสร้างหลายประการที่เป็นอุปสรรคต่อการทำ PCR เป็นอย่างมาก ได้แก่ การที่มี polypyrimidine tract ขนาดยาวมากถึง 2.5 และ 0.5 กิโลเบสในบริเวณ intron 21 และ intron 22 ตามลำดับ (28), มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีปริมาณ guanosine และ cytidine (GC content) สูงมาก (62.5% ใน genomic DNA และ 66.9% ใน mRNA) และมี repeat sequences เป็นจำนวนมาก

หลังจากที่ทราบข้อมูลลำดับเบสของยีน *HG* ทั้ง 6 ยีน (29) นักวิจัยทั่วโลกได้พยายามพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ใน reiterated region ของยีน *PKD1* โดยอาศัยหลักการออกแบบ primer อย่างระมัดระวังเพื่อผลิตให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PKD1* และปราศจากการปนเปื้อนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *HG* ทั้งหมด เพื่อใช้เป็นแม่แบบ (template) ในการตรวจกรองการกลายพันธุ์ต่อไป วิธีการที่ใช้เตรียม *PKD1*-specific template อาจเริ่มต้นจากการใช้ RNA โดยทำเป็น anchored reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) ของ exon 22-34 ขนาดยาว 2,440 คู่เบส (30) หรือเป็น long RT-PCR ของ full-length *PKD1*-cDNA (exon 1-46) ขนาด 13.6 กิโลเบส (31) ส่วน *PKD1*-specific template ที่เริ่มต้นจากการใช้ DNA มีการทำเป็น long-range PCR (LR-PCR) ครอบคลุม coding regions ที่ขนาดต่างๆ กัน เช่น ครอบคลุม intron 1- exon 11 โดยมีขนาด 6.8 กิโลเบส (32), exon 2-15 (13.6 กิโลเบส) (33), exon 11-15 (6 กิโลเบส) และ exon 15-21 (3.5 กิโลเบส) (34), exons 21–34 (13.5 กิโลเบส) (35), exon 23-34 (~10 กิโลเบส) (36), exons 15-23 (~9.1 กิโลเบส) และ exons 23–34 (~6.4 กิโลเบส) (37) Long-range PCR ที่ยาวที่สุดมีขนาด 18.1 กิโลเบส (exons 13-34) ใช้ตรวจการกลายพันธุ์ใน intron 13 ของยีน *PKD1* ในครอบครัวคนไทยโดยคณะของผู้วิจัย (38)

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ใน *PKD1*-specific template มีผู้ใช้วิธีการต่างๆ เช่น protein truncation test (PTT) และ nonisotopic RNase cleavage assay (NIRCA) (30), heteroduplex analysis (36), single strand conformation polymorphism (SSCP) (34), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (39), multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) (40) แต่วิธีการต่างๆ เหล่านี้ยังให้อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์

ค่อนข้างต่ำ เพียงร้อยละ 30-50 แม้แต่การตรวจโดยวิธี direct sequencing ตลอดทั้งยีนของยีน *PKD1* และ *PKD2* ก็มีอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ชัดเจนเพียงร้อยละ 41 หรือ 34 ใน 82 ราย (เป็น *PKD1* ~ 29 และ *PKD2* ~ 12) กับ variants ที่น่าจะเป็นการกลายพันธุ์อีกร้อยละ 37 หรือ 30/82 (เป็น *PKD1* ~ 32 และ *PKD2* ~ 4) (41) รวมเป็นร้อยละ 78 อย่างไรก็ตาม วิธีที่การตรวจที่ใช้เหล่านี้ไม่เหมาะที่จะใช้กับการศึกษาในที่มีขนาดใหญ่จำนวนหลายยีน

Rossetti และคณะ (42) ได้นำเอา denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรมประสิทธิภาพสูงที่ทำงานแบบกึ่งอัตโนมัติ (semi-automated method) มาใช้ในการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ตลอดทั้งยีน *PKD1* และ *PKD2* การทำงานของ DHPLC ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงานซึ่งอาศัยหลักการของ ion-pair reverse phase liquid chromatography แยกให้เห็นความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ที่จับคู่กันได้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากมีเบสบางตำแหน่งไม่เข้าคู่กัน (heteroduplex DNA) กับดีเอ็นเอสายคู่ปกติที่จับคู่กันได้อย่างสมบูรณ์ (homoduplex DNA) โดยอาศัยหลักการดูดซับ (adsorption) โดย matrix ที่อยู่ใน chromatographic column ที่แตกต่างกัน (43) ดีเอ็นเอสายคู่หรือ PCR amplicons ที่มี sequence variations (ไม่ว่าจะเป็น mutation หรือ polymorphism ก็ตาม) จะมี mismatched bases ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับ matrix ได้น้อยกว่า amplicon ปกติ (wild-type) จึงถูกชะออกมาได้เร็วกว่า ผลที่ได้จะเห็นเป็น elution profile ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับ profile ปกติ วิธี DHPLC นี้มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูง เหมาะกับงานศึกษาวิจัยและตรวจวินิจฉัยโรคพันธุกรรมที่มีการวิเคราะห์ยีนขนาดใหญ่ๆ หรือมีตัวอย่างตรวจจำนวนมากๆ สามารถประยุกต์ใช้งานได้หลายลักษณะ อาทิ ใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์หรือพิสูจน์การกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคพันธุกรรม (screening or validation of disease causing mutations), ใช้เพื่อการค้นหาหรือตรวจสอบความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมหรือสโนปส์ (discovery or detection of genetic variations or single nucleotide polymorphisms, SNPs) เป็นต้น (44)

Rossetti และคณะ (42) ได้ใช้ DHPLC ศึกษาผู้ป่วยโรค ADPKD จำนวน 45 ราย สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่แน่ชัดทั้งหมด 29 ชนิด เป็นของยีน *PKD1* 26 ชนิดและของยีน *PKD2* 3 ชนิด และยังพบการกลายพันธุ์ที่น่าจะเป็น missense mutations อีก 5 ชนิด รวมเป็น 34 ชนิด ทำให้ได้อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ร้อยละ 76 นอกจากนี้ยังตรวจพบ polymorphism ของยีน *PKD1* อีกเป็นจำนวนมาก และกลุ่มนักวิจัยเดมนี้ (45) ยังได้ใช้ DHPLC ศึกษาผู้ป่วยโรค ADPKD ที่วินิจฉัยตามหลักเกณฑ์ของ Consortium for Radiologic Imaging Study of PKD (CRISP) จำนวน 202 ราย และตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ถึงร้อยละ 89 (180 ราย) โดยพบในยีน *PKD1* ร้อยละ 85 (153/180) และ *PKD2* ร้อยละ 15 (27/180) ส่วนนักวิจัยชาวจีนที่ใช้ DHPLC ตรวจหาการกลายพันธุ์ในโรค ADPKD ได้อัตราการตรวจพบร้อยละ 64.5 โดยพบในยีน *PKD1* ร้อยละ 56 (53/94) และ *PKD2* ร้อยละ 8.5 (8/94) (46) การใช้ DHPLC จึงนับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวและประสิทธิภาพสูง คุ่มค่า และได้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีการอื่นๆ ที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ สำหรับยีน *PKD2* ก็มีผู้ศึกษาอย่างแพร่หลายโดยใช้วิธีการต่างๆ ทั่วไป แต่อุบัติการณ์ที่พบในประชากรต่างเชื้อชาติอาจแตกต่างกันได้ ตั้งแต่ร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยโรค ADPKD ทั้งหมด (45, 47, 48)

ปัจจุบัน ฐานข้อมูล Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Mutation Database (URL: <http://pkdb.mayo.edu/cgi-bin/mutations.cgi>) แสดงถึงความหลากหลายอย่างมาก (high allelic heterogeneity) ของการกลายพันธุ์ทั้งในยีน *PKD1* และ *PKD2* ซึ่งพบทั้งสิ้น 1,102 และ 183 ชนิดตามลำดับ โดยที่การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่มักตรวจพบเพียงครั้งเดียว (พบในครอบครัวผู้ป่วยเพียงครอบครัวเดียวในโลก) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ทั้งยีน *PKD1* และ *PKD2* มีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ที่สูงมากในประชากร ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* มีการกระจายอยู่ทั่วไปทั้งยีน ไม่มีตำแหน่งใดที่เป็น hot spot ส่วนใหญ่เป็นประเภทที่ทำให้เกิด premature termination ของ polycystin ทั้งสอง ได้แก่ frameshift mutations (small deletions/insertions), nonsense mutations และ splicing defects จึงทำให้เชื่อว่ายีน *PKD1* และ *PKD2* ที่กลายพันธุ์นั้นจะสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ (loss-of-function) นอกจากนี้ เคยมีรายงานถึง large deletions ซึ่งพบได้น้อยมากในยีน *PKD1* คือ exon 1-26 (17 กิโลเบส), exon 15-26 (5 กิโลเบส), exon 15-21 (7 กิโลเบส) (49), exon 31-34 (2 กิโลเบส), exon 34-3'UTR (5.5 กิโลเบส) (6) และ intron1-exon 5 (~3 กิโลเบส) (33)

ส่วนการกลายพันธุ์ชนิด missense mutations, in frame deletions/insertions หรือ intronic changes ก็พบได้ไม่น้อยในยีน *PKD1* การเปลี่ยนแปลงของ DNA ในลักษณะเช่นนี้ถ้าตรวจพบโดยที่ไม่ได้ศึกษา ยีนตลอดทั้งยีนและ/หรือได้ตรวจการทำหน้าที่ (functional assay) ของโปรตีน polycystin เสียก่อน จะไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคหรือไม่ ยิ่งกว่านั้น missense mutations ในยีน *PKD1* ยังอาจเกิดได้หลายตำแหน่งด้วยสาเหตุจาก gene conversion ก็ได้ (50) ดังนั้น ในการตัดสินใจว่าสิ่งที่พบเป็น missense mutations ที่แท้จริง ไม่ใช่ polymorphism นั้น จะต้องอาศัยฐานข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์จากกลุ่มประชากรอ้างอิงที่ไม่ได้เป็นโรค ADPKD และเป็นประชากรมาจากหลายเชื้อชาติ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ยังทำให้ทราบถึงความถี่ของ missense changes ในคนปกติและขยายขอบเขตของ DNA variants ที่ทราบว่าไม่ทำให้เกิดโรค (non-pathogenic) ด้วย (41) เมื่อเร็วๆ นี้ The ADPKD Gene Variant Consortium (51) ซึ่งเป็นกลุ่มนักวิจัยที่ศึกษา ยีนที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD จากทั่วโลกได้รวบรวมผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทุกประเภทของลำดับเบสในยีน *PKD1* และ *PKD2* รวมทั้งข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ADPKD ที่เกี่ยวข้องแสดงไว้ในฐานข้อมูล Polycystic Kidney Disease Mutation Database, PKDB (URL: <http://pkdb.mayo.edu>) (52) ซึ่งจะช่วยให้ นักวิจัยสามารถประเมินสถานะของ DNA variants ที่ตรวจพบในผู้ป่วย ADPKD ได้อย่างถูกต้องเป็นระบบเดียวกัน ฐานข้อมูลนี้แสดงให้เห็นความหลากหลาย แทบไม่ซ้ำชนิดกันของการกลายพันธุ์ในทั้งยีน *PKD1* และ *PKD2* กล่าวคือพบในครอบครัวเดียวถึง 70% ส่วนที่เหลือเพียง 30% มีการพบซ้ำในหลายครอบครัว และยังพบว่ามี 10% ของครอบครัวทั้งหมดที่เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ (de novo mutations).

รายงานการวิจัยที่ผ่านมาในระยะแรกมักไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนของความรุนแรงของโรค ADPKD กับชนิดหรือตำแหน่งของการกลายพันธุ์ ต่อมาได้มีรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าอาการแสดงของโรคที่ต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างครอบครัว *PKD1* มีความสัมพันธ์กับ haplotype ที่เกี่ยวข้องกับโรคที่ต่างกัน ถึงแม้จะยังไม่ทราบความสัมพันธ์กับชนิดของการกลายพันธุ์ก็ตาม (10) Rossetti และคณะได้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ในส่วนครึ่งแรกของยีน *PKD1* ด้าน 5' (ตำแหน่งนิวคลีโอ

ไทด์ <7812) กับอาการแสดงของโรคที่รุนแรงมากขึ้นเล็กน้อย คือเริ่มมีภาวะไตวายระยะสุดท้าย (ESRD) เมื่ออายุน้อยกว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ในส่วนครึ่งหลังของยีน *PKD1* ตำแหน่ง 3' (53 ปี และ 56 ปี, $P=0.025$) (53) นอกจากนี้ ยังมีรายงานแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* กับการเกิดหลอดเลือดสมองโป่งพอง (intracranial aneurysms) อีกด้วย (54) สำหรับยีน *PKD2* ก็มีรายงานถึงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีผลต่ออาการแสดงทางคลินิก (ได้แก่ ความดันโลหิตสูง, ปัสสาวะเป็นเลือด, นิ้วในไต และการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ) อย่างชัดเจน (55) การค้นพบเหล่านี้ค่อนข้างขัดแย้งกับกลไก "two-hit" ซึ่งคิดว่าอาจจำเป็นต้องเกิดการเกิดโรค เนื่องจากตามหลักของกลไกนี้ ผลของ germline mutation ทุกชนิดย่อมเหมือนกันหมดคือทำให้โปรตีนเกิด loss-of-function เท่านั้น แต่ในกรณีนี้อาจอธิบายเพื่อให้เข้ากับกลไก "two-hit" ได้ว่า germline mutation เพียงแต่ทำให้โปรตีนผิดปกติไปแต่ยังทำหน้าที่ได้มากหรือน้อยขึ้นกับตำแหน่งของการกลายพันธุ์ แล้วตำแหน่งและชนิดของ somatic mutation ที่เป็น second hit จะเป็นตัวกำหนดลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาของการเจริญของถุงน้ำเฉพาะแห่ง (clonal proliferation) ต่อไป

จะเห็นได้ว่าการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ยังคงต้องการการค้นคว้าข้อมูลเพื่อหาคำตอบอีกมาก การตรวจวิเคราะห์ยีนทั้งสองให้ครบตลอดทั้งความยาวยีนรวมทั้งบริเวณ promoter ของยีนทั้งสองซึ่งอาจมีผลกระทบกับการแสดงออกของยีนด้วย (56) มีความสำคัญอย่างมากต่อการระบุการกลายพันธุ์ที่แท้จริงให้ได้ ในการนี้ ต้องการการพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจให้สูงขึ้นจนได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ในอนาคตอันใกล้นี้ ถ้ามีการผลิตยาที่สามารถบรรเทาอาการของโรคอย่างได้ผลขึ้นมา (57, 58) และข้อมูลพันธุกรรม (genotype) ของผู้ป่วยมีอิทธิพลต่อการตัดสินใจใช้ยานั้นด้วย บทบาทของการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วยโรค ADPKD จะยิ่งทวีความสำคัญขึ้นอีกมาก

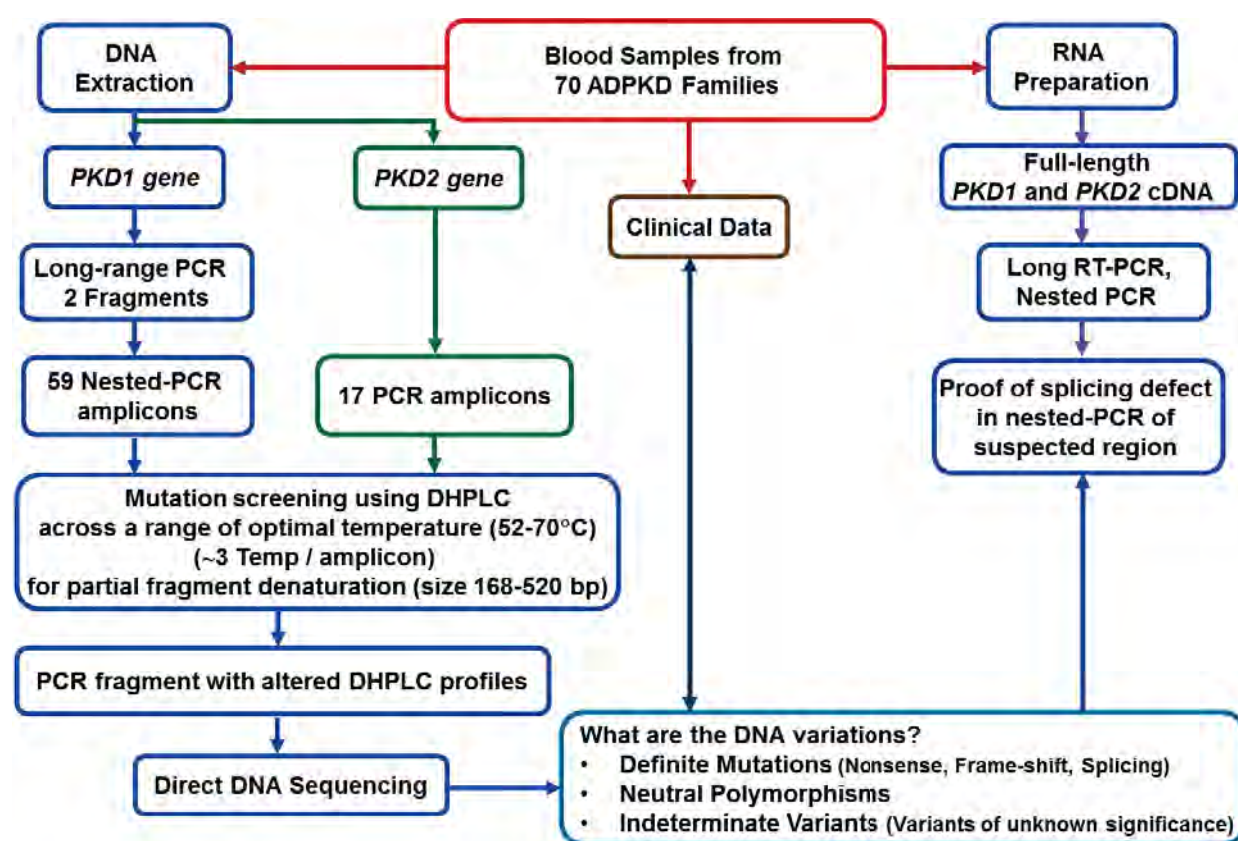
ในปี 1999 ผู้วิจัยและคณะได้ทำการศึกษาวินิจฉัยโรค ADPKD ในคนไทยโดยพัฒนาวิธี long reverse transcription and polymerase chain reaction (long RT-PCR) ที่สามารถแยก full-length cDNA ของยีน *PKD1* ออกมาได้อย่างจำเพาะตลอดทั้งยีน (ขนาด 13.6 กิโลเบส) โดยไม่มีลำดับเบสของ homologous genes (*HG*) ทั้ง 6 ยีนเข้ามาปะปนขึ้นสำเร็จเป็นครั้งแรก (31) ต่อมาได้ประยุกต์ long RT-PCR ไปใช้ร่วมกับ multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP) และรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ในผู้ป่วยไทย (38, 40, 59) ส่วนยีน *PKD2* นั้น ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในผู้ป่วยไทยมาก่อน ในส่วนของคนไทยยังมีข้อมูลของยีน *PKD1* ใน PKDB ค่อนข้างน้อย และยังไม่มีของยีน *PKD2* เลย (52) ดังนั้น จึงเป็นการสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษายีนทั้งสองนี้เพื่อให้ได้ฐานข้อมูลที่สมบูรณ์ของคนไทยซึ่งมักจะไม่ใช่ชนชาติอื่นงานวิจัยนี้จะเป็นการนำเทคโนโลยี DHPLC ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง รวดเร็ว และสะดวกกว่าวิธีการตรวจวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ที่เคยใช้อยู่เดิม คือ MRF-SSCP มาประยุกต์ใช้ศึกษายีนของโรค ADPKD ทั้งสองยีน คือ *PKD1* และ *PKD2* เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจยีนโดยตรงที่ระดับ DNA เป็นหลัก เนื่องจากการศึกษา RNA ในทางปฏิบัติทำได้ยาก แต่อาจทำการตรวจที่ระดับ RNA เพิ่มเติมภายหลังในบางกรณีที่เป็น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาชนิด และอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ในยีนที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ทั้งสองยีน คือ *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วยโรค ADPKD ในประเทศไทย นำไปเปรียบเทียบและเสนอเข้าไปสมทบกับฐานข้อมูลสากล (Polycystic Kidney Disease Mutation Database, PKDB)
2. เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง คือ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) ในการศึกษาใน *PKD1* และ *PKD2* :ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่น่าไปใช้ประโยชน์แก่ผู้ป่วยและสมาชิกครอบครัวได้หลาย
3. เพื่อพัฒนาแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐาน, คุ่มค่า และมีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ได้ทางปฏิบัติในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วย ADPKD ให้เหมาะสมกับสถานะของผู้ป่วยไทย
4. เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานและสำรวจความหลากหลายของ DNA polymorphisms หรือ markers ที่จำเพาะสำหรับยีน *PKD1* และ *PKD2* ในคนไทย ซึ่งอาจใช้เป็นฐานข้อมูลในประชากรไทยเพื่อประโยชน์อื่นๆ ต่อไป
5. เพื่อสร้างฐานงานวิจัยโรค ADPKD ที่มีความเข้มแข็งและพึ่งพาตนเองได้

วิธีการทดลอง (Methodology)

กระบวนการหลักของโครงการวิจัยนี้คือการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ (mutation screening) ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในแต่ละ amplicon ด้วยวิธี denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบทางโครมาโตกราฟฟี (chromatographic peak pattern) จากเครื่อง DHPLC ของ PCR product จากผู้ป่วยเทียบกับ PCR product ที่เป็น homozygous wild-type (จากคนปกติ) ของ amplicon ชนิดเดียวกัน แล้วเลือกเอา PCR product ของผู้ป่วยที่มี DHPLC elution profile แตกต่างจากปกติไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลง ก่อนที่จะสรุปผลที่ได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่แท้จริงหรือไม่ต้องอาศัยข้อมูลทั้งหมดจากทั้งสอง ยีนมาประมวลรวมกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ ประกอบกับข้อมูลทางคลินิก รวมทั้งการพิสูจน์โดยการตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมในบางรายตามความเหมาะสม ดังแสดงตามแผนภูมิด้านล่าง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5. แผนภูมิแสดงขั้นตอนหลักในการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ของยีน *PKD1* และ *PKD2*

1. การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรค ADPKD

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล และได้การเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโดยอาศัยข้อมูลทางคลินิกว่าเป็นโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant (ADPKD) รวมทั้งสมาชิกในครอบครัวที่ให้ความยินยอมในการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อการศึกษาวิจัยได้จำนวน 70 ครอบครัวที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกัน

2. การแยกสกัดตัวอย่างสารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA)

ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เก็บได้ทั้ง 70 ครอบครัว ได้ทำการแยกสกัดตัวอย่างสารพันธุกรรมชนิด เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) จากเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และดีเอ็นเอ (DNA) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cell) ด้วยวิธีการที่ทำให้ได้ RNA และ DNA ที่มีทั้งปริมาณและคุณภาพดีเพื่อรวบรวมไว้ใช้ศึกษาขั้นต่อไป

3. การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับทำ PCR (PCR primers)

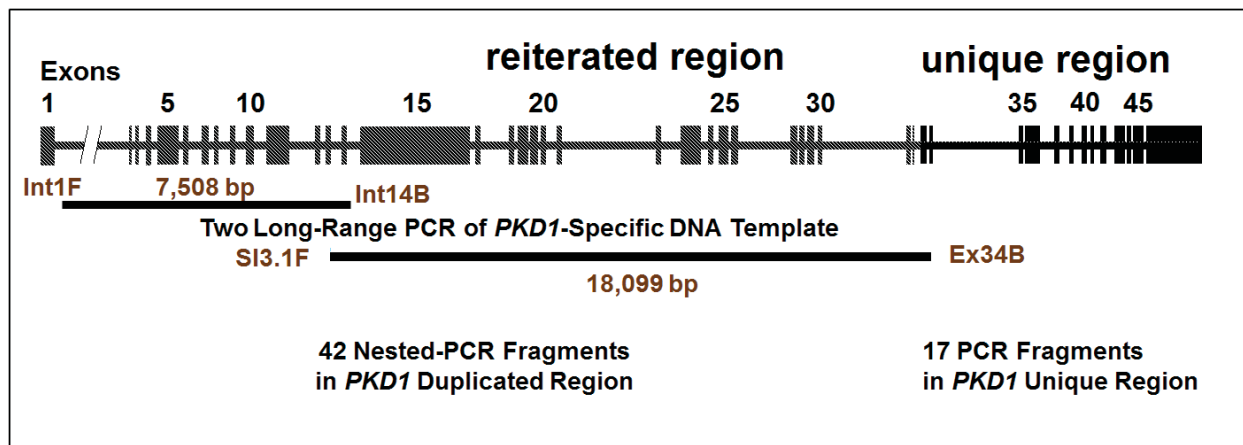
ได้ดำเนินการทบทวนข้อมูลลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีน *PKD1* และยีน *PKD2* ในฐานข้อมูล GenBank และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligo หรือ Primer3 ในการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ (PCR primers) สำหรับการทำ long-range PCR, nested PCR และ PCR ที่ครอบคลุม coding regions ทั้งหมดและบริเวณอื่นที่สำคัญของยีนทั้งสอง โดยมี PCR primer บางส่วนที่อ้างอิงตามงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์มาก่อนหน้านี้

ได้ออกแบบและคัดเลือก PCR primers ที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR จาก genomic DNA ของยีน *PKD1* และยีน *PKD2* รวมทั้งสิ้น 78 คู่ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งเป็น 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

4. การเตรียม PCR product ของยีน *PKD1* และ *PKD2* โดยหาสภาวะที่เหมาะสม (optimized conditions) ในการทำ PCR ทั้งหมด

ในการศึกษา genomic DNA ของยีน *PKD1* ซึ่งเป็นยีนขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมาก ส่วนที่เป็น reiterated area (exon 1-33) ของยีน *PKD1* ต้องเริ่มจากการทำ long-range PCR เพื่อให้ได้ primary PCR product ที่จำเพาะกับยีน *PKD1* เท่านั้น (โดยออกแบบให้ primer ข้างหนึ่งอยู่ใน unique area ของยีน *PKD1* หรือให้มี mismatch กับยีน homologous genes ทั้ง 6 ยีน) โดยแบ่งเป็น long-range PCR จำนวน 2 ชิ้น ขนาด 7,508 bp (ครอบคลุม exon 1-14) (40) และขนาด 18,099 bp (ครอบคลุม exon 14-34) (38) (ภาพที่ 6) แล้วใช้ long-range PCR product ซึ่งเจือจางลงอย่างน้อย 1,000 เท่าเป็น DNA template สำหรับทำ nested PCR product ขนาดสั้นๆ เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธี DHPLC ต่อไป ส่วนที่เป็น unique area ของยีน *PKD1* ใน genomic DNA สามารถทำ PCR ครอบคลุม coding regions ที่เหลือทั้งหมด (exon 34-46) แล้วนำไปตรวจหาการกลายพันธุ์ได้โดยตรง นอกจากนี้ ได้ทำ PCR ของบริเวณที่เชื่อว่าเป็น

promoter และ poly A tail ของยีน *PKD1* ด้วย ขนาด PCR amplicons ของยีน *PKD1* มีขนาดตั้งแต่ 168-520 bp



ภาพที่ 6. การตรวจวิเคราะห์ยีน *PKD1* โดยการทำให้ long-range PCR 2 ชั้น ในส่วน reiterated region ซึ่งมีขนาด 7,508 bp (exon 1-14) และ 18,099 bp (exon 14-34) เพื่อใช้เป็น *PKD1*-specific template สำหรับ nested PCR รวม 42 ชั้น ส่วนที่เป็น unique region สามารถทำ PCR ได้โดยตรงจาก genomic DNA อีกจำนวน 17 ชั้น

กรณีของยีน *PKD2* ได้ทำ PCR product จำนวน 17 ชั้น ที่ครอบคลุม coding regions ทั้งหมด (exon 1-15) เพื่อนำไปตรวจหาการกลายพันธุ์ต่อไป

สภาวะที่เหมาะสมในการทำ long-range PCR, nested PCR และ PCR ทั้งหมดของยีน *PKD1* และยีน *PKD2* แสดงไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ

ภาพที่ 7 และ 8 แสดง PCR product ทั้งหมดที่ได้จาก genomic DNA ของยีน *PKD1* และยีน *PKD2* รวม 59 และ 17 ชั้น ตามลำดับ

ตารางที่ 1. รายละเอียดของไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน *PKD1* (ต่อ)

Fragment	Primer name	PCR Primer sequence	Product size (bp)	Position	Location	(MgCl ₂) (mM)	PCR additive	Annealing temp.(°C)	Reference
Exon 12	Ex12F	5'-TGT GTC CAG GAG GCG ACA G- 3'	275	25,918-25,936	Intron 11	1.5	0.5M Betain	69	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex12R	5'-AGA GGT GAA GGT GGA GCC CG- 3'		26,192-26,173	Intron 12				Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
Exon 13	Ex13F	5'-GTG GAG GGA GGG ACG CCA A- 3'	314	26,245-26,263	Intron 12	1.5	10% DMSO	63	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex13R	5'-CGG CTG AGG CTG GGG CTG- 3'		26,558-26,541	Intron 13				This study
Exon 14	13.2F	5'-AGT GGA GCC TCG GCT GGT TCC CAA GCA- 3'	320	26,717-26,743	Intron 13	1.5	10% DMSO	69	This study
	13.2B	5'-GTT GGG GAG GAA GGG GGG CAG CTT GAC- 3'		27,036-27,010	Intron 14				This study
Exon 15a	Ex15aF	5'-TCA CCC CGG GCT CCT CAG-3'	392	27,314-27,331	Intron 14	1.5	10% DMSO	63	This study
	Ex15aR	5'-GCT CAC CGT GTT GTT GAC- 3'		27,705-27,688	Exon 15				This study
Exon 15b	Ex15bF	5'-CCA ACC ACA CCT ATG CCT C- 3'	467	27,641-27,659	Exon 15	1.5	10% DMSO	64	This study
	3B	5'- ATC CCC GAA GGT CCA GTC GAA G- 3'		28,107-28,086	Exon 15				This study
Exon 15c	Ex15cF	5'-GAA CCC GCC GCC TGC ATC- 3'	421	28,009-28,031	Exon 15	1.5	10% DMSO	64	This study
	2B	5'-AGC CTG GGT CTC GGT AGA TGA ACG- 3'		28,429-28,406	Exon 15				This study
Exon 15d	Ex15dF	5'-CAC CTG GGA CTT TGG CAC- 3'	376	28,347-28,354	Exon 15	1.5	10% DMSO	62	This study
	Ex15dR	5'-CCT CGC TGC GGC TCA CCT C- 3'		28,722-28,704	Exon 15				This study
Exon 15e	Ex15eF	5'-CCA CGC TTA CAA CAG CAC AG- 3'	448	28,653-28,672	Exon 15	1.5	10% DMSO	60	This study
	Ex15eR	5'-AGG AGA CGT TGG TGC CAT C- 3'		29,100-29,082	Exon 15				This study
Exon 15f	14.2F	5'-CTT CCC CAC CAA CCA CAG GGT ACA GC- 3'	485	29,039-29,064	Exon 15	1.5	10% DMSO	62	This study
	14.2B	5'-AGG CCA CTC ACA GGC ACC TGC ACA TC- 3'		29,523-29,498	Exon 15				This study
Exon 15g	14.1F	5'-AGC CAA CGC CAC CGT GGA A- 3'	372	29,476-29,494	Exon15	1.5	10% DMSO	64	This study
	14.1B	5'-GCA GCC AGC AGG ATC TGA AAA TG- 3'		29,825-29,847	Exon15				This study
Exon 15h	15F	5'-TCA ATG CCT CCA ACG CAG TCA GC- 3'	499	29,706-29,728	Exon 15	1.5	10% DMSO	66	This study
	Ex15hR	5'-GCC ACG GGC GTG TAG GTG- 3'		30,204-30,187	Exon 15				This study
Exon 15i	Ex15iF	5'-CTC GCT GGT CAT CCT GTC- 3'	477	30,157-30,174	Exon 15	1.5	10% DMSO	67	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	15.1B	5'-AGG TCA ACG TGG GCC TCC AAG- 3'		30,633-30,613	Exon 15				This study
Exon 15j	Ex15jF	5'-CAG GTG CTG ATG CGG CGA TC- 3'	494	30,581-30,600	Exon 15	1.5	10% DMSO	65	This study
	Ex15jR	5'-TGG GTG TGG ACG GGT GAG- 3'		31,074-31,057	Intron 15				This study
Exon 16	Ex16F	5'-CGC GCT GTC TCC TGG GCC GGG CTC TG- 3'	303	31,163-31,189	Intron 15	1.5	10% DMSO	62	This study
	Ex16B	5'-CAC GGA AAA CAG TAG ATG ACC AGG GAG- 3'		31,440-31,465	Intron 16				This study
Exon 17	Ex17F	5'-GAA ACC TGG AGT TTG GGA G- 3'	419	32,230-32,248	Intron 16	1.5	10% DMSO	62	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	15B	5'-GTC TCA TCC AGC ACC AGC GTC TTG- 3'		32,648-32,624	Exon 18				This study

ตารางที่ 1. รายละเอียดของไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน *PKD1* (ต่อ)

Fragment	Primer name	PCR Primer sequence	Product size (bp)	Position	Location	(MgCl ₂) (mM)	PCR additive	Annealing temp.(°C)	Reference
Exon 18	16F	5'-AGC AGG GGC TCC AAG CGA G- 3'	479	32,451-32,469	Exon 17	1.5	10% DMSO	66	This study
	Ex18R	5'-GTC ACA GAG TCG GGG GAT C- 3'		32,929-32,911	Intron 18				
Exon 19	16.1F	5'-CGC TGT GCA CGC CCT CAC CAC CAA GGT- 3'	480	32,835-32,861	Exon 18	1.5	10% DMSO	64	This study
	16.1B	5'-GTG CAG CCA GAC TGT GAG CCC CGT TGC- 3'		33,314-33,288	Exon 20				
Exon 20	16.2F	5'-CAG GCC ACA CTT CGA GGT- 3'	398	33,111-33,128	Exon 19	1.5	10% DMSO	63	This study
	Ex20R	5'-CCG GGA TGA GCC CTC TGC AA- 3'		33,508-33,489	Intron 20				
Exon 21	Ex21F	5'-CGT CTA GCA CGT AAC TGC ACC C- 3'	339	33,700-33,721	Intron 20	1.5	10% DMSO	64	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex21R	5'-GGC CAA GCT GCC CGT CTG- 3'		34,038-34,021	Intron 21				
Exon 22	In21F	5'-CTA GAG AGG AGG GCG TGT GCA AGG AGT GGG- 3'	280	36,887-36,916	Intron 21	1.5	10% DMSO	66	This study
	Ex22R	5'-GGG AGG AGG GAG GCA GAG- 3'		37,166-37,149	Intron 22				
Exon 23a	Ex23F	5'-CCC TTT TTG CCT GCC CCC ACC CTC CC- 3'	447	37,633-37,658	Intron 22	1.5	10% DMSO	63	This study
	16B	5'-TTG GTG GAG ACG GTG TAG TTG- 3'		38,079-38,059	Exon 23				
Exon 23b	Ex23bF	5'-GGC TGC CAC TTC TCC ATC CC- 3'	448	37,946-37,965	Exon 23	1.5	10% DMSO	63	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex23B	5'-AGA AAC GCC TTC CCC CCA AGA ACA AG- 3'		38,393-38,368	Intron 23				
Exon 24	Ex24F	5'-CGT GGC AGA GGG TGG GCT- 3'	344	38,531-38,548	Intron 23	1.5	10% DMSO	61	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex24R	5'-CTC GCT GCC TGC CGT CCC- 3'		38,874-38,857	Intron 24				
Exon 25	Ex25F	5'-GGC TCT GAG ACT GGG ACA TCC AA- 3'	407	38,893-38,915	Intron 24	1.5	10% DMSO	58	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex25R	5'-CAA GCT GTG CCT TCT CAG GAT AG- 3'		39,299-39,277	Intron 25				
Exon 26	Ex26F	5'-CTG CAG AGT CGA GGA GGG C- 3'	434	39,242-39,260	Intron 25	1.5	10% DMSO	63	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	17.2B	5'-CAG GAT GAA CAC ACG AGC CCT TCA CAC- 3'		39,675-39,649	Intron26				
Exon 27	Ex27F	5'-GCT GAG ATG ACT TCC CTG GGA TG- 3'	428	40,951-40,973	Intron 26	1.5	10% DMSO	62	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	17.1B	5'-ACC GAA AGC CAG TCA TTG ACC- 3'		41,378-41,358	Exon 28				
Exon 28	3Ex27	5'-TGG GTA GCG TGT GGA AGA TCC GAG TGT G- 3	345	41,157-41,184	Exon27	1.5	Q-solution	70	This study
	Ex28R	5'-ACT GCA GGA GGC CAC GGG- 3'		41,501-41,484	Intron 28				
Exon 29	Ex29F	5'-CTC CGT GGG AGG TTG GGC A- 3'	409	41,453-41,471	Intron 28	1.5	5% DMSO	66	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	5Ex30	5'-CGA CGC TCA GCG GGC TCA GCC TGG ACA C- 3'		41,834-41,862	Exon30				
Exon30	Ex30F	5'-CTA CAG GTG GGT GCC GTA GG- 3'	326	41,738-41,747	Exon 29	1.5	10% DMSO	61	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex30R	5'-CGC CTT TCC CTC TGG CTG C- 3'		42,053-42,035	Intron 30				
Exon 31-32	Ex31F	5'-GGT GGC TTC TCA TCC CTG TC- 3'	405	43,541-43,560	Intron 30	1.5	10% DMSO	61	This study
	Ex32R	5'-GGA CAC GCA GCC CGC ACA C- 3'		43,945-43,927	Intron 32				
Exon 33	Ex33F	5'-GGG TGG GCT GTG TGT GTG AC- 3'	406	44,033-44,052	Intron 32	1.5	Q-solution	65	Tan <i>et al.</i> , 2009 (62)
	Ex34B	5'-GAG CAG GTC CGT TTC CAT GTG GGT GTC TTG- 3'		44,438-44,409	Exon 34				

ตารางที่ 1. รายละเอียดของไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน *PKD1* (ต่อ)

Fragment	Primer name	PCR Primer sequence	Product size (bp)	Position	Location	(MgCl ₂) (mM)	PCR additive	Annealing temp.(°C)	Reference
Primer for nested PCR in unique region (using “Immolase” DNA polymerase)									
Exon 34	3'Ex33	5' -CCC TAC TCG CCT GCC AAA TCC TT- 3'	276	44,242-44,264	Exon 33	0.5	10% DMSO	58	This study
	Ex34R	5' -CCA CGG CTG CCT GGC CTG AGT CCC- 3'		44,517-444,94	Intron 34				
Exon 35	Ex35F	5' -GGG CTT GGC TGC AAC TGC- 3'	219	47,322-47,339	Intron 33	0.5	10% DMSO	58	This study
	Ex35R	5' -GGA GGG GCT AGG GGC ATC- 3'		47,540-47,523	Intron 34				
Exon 36	3'Ex35	5' -GGC CCA GGC AGC GAG GCT GTC CAG GAC- 3'	415	47,474-47,500	Exon 35	1	10% DMSO	62	This study
	5'Ex37	5' -CAC CAG TGA GAA GTA CAG GGC TTC CAG- 3'		47,862-47,836	Exon 37				
Exon 37	Ex37F	5' -TCC ATC ACG GGG GAC CCC TCT- 3'	298	47,816-47,836	Intron 36	0.5	10% DMSO	62	This study
	Ex37R	5' -ATG GGT GGG AGG TGG GAG ACA- 3'		48,093-48,073	Intron 37				
Exon 38	Ex38F	5' -AAA GCC CTG CTG TCA CTG TGG- 3'	269	48,440-48,460	Intron 37	1	10% DMSO	58	This study
	Ex38R	5' -TAG GGT CTG GCT GGA CTA AAG- 3'		48,688-48,668	Intron 38				
Exon 39	Ex39F	5' -GGG TCT CTG GTG GCC GGT CA- 3'	265	48,927-48,946	Intron 38	0.5	10% DMSO	55	This study
	Ex39R	5' ATG CCA GAG CTC CGC TAA AGG -3'		49,171-49,152	Intron 39				
Exon 40	Ex40F	5' -CAC TCC TGT TGG GTT TTG ATG- 3'	378	49,348-49,368	Intron 39	1	10% DMSO	54	This study
	18R	5' -CGC TGT CAT ACA CGG CAC A- 3'		49,707-49,688	Exon 41				
Exon 41	19.4F	5' -CAC AAT GGC TCG GGG ACG TGG GCC TAT- 3'	379	49,501-49,527	Exon 39	1	10% DMSO	61	This study
	Int41B	5' -AGT GAG GGT GGG CTC CTG GCT GGT GAC- 3'		49,853-49,827	Inton 41				
Exon 42	Ex42F	5' -AGC CAC GCC TGC ACT GCG CGG- 3'	314	49,921-49,941	Inton 41	0.5	10% DMSO	65	This study
	Ex42R	5' -GCC CCG CGA GGG GGC GGG ACG- 3'		50,214-50,194	Intron 42				
Exon 43	Ex43F	5' -GTC CCG CCC CCT CGC AGG GCC- 3'	472	50,351-50,371	Intron 42	0.5	10% DMSO	68	This study
	19.2B	5' -ACG GAC CAC TGG CGC ACG AAG CGT AGC TG- 3'		50,822-50,794	Exon 44				
Exon 44	Ex44F	5' -GCC TCG CTG CTC TTC CTG- 3'	349	50,680-50,697	Intron 44	1	10% DMSO	60	This study
	5B	5' -AGG GAG TCC ACA CAG GAA GAC ACG- 3'		51,005-50,982	Exon 45				
Exon 45	Ex45F	5' -CGC GGC CGG GGA GGG CGT CTT AG- 3'	448	50,931-50,953	Intron 44	0.5	10% DMSO	64	This study
	Ex45R	5' -CAG TCA GTC CGG CTG CAC CCT GG- 3'		51,356-51,334	Intron 45				
Exon 46a	Ex46aF	5' -CAG AGG GAC ACG CCC TGG GCT CTG C- 3'	448	51,331-51,355	Intron 45	0.5	10% DMSO	60	This study
	Ex46aB	5' -GGG CAA GGC GGC TGG GCA GTG CTG G- 3'		51,780-51,756	Exon 46				
Exon 46b	Ex46bF	5' -GGG ACA AGG TGT GAG CCT GAG- 3'	362	51,567-51,587	Exon 46	0.5	10% DMSO	60	This study
	19B	5' -AGA AAG TAA TAC TGA GCG GTG TCC ACT CCG ACT C- 3'		51,895-51,862	Intron 46				
Promoter	TBE1-F	5' -ACT GTT AAT AAA AAC CCT CA- 3'	254	1,346-1,366	Promoter	4	5% DMSO	TD 54-46	This study
	TBE1-B	5' -TCA GGA GGC TGA GAC AGG AG- 3'		1,580-1,600	Promoter				
PolyA	PolA-F	5' -GGC TGT GCC TGC TTC TGT GTA- 3'	168	52,770-52,791	Poly A	1	10% DMSO	52	This study
	PolA-B	5' -TCA GTG AAA TAA ATA AAG TCC- 3'		52,917-52,938	Poly A				

ตารางที่ 2. รายละเอียดไพรเมอร์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR ของยีน *PKD2* (รวม 17 amplicons)

Fragment	Primer name	PCR Primer sequence	Product size (bp)	Position	Location	(MgCl ₂) (mM)	Annealing temp.(°C)
1a	F1a R1a	5' -CGC GCC GGA CGC CAG TGA CC- 3' 5' -CCT GCC GGG AGC ACG ACG AGA GC- 3'	279	44 - 63 322 - 300	Exon 1 Exon 1	1.5* (GC buffer)	65
1b	F1b R1b	5' -CCG CGG CCT CCC CTT CTC CTC C- 3' 5' -CTG GGC TGG GGC ACG GCG GG- 3'	291	278 - 299 568 - 549	Exon 1 Exon 1	1.5* (GC buffer)	65
1c	F1c R1c	5' -GGG GCT ACC ACG GCG CGG GC- 3' 5' -CCG GCC GTT CTG GTT CGT GCA TCT G- 3'	220	491 - 510 710 - 686	Exon 1 Intron 1	1.5* (GC buffer)	65
2	F2 R2	5' -AAA TGA TAT CTT TTC TTT TCT TCA- 3' 5' -AAC TTT CCC ATT AGT GCA AG- 3'	188	11,753 - 11,776 11,940 - 11,921	Intron 1 Intron 2	1.5	55
3	F3 R3	5' -CCA AAA TGT TTA TCC ACA GG- 3' 5' -AGG TAC TTT CAA AGT TAT TTG CA- 3'	265	28,450 - 28,469 28,714 - 28,692	Intron 2 Intron 3	1.5	57
4	F4 R4	5' -TGG TTA TGC AAA CGA TGC AGG- 3' 5' -CCG AGT GGC AAT GAG TCA CA- 3'	360	30,504 - 30,524 30,863 - 30,844	Intron 3 Intron 4	1.5	65
5	F5 R5	5' -GCC TCA AGT GTT CCA CTG AT- 3' 5' -AGG TTT TTC TGG CTA ACC CCA G- 3'	361	35,510 - 35,529 35,870 - 35,849	Intron 4 Intron 5	1.5	60
6	F6 R6	5' -TTT AAT TGT TCT TAT TTA CAT GCA- 3' 5' -TTG TAG AAT AGA ATA GGA AAT TTG G- 3'	296	38,950 - 38,973 39,246 - 39,222	Intron 5 Intron 6	1.5	57
7	F7 R7-1	5' -TTG GTG AAG AAA AAT ATA CTA GTC A- 3' 5' -TGG AAC TCA TTT TTT TTA AAG A- 3'	318	44,237 - 44,261 44,554 - 44,533	Intron 6 Intron 7	1.5	55
8	F8 R8	5' -TTT TAT TAT ATA CAG TCA CAC CA- 3' 5' -CAA CTC TGA TTA AAT TTT TCT TCT T- 3'	292	48,352 - 48,374 48,643 - 48,619	Intron 7 Intron 8	1.5	55
9	F9 R9	5' -TTT GTT TTT GTA TTG TGG TG- 3' 5' -AAG GAT TTA CGA AGT TTA AAT TG- 3'	212	50,277 - 50,296 50,488 - 50,466	Intron 8 Intron 9	1.5	55
10	F10 R10	5' -TAA TTC CAA ATT ATG TTT CTT CC- 3' 5' -TGA AAC AAT GCT CAT TTT ATG- 3'	216	54,183 - 54,205 54,398 - 54,378	Intron 9 Intron 10	1.5	57
11	F11 R11	5' -AAA CCA AGT CTT TTA TTT TTT CTC- 3' 5' -GGG CTA GAA ATA CTC TTA TCA CC- 3'	236	57,673 - 57,696 57,908 - 57,886	Intron 10 Intron 11	1.5	57
12	F12 R12	5' -AAT GAT TTT TAT CTG TAT CCT CTC- 3' 5' -TAG GTA CCA AAT CAA ATC CG- 3'	193	58,060 - 58,083 58,253 - 58,234	Intron 11 Intron 12	1.5	58
13	F13 R13	5' -GTC TCA GTG TTC TGC TCC TC- 3' 5' -AAA TTC TGC CAA TTC CTT TA- 3'	235	60,187 - 60,206 60,421 - 60,402	Intron 12 Intron 13	1.5	58
14	F14 R14	5' -TGT ACT GTG TTT TCC TTG CA- 3' 5' -AAA TAC AAC TGT CAG CAA CAT A- 3'	248	67,124 - 67,143 67,371 - 67,350	Intron 13 Intron 14	1.5	55
15	F15 R15	5' -ACA CCA GTT TCT TTT TCC CT- 3' 5' -ATC GGT CAC AAA GAC TAG CA- 3'	382	67,765 - 67,784 68,146 - 68,127	Intron 14 Exon 15	1.5	58

หมายเหตุ:

GenBank and NCBI Reference Sequence for *PKD1*

Genomic DNA: L39891.1 (53,522 bp)

mRNA: NM_000296.3 (14,135 bp)

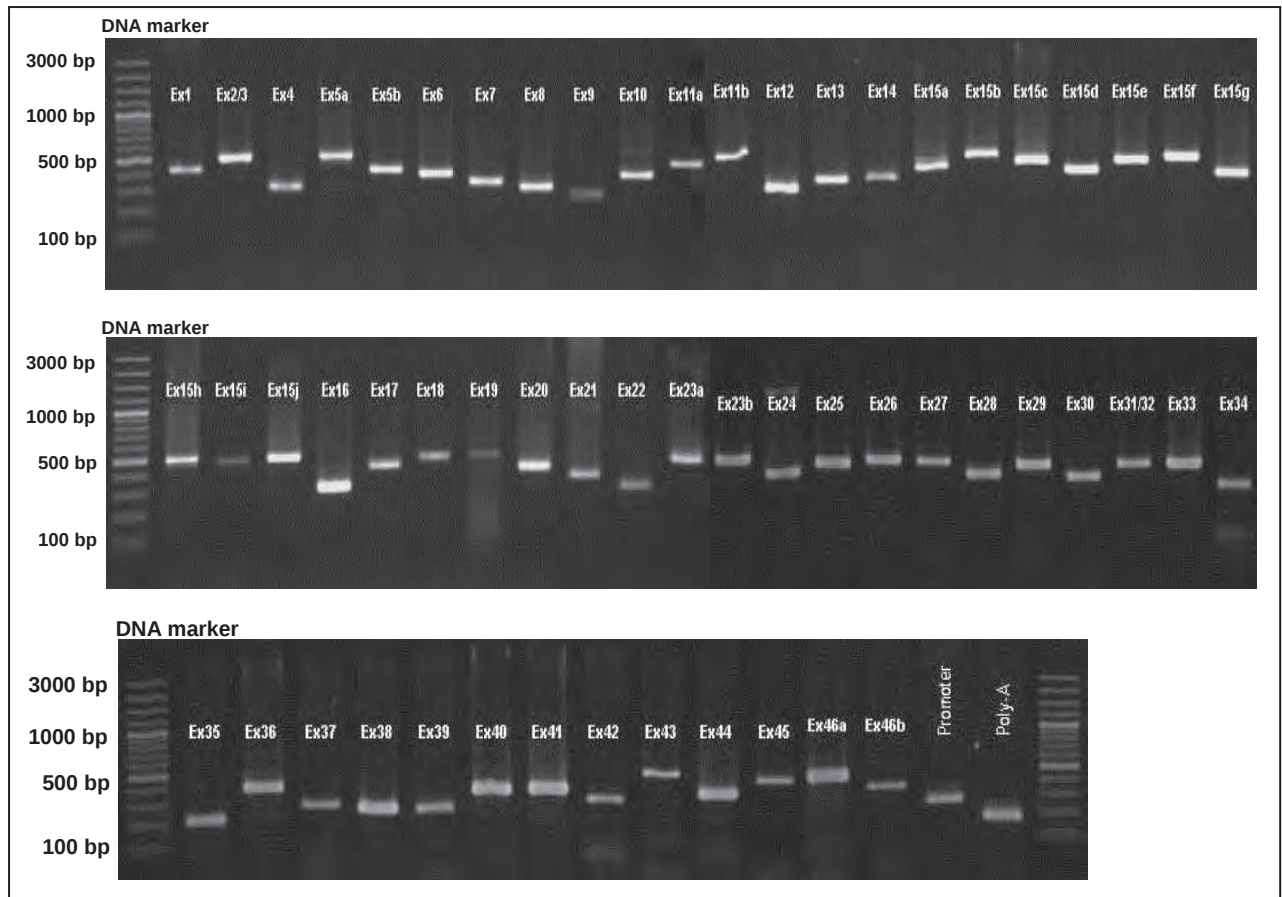
Polycystin-1 isoform 2 precursor: NP_000287.3 (4,302 aa)

GenBank and NCBI Reference Sequence for *PKD2*

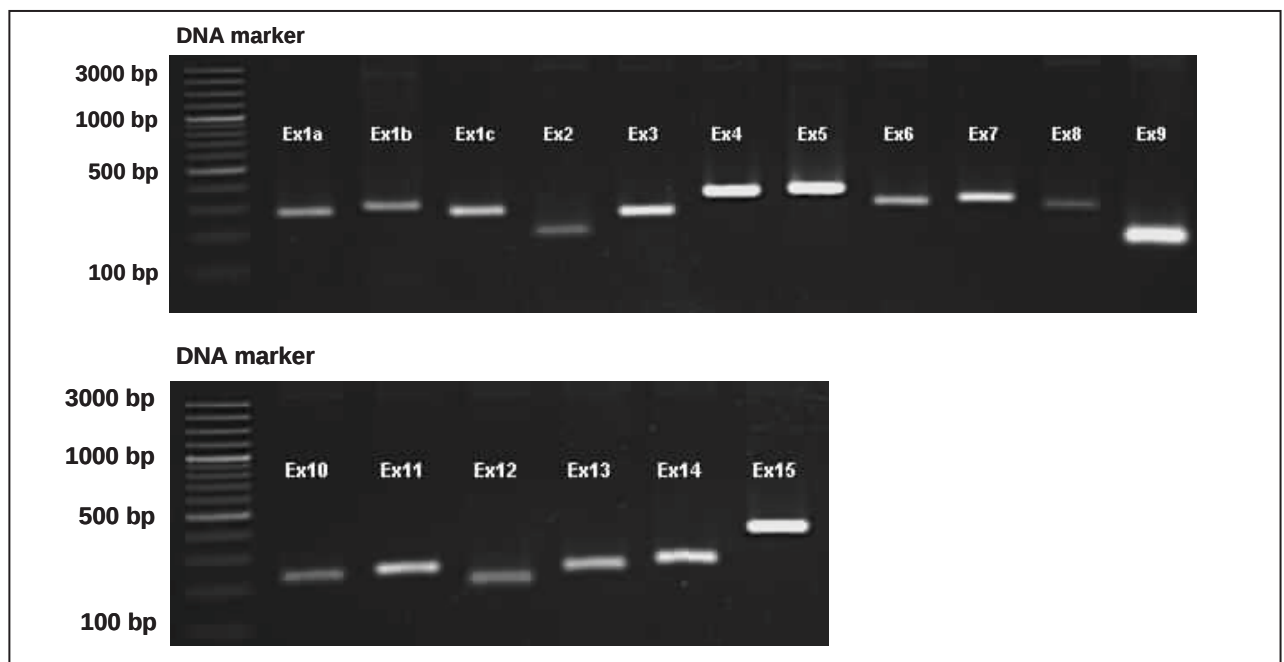
Genomic DNA: NG_008604.1 (70,110 bp)

mRNA: NM_000297.2 (5,073 bp)

Polycystin-2 : NP_000288.1 (968 aa)



ภาพที่ 7. PCR product ทั้งหมดใน genomic DNA ของยีน *PKD1* ที่ได้จากการทำ nested PCR โดยใช้ long-range PCR เป็น DNA template และจาก genomic DNA โดยตรง (รวม 59 amplicons)



ภาพที่ 8. PCR product ทั้งหมดของยีน *PKD2* ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ genomic DNA เป็น DNA template (รวม 17 amplicons)

5. การตรวจกรองการกลายพันธุ์ (mutation screening) ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในแต่ละ amplicon ด้วยวิธี denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

5.1 การหาสถานะของ DHPLC ให้เหมาะสมกับการตรวจ amplicons แต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม Navigator™ software ในการวิเคราะห์

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ด้วยวิธี DHPLC ใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยระบบความดันสูง (WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500HT) ของบริษัท Transgenomic (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) ซึ่งจะต้องปรับสถานะของการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับ PCR amplicon แต่ละชิ้น ด้วยการปรับปริมาณของ acetonitrile ใน buffer ที่ใช้ในการชะ DNA ออกมาจาก column (DNASep® HT cartridge ซึ่งเป็น C18 reverse-phase, non-porous polystyrene-divinyl benzene matrix) ให้มีความเข้มข้นจากต่ำไปสูง (gradient) รวมทั้งการปรับอุณหภูมิของ DNA column ให้เหมาะสมกับค่า melting temperature (T_m) ของแต่ละ amplicon ด้วย โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Navigator™ (Transgenomic Inc., USA) ที่มากับเครื่อง DHPLC ทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของแต่ละ amplicon เพื่อกำหนดค่าอุณหภูมิ และค่าตัวแปรอื่นๆ ที่ควรเป็น ก่อนนำไปสร้างวิธีตรวจที่เหมาะสมสำหรับ amplicons นั้นๆ ต่อไป

ผู้วิจัยและคณะได้ดำเนินการหาสถานะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ของยีน *PKD1* ในส่วนของยีนที่เป็น unique region จำนวน 16 ชิ้นไว้แล้ว ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนของ Exons 1-33 ในยีน *PKD1* ซึ่งเป็น reiterated region อยู่ระหว่างดำเนินการวิเคราะห์

ส่วนสถานะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ของยีน *PKD2* ทั้งยีนได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3. สภาวะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ทั้งหมดของยีน *PKD1*

Fragment	Product Size (bp)	Nucleotide Position in Genomic DNA	Primer Length (bp)	Coding Position in the Fragment	Optimal Condition for DHPLC				
					Column Temperature (°C)				Acetonitrile Gradient (% buffer B)
					T1	T2	T3	T4	
1	433	3,543-3,966	20/20	106-320	70.6	70	69	-	59.6-69.6
2-3	508	19,732-20,239	30/19	172-243, 365-436	65.5	64	58.7	55.1	53.7-63.7, 55.7-67.7, 58.2-68.2, 60.7-70.7
4	317	20,371-20,687	20/18	70-229	66.4	65	63.5	-	53.7-63.7, 57.2-67.2
5a	520	20,725-21,244	20/20	95-520	65.5	64.4	-	-	60.8-70.8
5b	417	21,172-21,588	18/21	1-319	66.5	65.5	63.8	-	57.3-67.3, 59.3-69.3
6	391	21,495-21,885	19/21	115-298	66.3	65.3	63	-	53.9-63.9, 56.4-66.4, 58.9-68.9
7	347	22,162-22,508	19/19	67-287	66.8	65	63.5	-	55.8-65.8, 58.0-68.0
8	312	22,560-22,871	19/21	78-193	66.2	64.5	60.5	-	54.6-64.6, 55.6-65.6, 57.1-67.1
9	261	23,098-23,358	18/19	66-192	66.6	65.5	64	-	52.9-62.9, 55.6-65.6, 55.4-65.4
10	385	23,585-23,969	19/19	72-319	65.8	64.4	62.7	-	55.8-65.8, 57.3-67.3, 58.8-68.8
11a	467	24,251-24,717	18/18	106-467	66.7	65.7	64.7	-	57.6-67.6, 58.6-68.6, 60.1-70.1
11b	514	24,655-25,168	18/18	1-457	65.3	64.3	63	-	59.5-69.5, 60.7-70.7
12	275	25,918-26,192	19/20	72-203	66.5	64.3	63.6	-	50.9-60.9, 54.9-64.9, 55.9-65.9
13	314	26,245-26,558	19/18	74-249	65.8	64.6	-	-	55.1-65.1, 57.1-67.1
14	320	26,717-27,036	27/27	92-225	66	65	64.5	-	53.1-63.1, 54.8-64.8, 57.3-67.3
15a	392	27,314-27,705	18/18	94-392	66	64.9	-	-	58.9-68.9
15b	467	27,641-28,107	19/22	1-467	66.4	64.5	62	-	60.7-70.1
15c	421	28,009-28,429	18/24	1-421	65.8	65	62.5	-	59.4-69.4
15d	376	28,347-28,722	18/19	1-376	64.5	63.5	-	-	58.6-68.6
15e	448	28,653-29,100	20/19	1-448	65.2	63.4	61	-	56.8-66.8, 59.8-69.8
15f	485	29,039-29,523	26/26	1-485	65.5	64.2	63.3	-	56.9-66.9, 60.4-70.4
15g	372	29,476-29,847	19/23	1-372	66	64.9	63	-	57.0-67.0, 58.5-68.5
15h	499	29,706-30,204	23/18	1-477	66.2	65.1	63.3	-	60.6-70.6
15i	477	30,157-30,633	18/21	1-477	65.8	65.1	63	-	60.3-70.3, 61.8-71.8, 62.8-72.8
15j	494	30,581-31,074	20/18	1-444	68.7	64.2	63	-	53.0-63.0, 60.5-70.5, 62.5-72.5
16	303	31,163-31,465	26/26	82-231	66.5	65	62.5	-	56.8-66.8
17	419	32,230-32,648	19/24	99-242	65	64.1	63.2	61.5	57.4-67.4, 58.4-68.4, 59.4-69.4
18	479	32,451-32,929	19/19	149-428	66.5	65.2	64.5	-	60.3-70.3

ตารางที่ 3. สภาวะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ทั้งหมดของยีน *PKD1* (ต่อ)

Fragment	Product Size (bp)	Nucleotide Position in Genomic DNA	Primer Length (bp)	Coding Position in the Fragment	Optimal Condition for DHPLC				
					Column Temperature (°C)				Acetonitrile Gradient (% buffer B)
					T1	T2	T3	T4	
19	480	32,835-33,314	27/27	138-351	66	65.3	63.7	-	60.3-70.3
20	398	33,111-33,508	18/20	141-300	65.5	64.2	62.5	-	58.0-68.0, 59.0-69.0, 60.5-70.5
21	339	33,700-34,038	22/18	102-253	66.5	64.5	-	-	55.3-66.3, 57.8-67.8
22	280	36,887-37,166	30/18	66-212	67.2	65.9	-	-	51.1-61.1, 56.1-66.1
23a	447	37,633-38,079	26/21	69-447	66.5	64.6	62.5	58	56.3-66.3, 57.3-67.3, 59.8-69.8, 61.3-71.3
23b	448	37,946-38,393	20/26	1-385	65.8	62.5	61.5	-	56.6-66.6, 59.8-69.8
24	344	38,531-38,874	18/18	94-250	64.6	64.2	-	-	57.9-67.9
25	407	38,893-39,299	23/23	69-321	66	64.7	63.7	-	56.7-66.7, 59.2-69.2
26	434	39,242-39,675	19/27	97-292	65	63.4	-	-	57.1-67.1, 59.6-69.6
27	428	40,951-41,378	23/21	78-248	65	64.4	61	-	58.5-68.5, 59.5-69.5, 60.5-70.5
28	345	41,157-41,501	28/18	129-273	65.7	64.7	62.5	-	57.9-67.9, 59.4-69.4
29	409	41,453-41,861	19/28	71-281	64.9	64.6	-	-	59.2-69.2
30	326	41,728-42,053	20/19	97-223	64.5	63.7	-	-	57.4-67.4
31-32	405	43,541-43,945	20/19	70-186, 277-326	65.4	64.6	62.5	61	54.1-64.1, 56.1-66.1, 59.1-69.1
33	406	44,033-44,438	20/30	59-243	65	63.5	62.5	-	56.2-66.2, 57.7-67.7, 59.2-69.2
34	276	44,242-44,517	23/24	112-204	64.4	63.0	61.5	-	56.0 – 66.0
35	219	47,322-47,540	18/18	63-181	66.0	63.4	-	-	53.6 – 63.6
36	415	47,474-47,862	27/27	108-310	65.7	64.1	62.5	-	59.3 – 69.3
37	298	47816,-48093	21/21	41-236	66.0	64.8	63.4	-	56.7 – 66.7
38	269	48,440-48,688	21/21	62-201	64.5	59.5	-	-	55.7 – 65.7
39	265	48,927-49,171	20/21	76-188	66.4	65.4	61.0	-	55.6 – 65.6
40	378	49,348-49,707	21/19	59-200	66.0	65.0	63.5	-	58.6 – 68.6
41	379	49,501-49,853	27/27	188-313	66.2	65.0	-	-	58.6 – 68.6
42	314	49,921-50,214	21/21	77-251	70.0	68.9	67.9	-	57.1 – 67.1
43	472	50,351-50,822	21/29	69-379	68.5	67.2	65.2	-	60.2 – 70.2
44	349	50,680-51,005	18/24	106-240	65.5	64.9	61.5	-	58.0 – 68.0
45	448	50,931-51,356	23/23	73-378	65.0	64.5	-	-	59.9 – 69.9
46a	449	51,331-51,779	25/24	69-449	66.5	65.1	-	-	59.9 – 69.9
46b	362	51,567-51,895	18/34	1-300	67.5	65.5	64.2	-	58.3 – 68.3
Promoter	235	1,346-1,580	20/20	-	62.0	58.0	56.0	-	55.2 – 65.2
PolyA	148	52,770-52,917	21/21	-	64.5	61.4	-	-	50.8 – 60.8

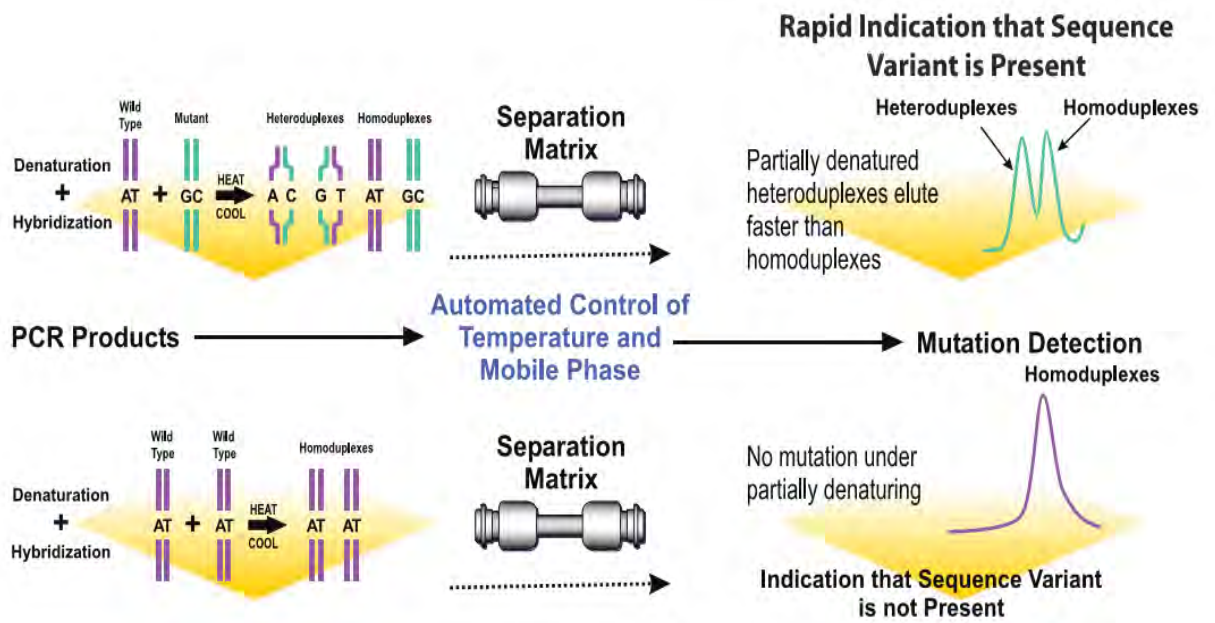
ตารางที่ 4. สภาวะของ DHPLC ที่เหมาะสมกับการตรวจ amplicons ทั้งหมดของยีน *PKD2*

Fragment	Product size (bp)	Nucleotide position in genomic DNA	Primer length (bp)	Coding position in the fragment	Optimal condition for DHPLC			
					Column temperature (°C)			Acetonitrile gradient
					T1	T2	T3	(% buffer B)
1a	279	44-322	20/23	23-279	71.0	69.5	66.5	53.6-63.6, 56.1-66.1
1b	291	278-568	22/21	1-291	69.5	67.0	65.1	49.5-59.5, 53.5-63.5, 56.5-66.5
1c	220	491-710	19/25	1-161	69.7	68.5	-	51.2-61.2, 53.7-63.7
2	188	11,753-11,940	24/20	39-153	58.6	56.5	52.0	49.1-59.1, 52.1-62.1
3	265	28,450-28,714	20/22	104-237	60.6	56.7	-	52.6-62.6, 55.6-65.6
4	360	30,504-30,863	21/20	81-331	59.8	58.5	-	57.5-67.5
5	361	35,510-35,870	20/22	67-291	59.2	57.5	55.5	55.8-65.8, 58.3-68.3
6	297	38,950-39,246	24/25	26-254	57.7	56.7	-	53.6-63.6, 56.6-66.6
7	318	44,237-44,554	25/22	88-255	56.7	55.5	52.0	53.7-63.7, 57.2-67.2
8	292	48,352-48,643	23/25	68-249	58.8	55.3	-	51.5-61.5, 55.0-65.0
9	212	50,277-50,488	20/23	40-160	57.2	54.1	-	49.9-59.9, 53.4-63.4
10	216	54,183-54,398	23/21	57-155	57.5	55.5	-	51.1-61.1, 53.6-63.6
11	236	57,673-57,908	24/23	35-156	59.5	58.5	56.1	51.0-61.0, 52.0-62.0, 54.5-64.5
12	194	58,060-58,253	24/20	36-153	60.2	58.5	-	48.4-58.4, 52.4-62.4
13	235	60,187-60,421	20/20	45-208	61.5	60.1	55.5	51.9-61.9, 52.4-62.4, 54.4-64.4
14	248	67,124-67,371	20/22	22-169	62.3	61.9	-	53.0-63.0, 53.5-63.5
15	382	67,765-68,146	20/20	27-263	60.8	58.7	57.7	53.7-63.7, 56.2-66.2, 58.7-68.7

5.2 การฉีด PCR product เข้าเครื่อง DHPLC และการวิเคราะห์ผล

ผู้วิจัยและคณะได้จัดเตรียม PCR product ของยีน *PKD1* จำนวน 59 ซีน และยีน *PKD2* ทั้งหมด 17 ซีน จากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยที่เก็บตัวอย่างได้จำนวน 70 รายซึ่งมาจากต่างครอบครัวกัน ให้เหมาะแก่การตรวจรอกหาการกลายพันธุ์ (mutation screening) ด้วยวิธี DHPLC เนื่องจากหลักการของ DHPLC เป็นการตรวจรอกหาการกลายพันธุ์ (mutation screening) ที่ทำให้เกิดลักษณะของ heteroduplex DNA ขึ้น (ภาพที่ 9) ดังนั้น ก่อนการตรวจรอกด้วยวิธี DHPLC ต้องมีการชักนำให้ PCR product มีลักษณะเป็น heteroduplex จำนวนมากขึ้นเสียก่อนโดยการให้ความร้อนสูงที่ 95°C ประมาณ 5 นาทีแล้วค่อยๆ ปล่อยให้เย็นลงช้า ๆ จนถึงอุณหภูมิห้องภายในเวลาไม่น้อยกว่า 45 นาที หลังจากนั้นจึงนำ PCR product ที่เตรียมพร้อมแล้วประมาณ 5-10 μ L ฉีดเข้าไปในระบบของเครื่อง DHPLC แบบอัตโนมัติโดยส่งงานผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Navigator™

การวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และยีน *PKD2* ในแต่ละ amplicon จะดูจากการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบทางโครมาโตกราฟฟี (chromatographic peak pattern) จากเครื่อง DHPLC ของ PCR product จากผู้ป่วย เทียบกับ PCR product ที่เป็น homozygous wild-type (normal control) ของ amplicon ชนิดเดียวกัน โดยที่ DNA ที่ถูกชะออกมาจาก column จะถูกตรวจจับโดยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet absorption) ที่ความยาวคลื่น 260 nm และให้สัญญาณออกมาเป็น peak (วัดเป็น mV) ที่มีความสูงตามปริมาณของ DNA ที่มีใน PCR product เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ PCR product แต่ละตัวอย่างอยู่ที่ประมาณ 3-8 นาทีขึ้นกับสภาวะที่เลือกใช้



ภาพที่ 9. หลักการของ DHPLC ในการตรวจรอกหาการกลายพันธุ์ (mutation screening) ที่ทำให้เกิดลักษณะของ heteroduplex DNA ขึ้น (<http://www.transgenomic.com>)

6. การวิเคราะห์ความผิดปกติของ PCR product โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการตรวจรอกหาการกลายพันธุ์ (mutation screening) ด้วยวิธี DHPLC ได้เลือก PCR product ของผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนแปลง DHPLC elution profile ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลง โดยทำการเตรียม PCR product ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ส่วนที่พบความผิดปกติของผู้ป่วยรายนั้นๆ ขึ้นมาใหม่ แล้วผ่านกระบวนการทำให้ PCR product บริสุทธิ์โดยการย่อยด้วย ExoSAP-IT® (Affymetrix – USB® Products, Affymetrix, Inc) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ก่อนทำ cycle sequencing ตามหลักการ dideoxy method โดยใช้ DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (MegaBACE) หรือ BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ MegaBACE 1000 Automated DNA sequencer หรือ Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer ตามลำดับ

เมื่อทราบการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของผู้ป่วยแล้ว ต้องทำการตรวจสอบกับ reference sequence ของยีน *PKD1* และ *PKD2* รวมทั้ง Mutation database และรายงานการวิจัยของยีนทั้งสองว่าเป็นชนิดที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ (reported mutation) หรือเป็นชนิดที่เพิ่งค้นพบใหม่ (novel mutation) ซึ่งกรณีหลังนี้ ถ้าสิ่งที่ตรวจพบไม่ได้เป็น truncating mutations (ได้แก่ nonsense, deletion, splicing defect หรือ frame-shift mutations) แต่เป็นเพียง missense mutation ต้องมีขั้นตอนการพิสูจน์ต่อไปอีกว่าสิ่งที่ตรวจพบนั้นเป็นการกลายพันธุ์ (mutation) หรือเป็นเพียงความแปรผันหลากหลาย (polymorphism) ที่พบได้ทั่วไปในประชากรชาวไทย (ดูข้อ 7 และ 8)

7. การวิเคราะห์การถ่ายทอดการกลายพันธุ์นั้น ๆ ในครอบครัวโดยการพัฒนาวีธี DHPLC เพื่อการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* โดยตรง (direct detection) หรือแบบจำเพาะเจาะจง เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคของสมาชิกครอบครัวนั้น ๆ

ในกรณีที่ผู้ป่วยมีสมาชิกครอบครัวมาด้วยกันหลายคน และมีคนอื่นในครอบครัวทั้งที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค หลังจากทราบชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* แล้ว ผู้วิจัยและคณะได้พัฒนาวีธีตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* ชนิดที่พบในครอบครัวนั้นๆ โดยตรง (direct detection) ด้วยการตรวจ genomic DNA ของสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยด้วยวิธี DHPLC แบบจำเพาะเจาะจง เพื่อให้ทราบการถ่ายทอดยีนที่มีการกลายพันธุ์ในครอบครัว ทำให้วินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว

8. การพิสูจน์ว่าความผิดปกติที่ตรวจพบเป็น mutation หรือเป็น polymorphism ของยีน *PKD1* และ *PKD2*

การพิสูจน์ว่า DNA variants ที่ตรวจพบเป็น mutation หรือ polymorphism ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในกรณีที่สิ่งที่ตรวจพบเป็น missense mutation (หรือแม้แต่ silent mutation ซึ่งไม่ควร

ละเลยในบางกรณี) นอกเหนือจากการวิเคราะห์การถ่ายทอดการกลายพันธุ์นั้นในครอบครัวแล้ว ยังมีข้อพิจารณาประกอบเพื่อสนับสนุนว่าความผิดปกตินั้นเป็นการกลายพันธุ์ที่แท้จริงหรือไม่ ดังต่อไปนี้

- ต้องแน่ใจว่าไม่มี sequence variants ที่อื่นอีก โดยต้องทำการตรวจวิเคราะห์ให้ครบทุก region ของทั้งยีน *PKD1* และ *PKD2*
- เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้อีกกับฐานข้อมูลสากลต่างๆ เช่น Polycystic Kidney Disease Mutation Database (PKDB)
- DNA variants ที่ตรวจพบนั้นทำให้ amino acid ที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในวิวัฒนาการ (evolutionary conserved) มีการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างหรือคุณสมบัติทางชีวเคมีซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน polycystin-1 และ polycystin-2 โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับใช้ทำนายภาวะก่อโรค (pathogenicity prediction) ของ DNA variants ได้แก่ Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2) (63) และ MutationTaster (64)
- ผลจากการวิเคราะห์การถ่ายทอดการกลายพันธุ์ในครอบครัวแสดงถึงการถ่ายทอด DNA variant ชนิดนั้นไปกับการแสดงออกของโรค ADPKD
- DNA variants ที่ตรวจพบนั้นไม่มีในคนปกติจากการตรวจใน normal alleles อย่างน้อย 100 alleles

9. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลผลการศึกษาทั้งระบบ เพื่อแปลผลเป็นชนิด mutation หรือ polymorphism ของยีน *PKD1* และ *PKD2* เพื่อให้ได้ข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองที่เชื่อถือได้สามารถนำเสนอเข้าไปในฐานข้อมูลสากลได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

(Results and Discussion)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน PCR product ของผู้ป่วยที่มี DHPLC elution profile ต่างจาก normal control เมื่อทราบการเปลี่ยนแปลงในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของผู้ป่วยแล้ว ได้ทำการตรวจสอบกับ reference sequence ของยีน *PKD1* และ *PKD2* รวมทั้ง Mutation Database ของยีนทั้งสอง (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Mutation Database, the PKDB URL: <http://pkd.mayo.edu>) ว่าสิ่งที่ตรวจพบนั้นเป็นความผิดปกติที่เป็นการกลายพันธุ์ (mutation), เป็นความแปรผันหลากหลาย (polymorphism) ที่พบได้ทั่วไปในประชากร หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ยังไม่ทราบความสำคัญ (indeterminate variants or variants of unknown significance)

การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ใน proband

จากการตรวจตัวอย่างตรวจของผู้ป่วย ADPKD ที่เก็บตัวอย่างได้จำนวน 70 รายซึ่งมาจากต่างครอบครัวกันทั้งหมด ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องเป็นญาติกัน โดยวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ตลอดทั้งยีน *PKD1* โดยใช้ PCR product ทั้งหมดจำนวน 59 ชิ้น พบ DNA variants ของยีน *PKD1* ดังแสดงเรียงตามลำดับ exon ในตารางที่ 5 ซึ่งแบ่งเป็น

- Definitely pathogenic mutation จำนวน 23 ชนิด ในผู้ป่วยจาก 27 ครอบครัว
- Indeterminate variants จำนวน 22 ชนิด ในผู้ป่วยจาก 21 ครอบครัว
- Polymorphism จำนวน 20 ชนิด ในผู้ป่วยจาก 30 ครอบครัว

รายละเอียดผลการตรวจวิเคราะห์ยีน *PKD1* ด้วย DHPLC และ direct DNA sequencing ได้นำมาแสดงเป็นตัวอย่างในภาพที่ 10 - ภาพที่ 37

หมายเหตุสำหรับผล DHPLC ในภาพ:

- 1) การให้ relative score ของ DHPLC elution profile เปรียบเทียบกับ normal control

+3	หมายถึง	แตกต่างกันอย่างชัดเจนมาก
+2	หมายถึง	แตกต่างกันปานกลาง
+1	หมายถึง	แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย
0	หมายถึง	ไม่มีความแตกต่าง
- 2) ตัวอย่างตรวจที่มี DHPLC elution profile ที่ได้ score ตั้งแต่ +1 ถึง +3 จะถูกเลือกไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป
- 3) โดยทั่วไปการตรวจพบ DNA variant ในโรค ADPKD จะละไว้ในฐานที่เข้าใจว่าหมายถึง heterozygous variant โดยไม่ได้ระบุคำว่า "heterozygous" แต่ถ้าพบเป็น homozygous จึงจะระบุกำกับไว้

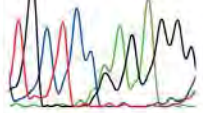
ตารางที่ 5. สรุปผลการตรวจพบ *PKD1* mutations และ SNPs ในผู้ป่วย ADPKD (เรียงตามลำดับ exon)

Region	Nucleotide Change	Consequence (Amino Acid Change)	Mutation Type	Interpretation (Clinical Significance)	ADPKD Family
Exon 5a	c.542T>C	V181A	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Benign (Polyphen2)	PK024
	c.674C>T	S225L	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK003 (PK115)
Exon 7	c.1396G>A	V466M	Missense (Reported Indeterminate)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK135 PK139
	c.1515C>T	A505A	Silent (Synonymous) (Reported SNP)	Likely Neutral	PK135 PK139
Exon 9	c.1728G>C	M576I	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Possibly damaging (Polyphen2)	PK097
Intron 9	c.1850-4A>G	Likely Silent	Intronic substitution (Reported SNP)	Likely Neutral	PK139
Exon 10	c.2027C>T	P676L	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK139
	c.2039A>T	Y680F	Missense (Reported SNP)	Likely Neutral	PK123
Intron 12	c.2986-15C>T	Likely Silent	Substitution (Reported SNP)	Likely Neutral	PK131
Intron 13	c.3161-2A>T	L1054fs	Splicing defect (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK035
Exon14	c.3202C>T	Q1068X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK149
Exon 15b	c.3729G>A	W1243X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK012
Exon 15d	c.4343C>T	S1448F	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Benign (Polyphen2)	PK013
	c.4447C>T	Q1484X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK025
Exon 15e	c.4769C>T	P1590L	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK008
	c.4795_4796insT	Y1599Lfs	Insertion (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK089
Exon 15f	c.4988delCCT	S1663del	Deletion, In-frame (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK123
Exon 15i	c.6379delTC	S2127Qfs	Deletion, Frame-shift (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK003 (PK115)
Exon 15j	c.6730_6731delAG	S2244fs16X	Deletion, Frame-shift (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK007
	c.6752delTGG	V2251del	Deletion, In-frame (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK137
	c.6913_6914delCA	Q2305fs113X	Deletion, Frame-shift (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK151

Region	Nucleotide Change	Consequence (Amino Acid Change)	Mutation Type	Interpretation (Clinical Significance)	ADPKD Family
Exon 16	c.7000ins7	V2334fs	Insertion, Frame-shift (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK036 PK152
Exon 20	c.7753A>G	T2585A	Missense (Novel SNP)	Polymorphism (MutationTaster) Benign (Polyphen2)	PK121
	c.7810G>A	D2604N	Missense (Reported Mutation)	Indeterminate	PK135
Intron 20	c.7863+1G>T	p.R2568Sfs33X	Splicing Defect (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK093
Intron 24	c.8948+11C>T	Likely Silent	Intronic substitution (Reported SNP)	Likely Neutral	PK115 PK130 PK138
Exon 26	c.9319C>T	R3107C	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK099
Exon 27	c.9463G>A	D3155N	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK027
Exon 28	c.9685C>A	L3229M	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Possibly damaging (Polyphen2)	PK088
Exon 29	c.9820C>T	R3274C	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK003 PK007 PK010
Intron 34	c.10499+10C>T	Likely Silent	Intronic substitution (Novel SNP)	Likely Neutral	PK121
Exon 35	c.10529C>T (A <u>C</u> G>A <u>T</u> G)	T3510M	Missense (Reported SNP)	Likely Neutral	PK001 PK005 PK098 PK133
Exon 36	c.10652C>T	P3551L	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK111
	c.10678G>A (<u>G</u> G <u>G</u> > <u>A</u> G <u>G</u>)	G3560R	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK073
	c.10801C>T (<u>C</u> T <u>C</u> > <u>T</u> T <u>C</u>)	L3601F	Missense (Novel SNP)	Likely Neutral	PK012
	c.10821+61_+65delC	Likely Silent	Intronic deletion (Novel SNP)	Likely Neutral	PK094 PK098 PK103
	c.10718C>G (<u>T</u> C <u>A</u> > <u>T</u> G <u>A</u>)	S3573X	Nonsense (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK072
Exon 37	c.10973A>G (A <u>A</u> G>A <u>G</u> G)	K3658R	Missense (Tsuchiya 2001, Zhang 2005)	Polymorphism/Benign Indeterminate?	PK041
	c.11016G>A (C <u>G</u> G>C <u>G</u> A)	R3672R	Silent (Synonymous) (Novel SNP)	Likely Neutral	PK001
Exon 39	c.11176T>C (<u>T</u> G <u>G</u> > <u>C</u> G <u>G</u>)	W3726R	Missense (Reported mutation)	Highly pathogenic	PK124
	c.11246T>C (C <u>T</u> G>C <u>C</u> G)	L3749P	Missense (Novel variant)	Indeterminate probably damaging (Polyphen2)	PK089

Region	Nucleotide Change	Consequence (Amino Acid Change)	Mutation Type	Interpretation (Clinical Significance)	ADPKD Family
Exon 40	c.11272C>G (<u>C</u> TC> <u>G</u> TC)	L3758V	Missense (Novel SNP)	Likely Neutral	PK016 PK065
	c.11319A>G (GCA <u>A</u> >GCC <u>G</u>)	A3773A	Silent (Synonymous) (Reported SNP)	Likely Neutral	PK102
	c.11348_11385 delinsAGTCC	V3783_W3795 delinsES	Ins/Del, In-Frame (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK030 PK125
	c.11363C>G (CCT> C <u>G</u> T)	P3788R	Missense (Novel SNP)	Likely Neutral	PK051
	c.11393C>G (TCA>T <u>G</u> A)	S3798X	Nonsense (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK099
Intron 41	c.11537+20C>T (IVS41+20C>T)	Likely Silent	Intronic substitution (Reported SNP)	Likely Neutral	PK007
Exon 42	c.11616G>A (GAG>GAA)	E3872E	Silent (Synonymous) (Reported SNP)	Likely Neutral	PK003
Intron 42	c.11713-2A>G	p.V3847Cfs40X	Splicing defect (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK121
Exon 43	c.11807G>A (TGG>T <u>A</u> G)	W3936X	Nonsense (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK016 PK065
	c.11969T>G (C <u>T</u> G> C <u>G</u> G)	L3990R	Missense (Novel Mutation)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK108
Intron 43	c.12004-5C>A (IVS43-5C>A)	Likely Silent	Intronic substitution (Novel variant)	Likely Neutral	PK106
Exon 44	c.12124C>T	Q4042X	Nonsense (Reported mutation)	Definitely Pathogenic	PK090
	c.12133A>G (ATC>GTC)	I4045V	Missense (Reported SNP)	Likely Neutral	PK106
Exon 45	c.12188T>A (TTG> T <u>A</u> G)	L4063X	Nonsense (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK133
	c.12251_12252insTGTC ACC	p.L4085Vfs	Insertion, Frame-shift (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK022
	c.12276A>G (GCA <u>A</u> >GCC <u>G</u>) (rs3087632)	A4092A	Silent (Synonymous) (Reported SNP)	Likely Neutral	PK019 PK106
Exon 46a	c.12479delC	P4160Rfs	Deletion, Frame-shift (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK146 PK089
Exon 46b	c.12706G>T	V4236F	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK059
	c.12724C>T (C <u>A</u> G>T <u>A</u> G)	Q4242X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK044

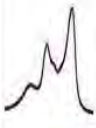
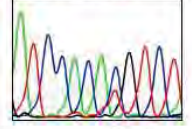
PKD1 – Exon 5a

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	65.5	64.4		
Normal control			PKD1 reference sequence: TGCTCCGAGAGGG	
PK003 (PK115)	 (+1)	 (+1)	TGCTCCGAGAGGG TGCTCC A GAGGG  Reversed sequence	c.674C>T (p.S225L) Polymorphism Probably damaging

ภาพที่ 10. ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 5a ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK003 และ PK115 (ซึ่งทราบภายหลังว่ามีความเกี่ยวข้องเป็นญาติกัน) มี base substitution คือ c.674C>T ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Serine เป็น Leucine ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster ได้เป็น Polymorphism ส่วน Polyphen2 ทำนายได้เป็น Probably damaging จึงถือว่าเป็น indeterminate variant

PKD1 – Exon 7

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	66.8	65	63.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) ATCCACACGTCT 2) GCTCGGCTGT	
PK135 PK139	 (+3)	 (+3)	 (+2)	ATCCACACGTCT ATCCACATGTCT  Reverse sequence	1) c.1396G>A (p. V466M) Reported - Indeterminate Disease causing/Probably damaging 2) c.1515C>T (p.A505A)

ภาพที่ 11. ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 7 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK135 และ PK139 มี base substitution 2 ตำแหน่ง คือ c.1396G>A ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Valine เป็น Methionine และ c.1515C>T ที่ไม่ได้ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง ซึ่งการที่ Valine เปลี่ยนเป็น Methionine เคยถูกรายงานมาก่อนว่าเป็น indeterminate variant ส่วน c.1515C>T (p.A505A) นั้นเป็น reported SNP

PKD1 – Exon 9

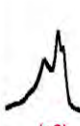
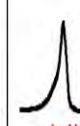
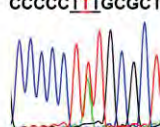
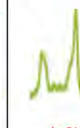
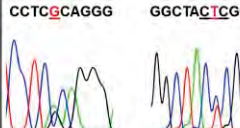
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	66.6	65.5	64		
Normal control				PKD1 reference sequence: GTCAT <u>G</u> GTATT	
PK097				GTCAT <u>G</u> GTATT GTCAT <u>C</u> GTATT 	c.1728G>C (p.M576I) Polymorphism Possibly damaging

ภาพที่ 12.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 9 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK097 มี base substitution คือ c.1728G>C ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Methionine เป็น Isoleucine เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster ได้เป็น Polymorphism แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย Polyphen2 ได้ผลเป็น Possibly damaging จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel)

PKD1 – Exon 10

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	65.8	64.4	62.7		
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) CCCCC <u>T</u> ATGCGCT 2) CCTC <u>A</u> CAGGG 3) GGCTA <u>C</u> CCGG	
PK123				CCCCC <u>T</u> ATGCGCT CCCCC <u>T</u> ATGCGCT 	c.2039A>T (p.Y680F) Reported – Likely Neutral
PK139				CCTC <u>A</u> CAGGG GGCTA <u>C</u> CCGG CCTC <u>G</u> CAGGG GGCTA <u>C</u> TCGG 	c.1850-4A>G (IVS9-4A>G) c.2027C>T (p.P676L) Polymorphism Probably damaging

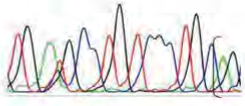
ภาพที่ 13.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 10 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK123 มี SNP ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว คือ c.2039A>T (p.Y680F)

ส่วน PCR product ของผู้ป่วย PK139 มี base substitution 2 ตำแหน่ง คือ c.1850-4A>G ใน intron 9 ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วว่าเป็น SNP และ c.2027C>T ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Proline เป็น Leucine ที่ตำแหน่ง codon 676 ซึ่งโปรแกรม MutationTaster ให้ผลการวิเคราะห์เป็น Polymorphism แต่ Polyphen2 ทำนายเป็น probably damaging จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel)

PKD1 – Exon 13

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	65.8	64.6		
Normal control			PKD1 reference sequence: TGACGCCTGTCCCTGCAG	
PK131	 (+2)	 (+2)	TGACGCCTGTCCCTGCAG TGATGCCTGTCCCTGCAG 	c.2986-15C>T IVS12-15C>T Reported

ภาพที่ 14.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 13 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK131 มี base substitution คือ c.2986-15C>T ใน intron 12 ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วว่าเป็น SNP

PKD1 – Exon 14

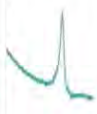
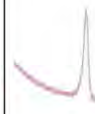
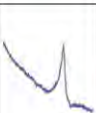
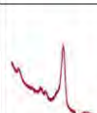
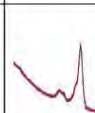
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	66	65	64.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: CCAGTTCAGCCTCCG	
PK149	 (+1)	 (+2)	 (+2)	CCAGTTCAGCCTCCG CCAGTTCAGCCTCCG 	c.3202C>T (p. Q1068X) Reported – Definitely pathogenic

ภาพที่ 15.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 14 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK149 มี reported nonsense mutation เป็น base substitution ที่ c.3202C>T ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Glutamine เป็น stop codon ทำให้โปรตีนมีขนาดสั้นลง จากเดิมที่มี 4,302 กรดอะมิโน เหลือเพียง 3,202 กรดอะมิโนซึ่งจะไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ จึงเป็น mutation ที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ในผู้ป่วยรายนี้อย่างแน่นอน (definitely pathogenic mutation)

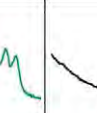
PKD1 – Exon 15b

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	66.4	64.5	62		
Normal control				PKD1 reference sequence: TCACG <u>T</u> GGACCTT	
PK012				TCACG <u>T</u> GGACCTT TCACG <u>T</u> <u>A</u> ACCTT	c.3729G>A (p. W1243X) Novel mutation

ภาพที่ 16. ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 15b ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK012 มี base substitution คือ c.3729G>A ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Tryptophan เป็น stop codon ทำให้โปรตีนมีขนาดสั้น จึงเป็น definitely pathogenic mutation

PKD1 – Exon 15d

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	64.5	63.5		
Normal control			PKD1 reference sequence: 1) GCTGCAGCAGCCGTA 2) CACCGCGT <u>C</u> CAACAACA	
PK025			GCTGCAGCAGCCGTA GCTGCAGT <u>A</u> GCCGTA	c.4447C>T (p. Q1484X) Novel mutation
PK013			CACCGCGT <u>C</u> CAACAACA CACCGCGT <u>T</u> CAACAACA	c.4343C>T (p.S1448F) Disease causing/Benign

ภาพที่ 17. ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 15d ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK025 มี base substitution คือ c.4447C>T ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Glutamine เป็น stop codon ทำให้โปรตีนมีขนาดสั้น จึงเป็น definitely pathogenic mutation

PCR product ของผู้ป่วย PK013 มี base substitution คือ c.4343C>T ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Serine เป็น Phenylalanine และยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster จัด mutation ให้อยู่ในกลุ่ม disease causing แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย Polyphen2 mutation นี้เป็นชนิด benign จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel)

PKD1 – Exon 15e

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	65.2	63.4	61		
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) TCTCTTACACCTTCGCTC 2) GCACGCCCAT	
PK089				 TCTCTTACACCTTCGCTC TCTCTTACACCTTCGCTC	c.4795_4796insT (p.Y1599Lfs)
PK008				GCACGCCCAT GCACGCTCAT 	c.4769C>T (p.P1590L) Disease causing /Probably damaging

ภาพที่ 18.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 15e ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK089 มี T insertion ที่ c.4795_4796 ส่งผลให้กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงแบบ frameshift จึงเป็น definitely pathogenic mutation

PCR product ของผู้ป่วย PK008 มี substitution คือ c.4769C>T ส่งผลให้กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงจาก Proline เป็น Leucine และยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster และ Polyphen2 จัดให้เป็น disease causing และ probably damaging ตามลำดับ

PKD1 – Exon 15f

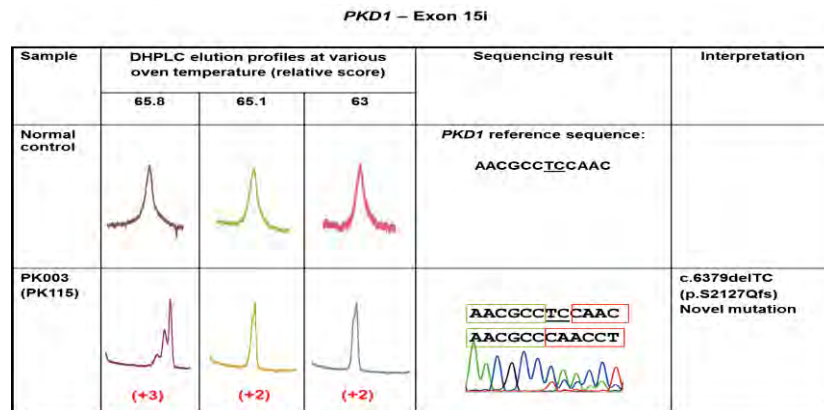
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	65.5	64.2	63.3		
Normal control				PKD1 reference sequence: CTGTAGGAGACGTTGGTGCCA	
PK123				 CTGTAGGAGACGTTGGTGCCA CTGTAGACGTTGGTGCCATC	c.4988delCCT (p.S1663del) c.4987C>T (p.V1662) Polymorphism/Benign

ภาพที่ 19.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 15f ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK123 มี 3 bp deletion, c.4988delCCT ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงแบบ inframe deletion (เป็น definitely pathogenic mutation)

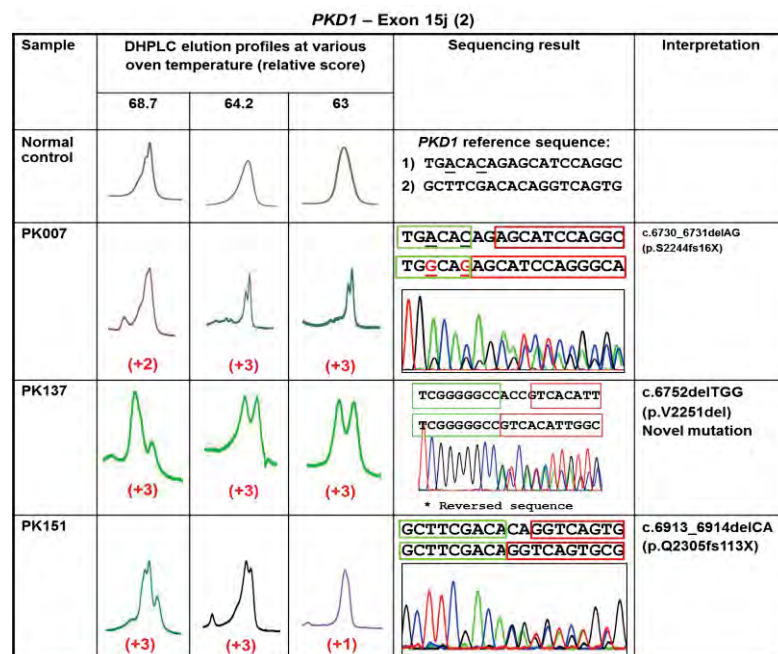
นอกจากนั้น ยังพบว่ามี base substitution ที่ c.4987C>T ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Valine เป็น Isoleucine แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster และ Polyphen 2 แล้ว จัดเป็นกลุ่มของ Polymorphism และ Benign ตามลำดับ



ภาพที่ 20.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 15i ของยีน *PKD1*

PCR product ของผู้ป่วย PK003 หรือ PK115 (เป็นญาติกัน) มี c.6379delTC ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Serine เป็น Glutamine ที่ codon 2127 และส่งผลให้เกิด frameshift translation เป็น definitely pathogenic mutation ที่ไม่เคยถูกรายงานมาก่อน



ภาพที่ 21.

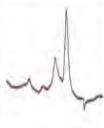
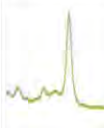
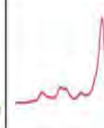
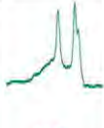
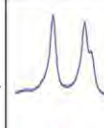
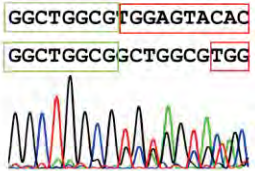
ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 15j ของยีน *PKD1*

PCR product ของผู้ป่วย PK007 มีการขาดหายไป 2 bp, c.6730_6731delAG ทำให้เกิด frameshift translation ส่งผลให้โปรตีนมีขนาดสั้นลง (reported mutation)

PCR product ของผู้ป่วย PK137 มีการขาดหายไป 3 bp, c.6752delTGG ส่งผลให้กรดอะมิโน Valine ที่ตำแหน่ง codon 2251 ขาดหายแบบ in-frame (novel)

PCR product ของผู้ป่วย PK151 มีการขาดหายไป 2 bp, c.6913_6914delCA ทำให้เกิด frameshift translation และ stop codon ที่ 113 กรดอะมิโนถัดไป (โปรตีนมีขนาดสั้นลง) ทั้งหมดนี้เป็น definitely pathogenic mutation

PKD1 – Exon 16

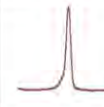
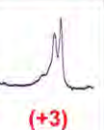
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	66.5	65	62.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: GGCTGGCGTGGAGTACAC	
PK036 PK152	 (+3)	 (+3)	 (+3)		c.7000ins7 (p.V2334fs) Reported – Definitely pathogenic

ภาพที่ 22.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 16 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK036 และ PK152 มี 7-bp insertion คือ c.7000ins7 ใน exon 16 ซึ่งมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ทำให้เกิด frameshift translation เป็น definitely pathogenic mutation

PKD1 – Exon 20

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	65.5	64.2	62.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) CGGGGCTCACAGTC 2) GGGGATCGGCCT	
PK121	 (+2)	 (+3)	 (+3)	CGGGGCTCACAGTC CGGGGCTCGCAGTC	c.7753A>G (p.T2585A) Polymorphism/ Benign
PK135	 (+3)			GGGGATCGGCCT GGGGATTGCCT	c.7810G>A (p.D2604N) Reported - Indeterminate

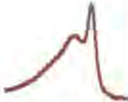
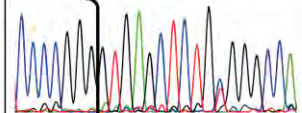
ภาพที่ 23.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 20 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK121 มี base substitution คือ c.7753A>G ใน exon 20 ซึ่งไม่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Threonine เป็น Alanine ที่ codon 2585 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย prediction program ทั้ง MutationTaster และ Polyphen 2 ให้ผลเป็น polymorphism และ benign ตามลำดับ

PCR product ของผู้ป่วย PK135 มี base substitution คือ c.7810G>A (p.D2604N) ซึ่งเป็น reported - indeterminate variant

PKD1 – Exon 24

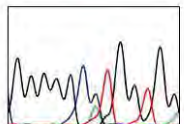
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	64.6	64.2		
Normal control			PKD1 reference sequence: CCCCGGGGTGAGCTCTGCGGGCCA	
PK115 PK130 PK138	 (+2)	 (+2)	CCCCGGGGTGAGCTCTGCGGGCCA CCCCGGGGTGAGCTCTG T GGGCCA 	c.8948+11C>T (IVS24+11C>T) Reported SNP

ภาพที่ 24.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 24 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK115, PK130 และ PK138 ซึ่งไม่ได้เป็นญาติกัน มี base substitution เหมือนกันคือ คือ c.8948+11C>T ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน และเคยถูกรายงานว่าเป็น SNP

PKD1 – Exon 28

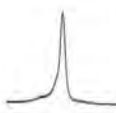
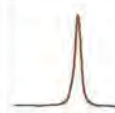
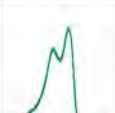
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	65.7	64.7	62.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: GGGGCCTGGTGG	
PK088	 (+3)	 (+3)	 (+1)	GGGGCCTGGTGG GGGGC A TGGTGG 	c.9685C>A (p.L3229M) Polymorphism/ Possibly damaging

ภาพที่ 25.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 28 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK088 มี c.9685C>A ที่ทำให้เปลี่ยนจาก Leucine เป็น Methionine เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย MutationTaster และ Polyphen2 ได้เป็น Polymorphism และ Possible damaging ตามลำดับ จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel)

PKD1 – Exon 34

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	64.4	63	61.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: CCTGTGAGTGTCCGGCT	
PK121				CCTGTGAGTGTCCGGCT CCTGTGAGTGTCTGGCT	c.10499+10C>T (IVS34+10C>T)

ภาพที่ 26.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 34 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK121 มี base substitution คือ c.10499+10C>T (Novel SNP)

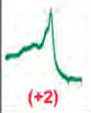
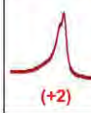
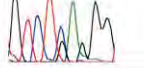
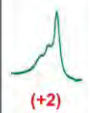
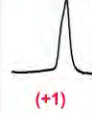
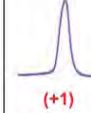
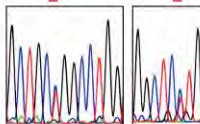
PKD1 – Exon 35

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	66	63.4		
Normal control			PKD1 reference sequence: ACAGAGACGCTG	
PK001 PK005 PK098 PK133			ACAGAGACGCTG ACAGAGATGCTG	c.10529C>T (p.T3510M) Reported SNP

ภาพที่ 27.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 35 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK001, PK005, PK098 และ PK133 มี base substitution คือ c.10529C>T (p.T3510M) ซึ่งเป็นเพียง SNP ที่พบได้ทั่วไปในประชากรซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว และไม่มีผลต่อการเกิดโรค ADPKD

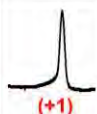
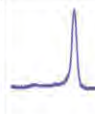
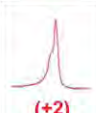
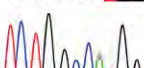
PKD1 – Exon 36				
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result
	65.7	64.1	62.5	
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) GTCTCAGGG 2) CACGGGCTCAG
PK072				GTCTCAGGG GTCTGAGGG 
PK111				GCTGCCGGCCTGG GGCTCCTGTCC GCTGCTGGCCTGG GGCTCTGTCC 
				1) c.10652C>T (p. P3551L) Disease causing/ Probably damaging 2) c.10768C>T (p. L3590L) Reported - SNP

ภาพที่ 28.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 36 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK072 มี c.10718C>G (Ser3573X) ซึ่งส่งผลให้โปรตีน polycystin ขนาดสั้นลง เหลือเพียง 3,573 กรดอะมิโนซึ่งจะไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ เป็น definitely pathogenic mutation

PCR product ของผู้ป่วย PK111 มี c.10652C>T ที่ทำให้ Proline เปลี่ยนเป็น Leucine ซึ่งยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster และ Polyphen2 ได้เป็น disease causing และ probably damaging ตามลำดับ จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel) และมี c.10768C>T (p. L3590L) เป็น reported SNP

PKD1 – Exon 39				
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result
	66.4	65.4	61	
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) TCTGGCCATGGATGG 2) ACGGCTGCGG
PK089				ACGGCTGCGG ACGGCCTGCGG 
PK124				TCTGGCCATGGATGG TCTGGCCACGGATGG 
				c.11246T>C (p.L3749P) Novel Indeterminate c.11176T>C; (p.W3726R) Reported – Highly likely pathogenic

ภาพที่ 29.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 39 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK089 มี c.11246T>C (p.L3749P) ซึ่งเป็น indeterminate variant (novel)

PCR product ของผู้ป่วย PK124 มี c.11176T>C (p.W3726R) ซึ่งเคยถูกรายงานเป็น highly likely pathogenic

PKD1 – Exon 40					
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	66	65	63.5		
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) AGCACTCTA 2) AGAGTCCTCACAA 3) GCTGAATAGGCCCGACGTCCCGAGCCATTGTGAGGACTCTCCAGCCCAACGT 4) CCTATTAGCGCC 5) GGCCGCAGGAGG	
PK016 PK065				AGCACTCTA AGCAGTCTA	c.11272C>G (p.L3758V) Polymorphism/ Benign
PK051				AGAGTCCTCACAA AGAGTCGTCACAA	c.11363C>G; (p.P3788R) Polymorphism/ Benign
PK030 PK125					c.11348_11385 delinsAGTCC (p.V3783_W3795 delinsES)
PK099				CCTATTAGCGCC CCTATTGAGCGCC	c.11393C>G (p.S3798X) Novel mutation
PK102				GGCCGCAGGAGG GGCCGCGAGGAGG	c.11319A>G (p. A3773A) Polymorphism/ Benign

ภาพที่ 30.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 40 ของยีน *PKD1*

PCR product ของผู้ป่วย PK016 และ PK065 มี Novel SNP, c.11272C>G (p.L3758V)

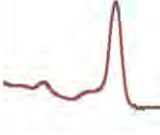
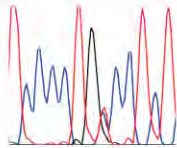
PCR product ของผู้ป่วย PK051 มี Novel SNP, c.11363C>G (p.P3788R)

PCR product ของผู้ป่วย PK030 และ PK125 มีทั้ง 38-bp deletion และ 5-bp insertion คือ c.11348_11385delinsAGTCC (p.V3783_W3795delinsES) ทำให้เกิดผลเป็น in-frame deletion ของ 13 กรดอะมิโนพร้อมกับ insertion ของ 2 กรดอะมิโน จึงเป็น definitely pathogenic mutation (Novel)

PCR product ของผู้ป่วย PK099 มี nonsense mutation ในยีน *PKD1* ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนคือ c.11393C>G (Ser3798X) ซึ่งจะส่งผลให้ถอดรหัสได้โปรตีน polycystin ที่มีขนาดสั้นลง จึงนับเป็น definitely pathogenic mutation (Novel)

PCR product ของผู้ป่วย PK102 มี SNP ชนิด base substitution ที่ทำให้กรดอะมิโนยังคงเดิม (synonymous) ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว คือ c.11319A>G (p.A3773A)

PKD1 – Exon 41

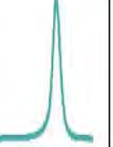
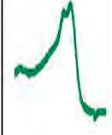
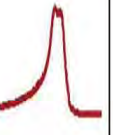
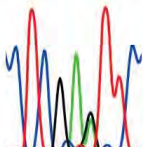
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	66.2	65		
Normal control			PKD1 reference sequence: TCCCCTG <u>C</u> CCTCT	
PK007	 (+3)	 (+3)	TCCCCTG <u>C</u> CCTCT TCCCCTG <u>T</u> CCTCT 	c.11537+20C>T

ภาพที่ 31.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 41 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK007 มี SNP ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว คือ c.11537+20C>T (IVS41+20C>T) ซึ่งเกิดใน intron บริเวณที่ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ splicing

PKD1 – Exon 42

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)				Sequencing result	Interpretation
	70	69	68	67		
Normal control					PKD1 reference sequence: CTCGAGTTC	
PK003	 (+2)	 (+2)	 (+2)	 (+1)	CTCGAGTTC CTCGA <u>A</u> TTC 	c.11616G>A (p. E3872E) Reported SNP

ภาพที่ 32.

ผลการตรวจ **PKD1 mutation analysis** ใน exon 42 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK003 มี SNP ชนิด base substitution ที่ทำให้กรดอะมิโนยังคงเดิม (synonymous) ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว คือ c.11616G>A (p. E3872E)

PKD1 – Exon 43				
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result
	68.5	67.2	65.2	
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) CAGGCACACCTGTGGGGGG 2) AGGCCGCCAGGCC 3) GAGCCTGGGCG
PK121				CAGGCACACCTGTGGGGGG CAGGCACACCTGTGGGGGG * Reversed sequence c.11713-2A>G (IVS42-2A>G) Splicing Defect
PK108				AGGCCGCCAGGCC AGGCCGCCAGGCC * Reversed sequence c.11969T>G (p.L3990R) Disease causing/ Probably damaging
PK016 PK065				GAGCCTGGGCG GAGCCTAGGCG c.11807G>A (p.W3936X) Novel mutation

ภาพที่ 33.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 43 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK121 มี c.11713-2A>G เป็น novel mutation ที่ตำแหน่ง acceptor splice site ส่งผลให้ exon 43 ถูกตัดออกเมื่อ transcribe เป็น RNA (exon 43 skipping)

PCR product ของผู้ป่วย PK108 มี c.11969T>G (p.L3990R) ซึ่งทำนายได้เป็น disease causing และ probably damaging จึงถือเป็น indeterminate variant (novel)

PCR product ของผู้ป่วย PK016 และ PK065 มี novel nonsense mutation คือ c.11807G>A (p.W3936X) จึงเป็น definitely pathogenic mutation

PKD1 – Exon 44				
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result
	65.5	64.9	61.5	
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) TACGCCAGCT 2) TCGTCGCAG 3) TGGCCATCCT
PK090				TACGCCAGCT TACGCCAGCT c.12124C>T (p.Q4042X) Reported mutation
PK106				TCGTCGCAG TGGCCATCCT TCGTCAGCAG TGGCCATCCT c.12004-5C>A (IVS43-5C>A) c.12133A>G (p.I4045V)

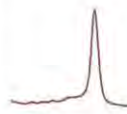
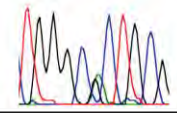
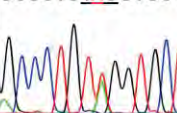
ภาพที่ 34.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 44 ของยีน PKD1

PCR product ของผู้ป่วย PK090 มี reported nonsense mutation คือ c.12124C>T (p.Q4042X)

PCR product ของผู้ป่วย PK106 มี c.12133A>G (p.I4045V) ซึ่งเป็น reported SNP และ c.12004-5C>A (IVS43-5C>A) ซึ่งอยู่ใน intron บริเวณที่อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ splicing หรือไม่ก็ได้ จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel)

PKD1 – Exon 45

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	65.2	64.6		
Normal control			PKD1 reference sequence: 1) TGGGCACTGCG 2) GGCCCTGTTGGTGCTG	
PK019 PK106			TGGGCACTGCG TGGGCGCTGCG 	c.12276A>G (p. A4092A) Reported – Likely neutral
PK133			GGCCCTGTTGGTGCTG GGCCCTGTAGGTGCTG 	c.12188T>A (p.L4063X) Novel mutation

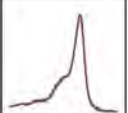
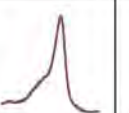
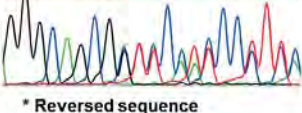
ภาพที่ 35.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 45 ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK019 และ PK106 มี SNP ที่ทำให้กรดอะมิโนยังคงเดิม (synonymous) ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว คือ c.12276A>G (p. A4092A)

PCR product ของผู้ป่วย PK133 มี novel nonsense mutation คือ c.12188T>A (p.L4063X)

PKD1 – Exon 46a

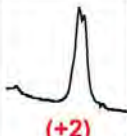
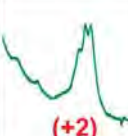
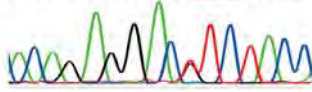
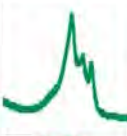
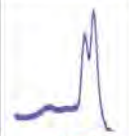
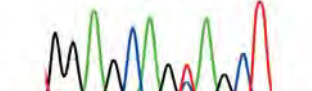
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	65.4	65.2	65		
Normal control				PKD1 reference sequence: GGGCAGCGGCTCCATCCCTTC	
PK146 PK089				GGGCAGCGGCTCCATCCCTTC GGGCAGCGCTCCATCCCTTCA  * Reversed sequence	c.12478_79delC (p.P4160Rfs) Novel mutation

ภาพที่ 36.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 46a ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK146 และ PK089 มีการขาดหายไป 1 bp คือ c.12478_79delC (p.P4160Rfs) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ codon 4160 เปลี่ยนจาก Proline เป็น Arginine และทำให้เกิด frameshift translation ที่กรดอะมิโนตัวถัดไป จัดเป็น novel definitely pathogenic mutation

PKD1 – Exon 46b

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	68	66	64.4		
Normal control				PKD1 reference sequence: 1) AGAGAGGAC <u>GT</u> CTACC 2) GGAGCTG <u>C</u> AGCT	
PK059				AGAGAGGAC<u>GT</u>CTACC AGAGAGGAC<u>T</u>CTACC 	c.12706G>T (p. V4236F) Disease causing/ Probably damaging
PK044				GGAGCTG<u>C</u>AGCT GGAGCTG<u>T</u>AGCT 	c.12724C>T (p. Q4242X) Reported – Definitely pathogenic

ภาพที่ 37. ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 46b ของยีน **PKD1**

PCR product ของผู้ป่วย PK059 มี base substitution คือ c.12706G>T (p. V4236F) จากการทำนายได้เป็น Disease causing และ Probably damaging ตามลำดับ จึงถือว่าเป็น indeterminate variant (novel)

PCR product ของผู้ป่วย PK044 มี nonsense mutation ในยีน **PKD1** ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว คือ c.12724C>T (p. Q4242X) จัดเป็น definitely pathogenic mutation

การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *PKD2* ใน proband

จากการตรวจตัวอย่างตรวจของผู้ป่วย ADPKD ที่เก็บตัวอย่างได้จำนวน 70 รายจากต่างครอบครัว ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกัน โดยวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD2* ใน PCR product ที่ครอบคลุม coding regions ทั้งหมด (exon 1-15) จำนวน 17 ชิ้น พบ DNA variants ของยีน *PKD2* ดังแสดงเรียงตามลำดับ exon ในตารางที่ 6 ซึ่งแบ่งเป็น

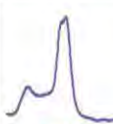
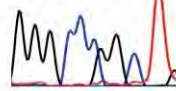
- Definitely pathogenic mutation จำนวน 6 ชนิด ในผู้ป่วยจาก 11 ครอบครัว
- Indeterminate variants จำนวน 4 ชนิด ในผู้ป่วยจาก 5 ครอบครัว
- Polymorphism จำนวน 9 ชนิด ในผู้ป่วยจาก 16 ครอบครัว (แสดงไว้บางส่วน)

รายละเอียดผลการตรวจวิเคราะห์ยีน *PKD2* ด้วย DHPLC และ direct DNA sequencing ได้นำมาแสดงเป็นตัวอย่างในภาพที่ 38 - ภาพที่ 46

ตารางที่ 6. สรุปผลการตรวจพบ *PKD2* mutations และ SNPs จากผู้ป่วย ADPKD
(จาก PCR product ที่ครอบคลุม coding regions ทั้งหมดของยีน *PKD2* จำนวน 17 ชิ้น)

Region	Nucleotide Change	Consequence (Amino Acid Change)	Mutation Type	Interpretation (Clinical Significance)	ADPKD Family
Exon 1a	c.83G>C (<u>CGG</u> > <u>CCG</u>)	R28P	Missense (Reported SNP)	Indeterminate	PK057 PK098
Exon 1b	c.361G>T (<u>GGC</u> > <u>TGC</u>)	G121C	Missense (Novel variant)	Polymorphism (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK129
	c.420G>A (<u>GGG</u> > <u>GGA</u>)	G140G	Silent (Synonymous) (Reported SNP)	Likely Neutral	PK046 PK095 PK097 PK100
Exon 1c	Homozygous c.568G>A (<u>GCG</u> > <u>ACG</u>)	A190T	Missense (Reported SNP)	Likely Neutral	PK077
	Homozygous c.595+15C>T	Likely Silent	IVS silent (Novel SNP)	Likely Neutral	
	c.568G>A (<u>GCG</u> > <u>ACG</u>)	A190T	Missense (Reported SNP)	Likely Neutral	PK012 PK036
Exon 2	c.681C>A (<u>TAC</u> > <u>TAA</u>)	Y227X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK128 PK138
Exon 4	c.916C>T (<u>CGA</u> > <u>TGA</u>)	R306X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK083 PK145
	c.958C>T (<u>CGA</u> > <u>TGA</u>)	R320X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK103
	c.894-22 G>A	Likely Silent	IVS silent (Novel SNP)	Likely Neutral	PK083
Exon 6	c.1354A>G (<u>AAT</u> > <u>AAC</u>)	I452V	Missense (Reported SNP)	Likely Neutral	PK093 PK141
	c.1546G>T (<u>GTG</u> > <u>TTG</u>)	V516L	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Benign (Polyphen2)	PK141
Exon 8	c.1765A>T (<u>ACC</u> > <u>TCC</u>)	T589S	Missense (Novel variant)	Disease causing (MutationTaster) Probably damaging (Polyphen2)	PK117
Exon 11	c.2139C>T (<u>GTC</u> > <u>GTT</u>)	V713V	Silent (Synonymous) (Novel SNP)	Likely Neutral	PK102
Exon 13	c.2407C>T (<u>CGA</u> > <u>TGA</u>)	R803X	Nonsense (Reported Mutation)	Definitely Pathogenic	PK037 PK046 PK073 PK096
	c.2519delAAGTG	Q840Lfs2X	Deletion, Frame-shift (Novel Mutation)	Definitely Pathogenic	PK143
Intron 13	c.2522-1G>C	V841fs	Splicing Defect	Definitely Pathogenic	PK006

PKD2 – Exon 1a

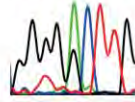
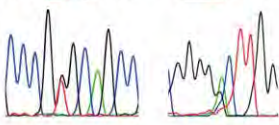
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	71	69.5	66.5		
Normal control				PKD2 reference sequence: GGGCCGGCT	
PK057 PK098				GGGCCGGCT GGGCCCGCT 	c.83G>C (p.R28P) Reported – Likely neutral

ภาพที่ 38.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 1a ของยีน **PKD2**

PCR product ของผู้ป่วย PK057 และ PK098 มี SNP ชนิด base substitution ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง คือ c.83G>C (Arg28Pro) แต่พบได้ทั่วไปในประชากรซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว และไม่มีผลต่อการเกิดโรค ADPKD

PKD2 – Exon 1b

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	69.5	67	65.1		
Normal control				PKD2 reference sequence: CCCGGGCAGCC GGGGCTTGG	
PK046 PK095 PK097 PK100				GGGGGCTTG GGGGACTTG 	c.420G>A (p.G140G) Reported – Likely neutral
PK129				CCCGGGCAGCC GGGGCTTGG CCCGTGCAGCC GGGACTTGG 	c.361G>T (p.G121C) Polymorphism/ Probably damaging c.420G>A (p.G140G) Reported – Likely neutral

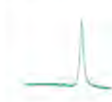
ภาพที่ 39.

ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 1b ของยีน **PKD2**

PCR product ของผู้ป่วย PK046, PK095, PK097, PK100 และ PK129 มี reported SNP ที่ทำให้กรดอะมิโนยังคงเดิม (synonymous) คือ c.420G>A (p.G140G)

PCR product ของผู้ป่วย PK129 มี c.361G>T (p.G121C) ซึ่งยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน และให้ผลการวิเคราะห์เป็น polymorphism เมื่อวิเคราะห์ด้วย MutationTaster และเป็น probably damaging เมื่อวิเคราะห์ด้วย Polyphen 2 จึงจัดเป็น indeterminate variant (novel)

PKD2 – Exon 2

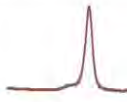
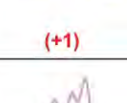
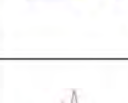
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	58.6	56.5	52		
Normal control				PKD2 reference sequence: GGTCACATACCTCC	
PK128 PK138				GGTCACATACCTCC GGTCACATAACTCC	c.681C>A (p.Y227X) Reported – Definitely pathogenic

ภาพที่ 40.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 2 ของยีน PKD2

PCR product ของผู้ป่วย PK128 และ PK138 ซึ่งไม่ได้เป็นญาติกัน มี base substitution ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วคือ c.681C>A (p.Y227X) ซึ่งจะส่งผลให้ถอดรหัสได้โปรตีน polycystin-2 ที่มีขนาดสั้นลงจากเดิมที่มี 968 กรดอะมิโน เหลือเพียง 227 กรดอะมิโนซึ่งจะไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ จึงเป็น mutation ที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ในผู้ป่วยทั้ง 2 รายนี้อย่างแน่นอน (definitely pathogenic)

PKD2 – Exon 4

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	59.8	58.5		
Normal control			PKD2 reference sequence: 1) TTCCACGAAT 2) ACAACCGAAGTTT	
PK103			TTCCACGAAT TTCCATGAAT	c.958C>T (p.R320X) Reported – Definitely pathogenic
PK145 PK083			ACAACCGAAGTTT ACAAC TGAAGTTT	c.916C>T (p.R306X) Reported – Definitely pathogenic

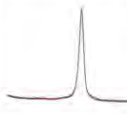
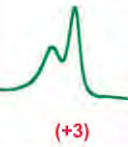
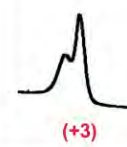
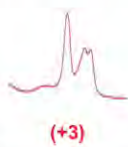
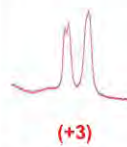
ภาพที่ 41.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 4 ของยีน PKD2

PCR product ของผู้ป่วย PK103 มี reported nonsense mutation ในยีน PKD2 คือ c.958C>T (p.R320X) ซึ่งจะส่งผลให้ถอดรหัสได้โปรตีน polycystin-2 ที่มีขนาดสั้นลง จึงจัดเป็น definitely pathogenic

PCR product ของผู้ป่วย PK145 และ PK083 ซึ่งไม่ได้เป็นญาติกัน มี reported nonsense mutation คือ c.916C>T (p.R306X) จัดเป็น definitely pathogenic

PKD2 – Exon 6

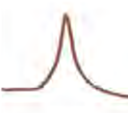
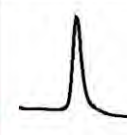
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	57.7	56.7		
Normal control			PKD2 reference sequence: 1) <u>AATCACA</u> 2) CGTT <u>GTGGT</u>	
PK093			<u>AATCACA</u> <u>AAC</u> CACA Reversed sequence	c.1354A>G (p.I452V) (rs1801612)
PK141			<u>AATCACA</u> <u>AAC</u> CACA Reversed sequence	c.1354A>G (p.I452V) (rs1801612) c.1546G>T (p.V516L) Reported – Likely neutral

ภาพที่ 42.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 6 ของยีน **PKD2**

PCR product ของผู้ป่วย PK093 และ PK141 มี reported SNP, c.1354A>G (p.I452V) PCR product ของผู้ป่วย PK141 ยังมี c.1546G>T (p.V516L) ซึ่งยังไม่เคยถูกรายงานมาก่อน เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster ให้ผลเป็น disease causing และ Polyphen2 ให้ผลเป็น benign จึงจัดเป็น indeterminate variant (novel)

PKD2 – Exon 8

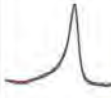
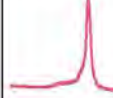
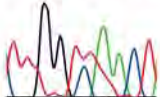
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing result	Interpretation
	58.8	55.3		
Normal control			PKD2 reference sequence: AGACAT <u>GGT</u> GTCG	
PK117			AGACAT <u>GGT</u> GTCG AGACAT <u>GGA</u> TGTCG Reversed sequence	c.1765A>T (p.T589S) Disease causing/ Probably damaging

ภาพที่ 43.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 8 ของยีน **PKD2**

PCR product ของผู้ป่วย PK117 มี c.1765A>T (p.T589S) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MutationTaster ให้ผลเป็น disease causing และ Polyphen2 ให้ผลเป็น Probably damaging จึงจัดเป็น indeterminate variant (novel)

PKD2 – Exon 11

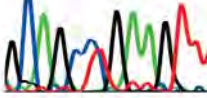
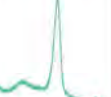
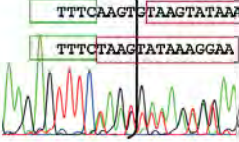
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	59.5	58.5	56.1		
Normal control				PKD2 reference sequence: TTGGTCAA <u>A</u> ACT	
PK102				TTGGTCAA <u>A</u> CT TTGGT <u>T</u> AACT 	c.2139C>T (p.V713V) Novel SNP

ภาพที่ 44.

ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 11 ของยีน **PKD2**

PCR product ของผู้ป่วย PK0102 มี novel synonymous SNP คือ c.2139C>T (p.V713V)

PKD2 – Exon 13

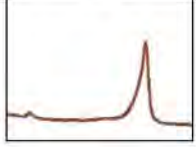
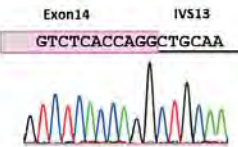
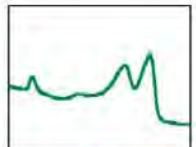
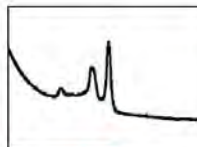
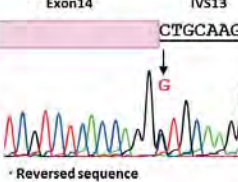
Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)			Sequencing result	Interpretation
	61.5	60.2	58.5		
Normal control				PKD2 reference sequence: 1) GCAGCCGAAGTTT 2) TTTCAAGTGTAAAGTATAAA	
PK037 PK046 PK096				GCAGCCGAAGTTT GCAGC <u>T</u> GAAGTTT 	c.2407C>T (p.R803X) Reported – Definitely pathogenic
PK143					c.2519delAAGTG (p.Q840Lfs2X)

ภาพที่ 45.

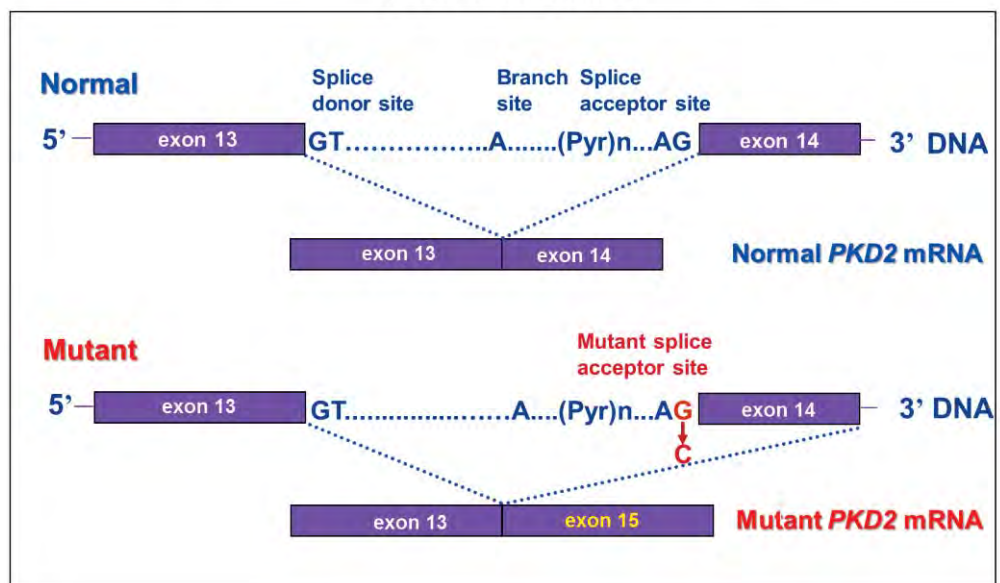
ผลการตรวจ mutation analysis ใน exon 13 ของยีน **PKD2**

PCR product ของผู้ป่วย 3 รายที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกันคือ PK037, PK046 และ PK096 มี reported nonsense mutation, c.2407C>T (p.R803X) จัดเป็น definitely pathogenic ที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ในผู้ป่วยทั้ง 3 รายนี้

PKD2 - Exon 14

Sample	DHPLC elution profiles at various oven temperature (relative score)		Sequencing Result	Interpretation
	62.3	61.9		
Normal control			 Exon14 IVS13 GTCTCACCAGGCTGCAA	
PK006	 (+3)	 (+3)	 Exon14 IVS13 CTGCAAGG ↓ G	c.2522-1G>C (IVS13-1G>C) Notes: Testing in cDNA revealed exon 14 skipping in PKD2 mRNA)

RNA Splicing defect of *PKD2* gene in PK006 family (Exon 14 skipping)



ภาพที่ 46. ผลการตรวจ **mutation analysis** ใน exon 14 ของยีน *PKD2*

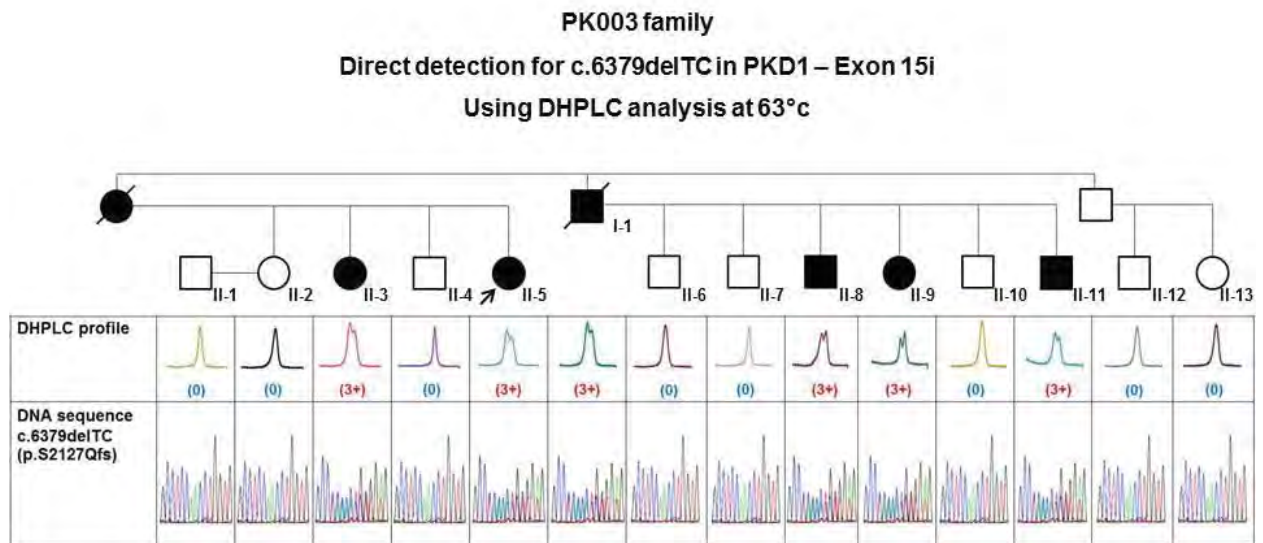
PCR product ของผู้ป่วย PK006 มี c.2522-1G>C (IVS13-1G>C) ซึ่งเป็น splicing defect ที่ splice acceptor site ใน intron 13 ส่งผลให้เกิด exon 14 skipping ที่ระดับ mRNA (ซึ่งได้ทำการพิสูจน์แล้วในงานวิจัยนี้) จัดเป็น definitely pathogenic

**ผลการวิเคราะห์การถ่ายทอดการกลายพันธุ์ในครอบครัวผู้ป่วย ADPKD
โดยใช้วิธี DHPLC เพื่อการตรวจ *PKD1* หรือ *PKD2* mutations โดยตรง**

สำหรับครอบครัว ADPKD ที่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* แล้วจากการตรวจวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ ถ้าครอบครัวนั้นมีสมาชิกครอบครัวหลายคน ทั้งที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ผู้วิจัยและคณะได้พัฒนาวิธีตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* หรือยีน *PKD2* ชนิดที่พบในครอบครัวนั้นๆ ด้วยการตรวจ genomic DNA ของสมาชิกครอบครัวผู้ป่วยด้วยวิธี DHPLC แบบจำเพาะเจาะจง เพื่อให้ทราบการถ่ายทอดยีนที่มีการกลายพันธุ์ในครอบครัว ทำให้วินิจฉัยโรคในสมาชิกครอบครัวได้อย่างรวดเร็ว

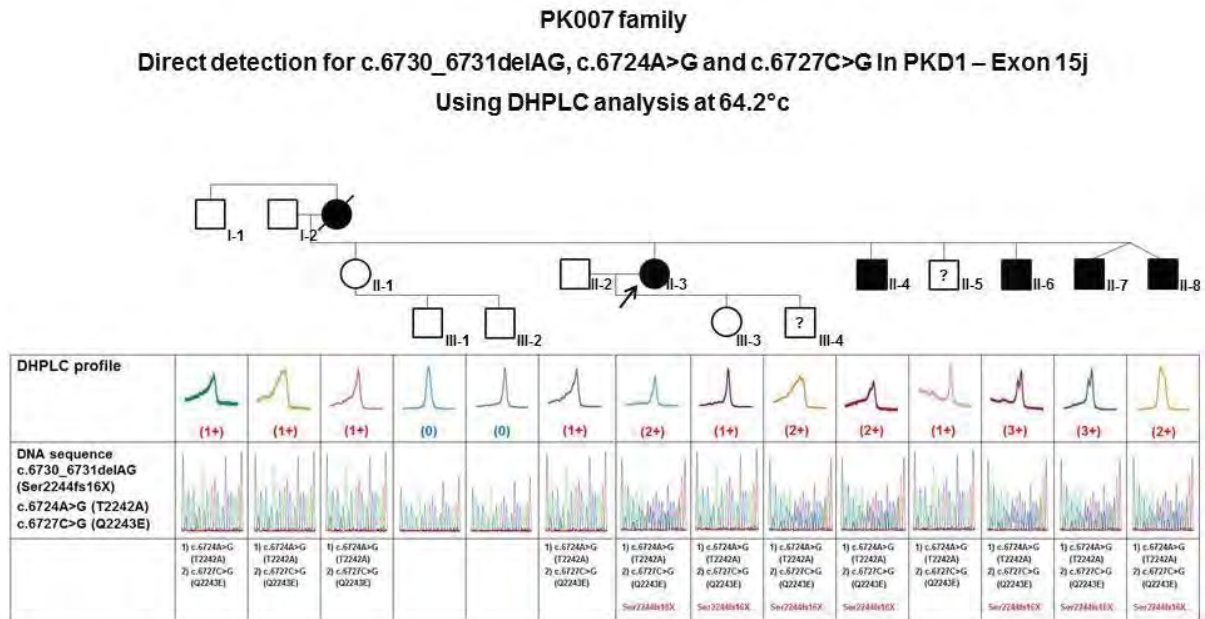
ครอบครัว ADPKD ที่ตรวจพบ *PKD1* mutation ซึ่งถูกจัดว่าเป็นโรค PKD1 ในรายงานครั้งนี้มีหลายครอบครัว แต่มีเพียง PK003, PK007, PK044, และ PK121 ที่สามารถรวบรวมสมาชิกครอบครัวได้หลายคน จึงได้พัฒนาวิธีตรวจด้วยเครื่อง DHPLC โดยเลือกอุณหภูมิของ DHPLC column ที่เหมาะสม (ภาพที่ 47 - ภาพที่ 50)

ส่วนครอบครัว ADPKD ที่ตรวจพบ *PKD2* mutation ที่ได้ถูกจัดว่าเป็นโรค PKD2 ในรายงานครั้งนี้มีทั้งหมด 5 ครอบครัว คือ PK083, PK103, PK037, PK046 และ PK096 โดยมี 3 ครอบครัวที่สามารถรวบรวมสมาชิกครอบครัวได้หลายคน คือ PK083, PK037, และ PK046 จึงได้พัฒนาวิธีตรวจ *PKD2* mutation ของทั้ง 3 ครอบครัวนี้ (ภาพที่ 51 - ภาพที่ 53)



ภาพที่ 47. การตรวจ c.6379delTC (p.S2127Qfs) ใน exon 15i ของยีน *PKD1* ในครอบครัว PK003

จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 15i ของยีน *PKD1* ในผู้ป่วย PK003 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจนทุกอุณหภูมิ จึงได้เลือกใช้ DHPLC condition ที่ 63°C ในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว และพบว่าจากสมาชิกครอบครัวทั้งหมด 14 คน มีผู้ที่มี S2127Qfs ในยีน *PKD1* จำนวน 6 คน (รวมทั้งตัวผู้ป่วยที่เป็น proband) ซึ่งทุกคนที่ถูกตรวจพบ S2127Qfs เป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค (I-1, II-3, II-5, II-8, II-9 และ II-11) เป็นการยืนยันว่า S2127Qfs เป็นสาเหตุของโรค PKD1 ในครอบครัวนี้

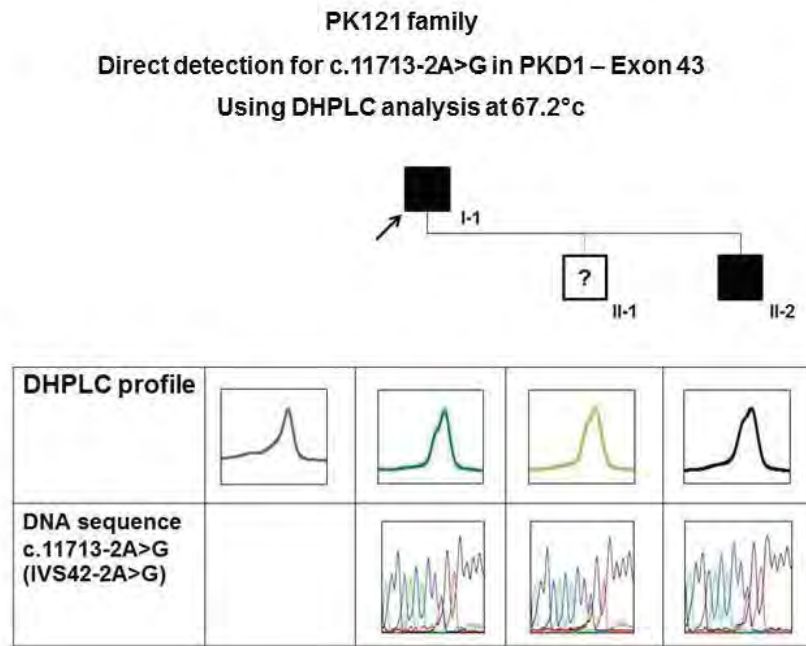


ภาพที่ 48. การตรวจ c.6730_6731delAG (p.Ser2244fs16X) ใน exon 15j ของยีน *PKD1* ในครอบครัว PK007

จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 15j ของยีน *PKD1* ในผู้ป่วย PK007 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจน (score เป็น 2+,3+,3+ ที่อุณหภูมิของ DHPLC column เป็น 68.7, 64.2 และ 63°C ตามลำดับ) จึงได้ใช้ DHPLC condition ที่ 68.7 และ 64.2 ในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว และพบว่าจากสมาชิกครอบครัวทั้งหมด 14 คน มีผู้ที่มี S2244fs16X ในยีน *PKD1* จำนวน 6 คน (รวมทั้งตัวผู้ป่วยที่เป็น proband) ซึ่งสมาชิกที่ถูกตรวจพบ S2244fs16X เป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค 5 คน (II-3, II-4, II-6, II-7 และ II-8) เป็นการยืนยันว่า S2127Qfs เป็นสาเหตุของโรค PKD1 ในครอบครัวนี้

แต่ที่น่าสนใจ คือ III-4 ถูกตรวจพบว่ามี S2244fs16X ด้วยยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งอธิบายได้ว่าเป็นเพราะอายุยังไม่มาก จึงยังไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น การตรวจพบ *PKD1* mutation ในกรณีนี้ถือว่าเป็น pre-symptomatic diagnosis ซึ่งจะช่วยให้สมาชิกครอบครัวนี้ดูแลสุขภาพแต่เนิ่นๆ เพื่อชะลอหรือบรรเทาอาการแสดงของโรค รวมทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนชีวิตได้

อย่างไรก็ตาม DHPLC elution profile ในกรณีของครอบครัว PK007 นี้ไม่สามารถใช้บ่งชี้การที่มี c.6730_6731delAG ได้ถูกต้องทั้งหมด โดยที่รูปแบบของ elution profile มีความไม่คงที่ แตกต่างกันหลายแบบซึ่งจัดจำพวกได้ยาก (ต้องใช้การยืนยันด้วย DNA sequencing) ทั้งนี้เนื่องจากใน exon 15j ของยีน *PKD1* นี้มี SNP อื่นอยู่ด้วยถึง 2 ชนิดคือ c.6724A>G (p.T2242A) และ c.6727C>G (Q2243E) ทั้งที่เป็นภาวะ heterozygous หรือ homozygous รวมถึงการอยู่บน allele เดียวกัน (cis arrangement) หรือต่าง allele กัน (trans arrangement) ทำให้รบกวนการจับเป็น heteroduplex ของ c.6730_6731delAG ที่ต้องการตรวจโดยตรง

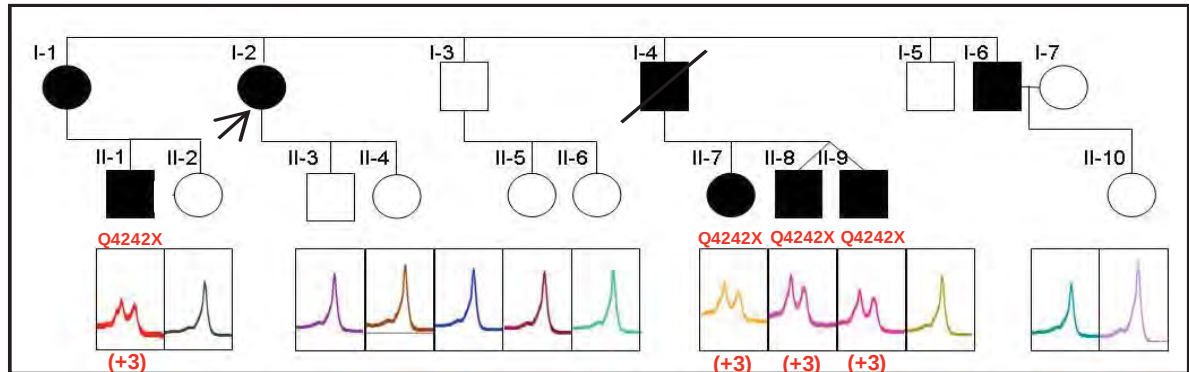


ภาพที่ 49. การตรวจ c.11713-2A>G (IVS42-2A>G) ใน exon 43 ของยีน *PKD1* ในครอบครัว PK121

จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 43 และบางส่วนของ Intron 42 และ 43 ของยีน *PKD1* ในผู้ป่วย PK121 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจน (score เป็น 3+, 2+, 1+ ที่อุณหภูมิของ DHPLC column เป็น 68.5, 67.2 และ 65.2°C ตามลำดับ) ได้ใช้ DHPLC condition ที่ 67.2 ในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว และพบว่าสมาชิกครอบครัวทั้งหมด 3 คน มี c.11713-2A>G ซึ่งสมาชิกที่ถูกตรวจพบ S2244fs16X เป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค 2 คน (I-1 และ II-2) เป็นการยืนยันว่า c.11713-2A>G เป็นสาเหตุของโรค PKD1 ในครอบครัวนี้

ที่น่าสนใจ คือ II-1 ถูกตรวจพบว่ามี c.11713-2A>G ด้วย แต่ยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งอธิบายได้ว่าเป็นเพราะอายุยังไม่มาก จึงยังไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น การตรวจพบ *PKD1* mutation ในกรณีนี้ถือว่าเป็น pre-symptomatic diagnosis ซึ่งจะช่วยให้สมาชิกครอบครัวนี้ดูแลสุขภาพแต่เนิ่นๆ เพื่อชะลอหรือบรรเทาอาการแสดงของโรค รวมทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนชีวิตได้

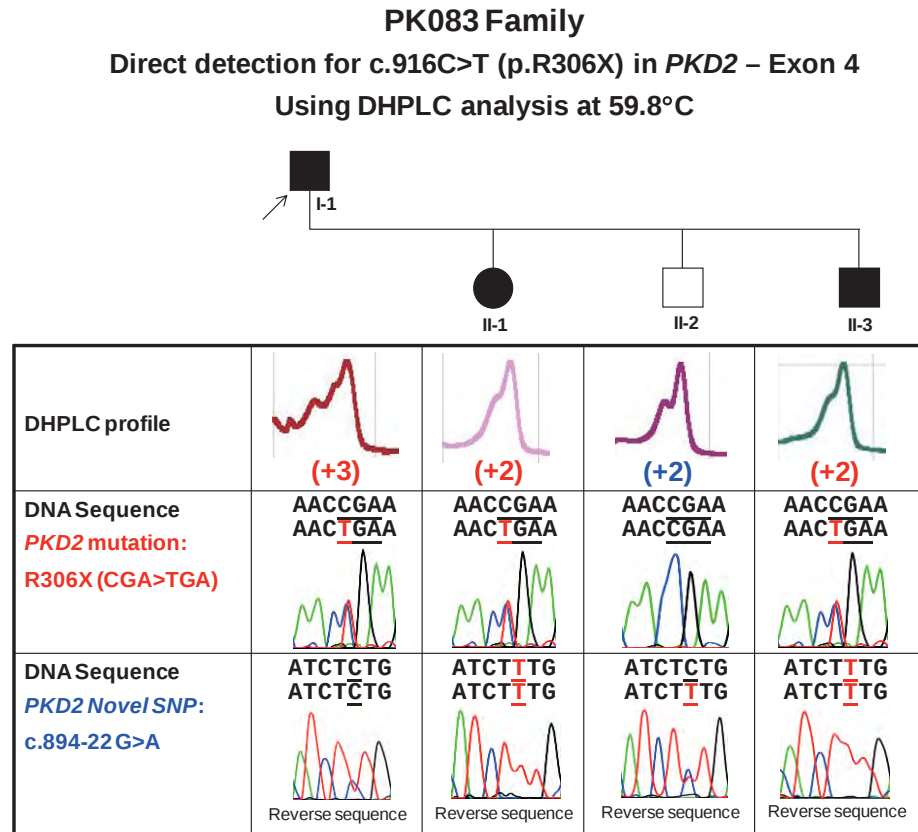
PK044 Family
Direct detection for c.12724C>T (p.Q4242X) in *PKD1* – Exon 46b
Using DHPLC analysis at 66.0°C



ภาพที่ 50. การตรวจ c.12724C>T (p.Q4242X) ใน exon 46b ของยีน *PKD1* ในครอบครัว

PK044

จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 46b ของยีน *PKD1* ในผู้ป่วย PK044 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจนที่สุด (score เป็น +3) ที่อุณหภูมิของ DHPLC column เป็น 66.0°C (ดูภาพที่ 37) จึงได้ใช้ DHPLC condition ดังกล่าวในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว และพบว่าจากสมาชิกครอบครัวทั้งหมด 13 คน มีผู้ที่มี Q4242X ในยีน *PKD1* จำนวน 4 คน (รวมตัวผู้ป่วยที่เป็น proband ด้วย) ซึ่งคนที่ถูกตรวจพบ Q4242X เป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค PKD1 ทั้งหมด (II-1, II-7, II-8 และ II-9) เป็นการยืนยันว่า Q4242X เป็นสาเหตุของโรค PKD1 ในครอบครัวนี้



ภาพที่ 51. การตรวจ c.916C>T(p.R306X) ใน exon 4 ของยีน *PKD2* ในครอบครัว PK083

จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 4 ของยีน *PKD2* ในผู้ป่วย PK083 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจนที่สุด (score เป็น +3) ที่อุณหภูมิของ DHPLC column เป็น 59.8°C จึงได้ใช้ DHPLC condition ดังกล่าว ในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว

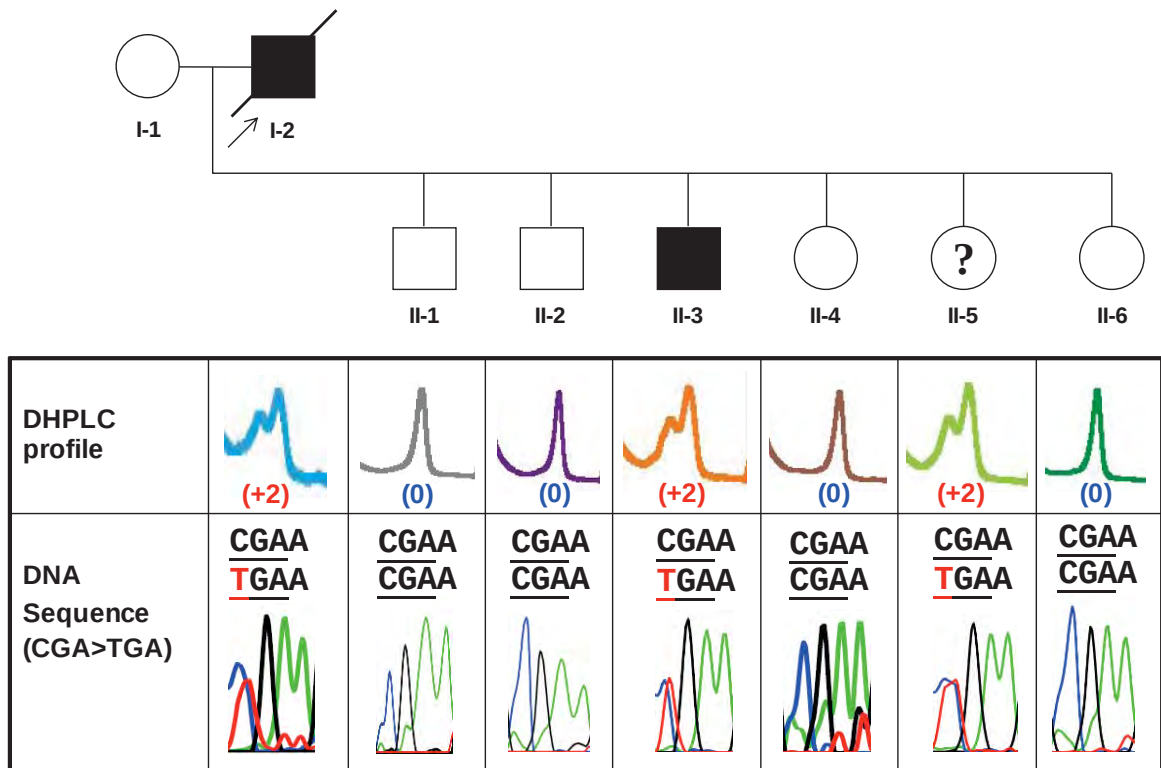
พบว่าสมาชิกครอบครัวอีก 3 คน ไม่มีผู้ใดมี DHPLC peak เหมือน proband (I-1) เลย แต่ทุกคนมี peak ที่แตกต่างจาก normal control อย่างชัดเจน (score เป็น +2) โดยที่ 2 คน (II-1 และ II-3) มี pattern เหมือนกัน แต่ต่างจากอีก 1 คน (II-2) เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า II-1 และ II-3 มี R306X เหมือน proband (I-1) และเป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค PKD2 จึงเป็นการยืนยันว่า R306X เป็นสาเหตุของโรค PKD2 ในครอบครัวนี้

ส่วน II-2 ไม่มี *PKD2* mutation แต่การที่มี peak เป็น +2 เพราะมี SNP ชนิดที่พบใหม่ใน intron คือ c.894-22 G>A แบบ heterozygous ซึ่ง SNP นี้พบใน II-1 และ II-3 เช่นกันแต่เป็นลักษณะ homozygous ขณะที่ใน proband (I-1) ไม่มี SNP นี้ ดังนั้นจะเห็นว่าการที่มี DNA sequence ที่ต่างกันในแต่ละราย ส่งผลให้ได้ DHPLC elution profile ต่างกันแบบจำเพาะกับ genotype ซึ่งสามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจสมาชิกของครอบครัวได้อย่างแม่นยำถ้าทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว อย่างไรก็ตาม กรณีที่มี DNA variant ใน PCR amplicon เดียวกันมากกว่า 1 ตำแหน่ง ต้องใช้ความระมัดระวังในการแปลผล และควรยืนยันด้วยการทำ DNA sequencing ด้วยเสมอ

PK037 Family

Direct detection for c.2407C>T (p.R803X) in *PKD2* – Exon 13

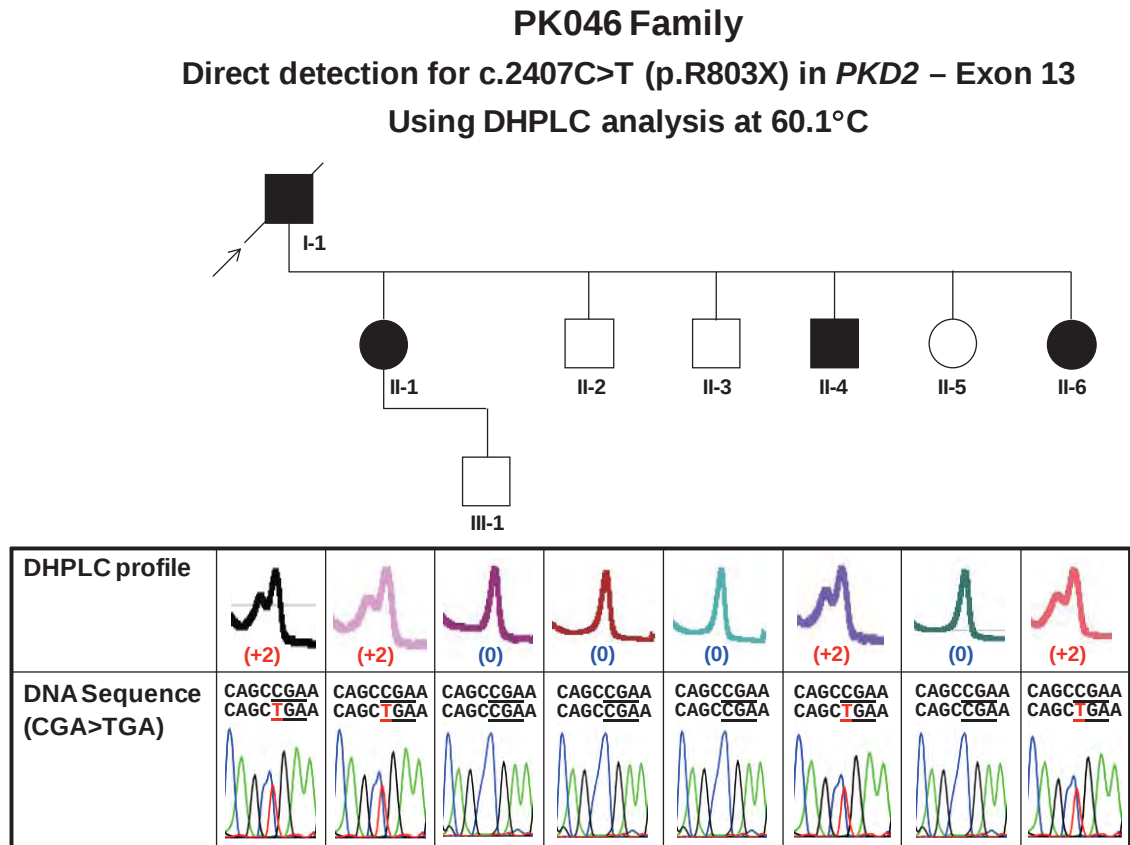
Using DHPLC analysis at 60.1°C



ภาพที่ 52. การตรวจ c.2407C>T (p.R803X) ใน exon 13 ของยีน *PKD2* ในครอบครัว PK037

จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 13 ของยีน *PKD2* ในผู้ป่วย PK037 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจน (score เป็น +2) ที่อุณหภูมิของ DHPLC column เป็น 60.1°C จึงได้ใช้ DHPLC condition ดังกล่าว ในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว และพบว่าจากสมาชิกครอบครัว ทั้งหมด 7 คน มีผู้ที่มี R803X ในยีน *PKD2* จำนวน 3 คน (รวมตัวผู้ป่วยที่เป็น proband ซึ่งเสียชีวิตแล้วด้วย) ซึ่งคนที่ถูกตรวจพบ R803X เป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค *PKD2* แล้ว 2 คน (I-2 และ II-3) เป็นการยืนยันว่า R803X เป็นสาเหตุของโรค *PKD2* ในครอบครัวนี้

แต่ที่น่าสนใจ คือ II-5 ถูกตรวจพบว่ามี R803X ด้วยแต่ไม่ได้เป็นโรค ซึ่งอธิบาย ได้ว่าเป็นเพราะอายุยังไม่มาก จึงยังไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น การตรวจพบ *PKD2* mutation ในกรณีนี้ถือว่าเป็น pre-symptomatic diagnosis ซึ่งจะช่วยให้สมาชิก ครอบครัวผู้นี้ดูแลสุขภาพแต่เนิ่นๆ เพื่อชะลอหรือบรรเทาอาการแสดงของโรค รวมทั้ง สามารถใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนชีวิตได้



ภาพที่ 53. การตรวจ c.2407C>T (p.R803X) ใน exon 13 ของยีน *PKD2* ในครอบครัว PK046 จากการที่ DHPLC elution profile ของ PCR product ส่วนที่ครอบคลุม exon 13 ของยีน *PKD2* ในผู้ป่วย PK046 ต่างจาก normal control อย่างชัดเจน (score เป็น +2) ที่อุณหภูมิของ DHPLC column เป็น 60.1°C จึงได้ใช้ DHPLC condition ดังกล่าวในการตรวจ DNA ของสมาชิกครอบครัวนี้แบบรวดเร็ว และพบว่าจากสมาชิกครอบครัวทั้งหมด 8 คน มีผู้ที่มี R803X ในยีน *PKD2* จำนวน 4 คน (รวมตัวผู้ป่วยที่เป็น proband ซึ่งเสียชีวิตแล้วด้วย) ซึ่งทุกคนที่ถูกตรวจพบ R803X เป็นผู้ที่แสดงอาการของโรค PKD2 (II-1, II-4 และ II-6) เป็นการยืนยันว่า R803X เป็นสาเหตุของโรค PKD2 ในครอบครัวนี้ เช่นเดียวกับครอบครัว PK037 และ PK096

บทวิจารณ์โดยรวมและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ตรวจพบ definite mutations, indeterminate variants และ polymorphisms ทั้งในยีน *PKD1* และ *PKD2* จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทย 70 ครอบครัวดังสรุปไว้ในตารางที่ 7-13

ตารางที่ 7. สรุปผลการตรวจพบ definite mutations, indeterminate variants และ polymorphisms ทั้งในยีน *PKD1* และ *PKD2* จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทย 70 ครอบครัวและอัตราการตรวจพบในงานวิจัยนี้

Mutation Classifications	<i>PKD1</i> gene	<i>PKD2</i> gene	Both <i>PKD1</i> and <i>PKD2</i>
Definite Mutations	23 Mutations (27 Families = 38.6%) – 9 Nonsense mutations (6 novel, 3 reported) – 3 Splicing Defect (2 novel, 1 reported) – 4 Frame-shift Deletions (2 novel, 2 reported) – 2 In-frame Deletions (novel) – 3 Frame-shift Insertions (2 novel, 1 reported) – 1 In-frame Ins/del (novel) – 1 Missense (reported)	6 Mutations (11 Families = 15.7%) – 4 Nonsense mutations (4 reported) – 1 Splicing Defect (novel) – 1 Frame-shift Deletion (novel)	Definite Mutations = 29 Mutations (38 Families = 54.3%)
Indeterminate Variants	22 Variants (21 Families = 30.0%) – 22 Missense variants (19 novel, 3 reported)	4 Variants (5 Families = 7.1%) – 4 Missense variants (3 novel, 1 reported)	Indeterminate Variants = 26 Variants (26 Families = 37.1%)
Detection Rate for Mutations + Indeterminate Variants	68.6% of cases (48/70)	22.9 % of cases (16/70)	91.4 % of cases (64/70)

งานวิจัยนี้ได้ใช้เกณฑ์การจัดกลุ่มการกลายพันธุ์ (mutation classification) โดยที่ definite mutations หมายถึง nonsense mutations, frameshifting deletions, insertions หรือ indels, typical splicing mutations, และ in-frame changes ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคได้อย่างแน่นอน รวมถึง missense mutations ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนแล้วว่าเป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วย ADPKD

ส่วน indeterminate variants หมายถึง probable pathogenic mutations กล่าวคือ missense mutations ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนในผู้ป่วย ADPKD แต่ยังไม่แน่ใจว่าเป็นสาเหตุของโรค และรวมถึง missense mutations ที่ค้นพบใหม่ในงานวิจัยนี้ และถูกทำนายว่าเป็น possibly/probably damaging หรือ disease causing

ตารางที่ 8. Definite mutations ที่ตรวจพบในยีน *PKD1* จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้
(23 *PKD1* mutations in 27 ADPKD Families)

ADPKD Family	Mutation Nomenclature		Location	Effect on Polycystin-1	Protein domain	Mutation Type	Remarks
	gDNA	cDNA					
PK035	g.23367A>T (IVS13-2A>T)	c.3161-2A>T (Del 74 nt in ex 14)	IVS13	p.L1054fs	PKD repeat 5	Splicing Defect	Thongnopphakum <i>et al</i> 2000, (38) Burtey <i>et al</i> 2002 (65)
PK149	g.26848C>T	c.3202C>T	Exon14	p.Q1068X	PKD repeat 5	Nonsense	Athena Diagnostics (Unpublished)
PK012	g.24401G>A	c.3729G>A	Exon 15b	p.W1243X	PKD repeat 7	Nonsense	Novel
PK025	g.25119C>T	c.4447C>T	Exon 15d	p.Q1484X	PKD repeat 10	Nonsense	Novel
PK089	g.28905_28906 insT	c.4795_4796insT	Exon 15e	p.Y1599Lfs	PKD repeat 11	Insertion, Frame-shift	Novel
PK123	g.29098delCCT	c.4988delCCT	Exon 15f	p.S1663del	PKD repeat 12	Deletion, In-frame	Novel
PK003 (PK115)	g.30488delTTC	c.6379delTTC	Exon 15i	p.S2127Qfs	PKD repeat 17	Deletion, Frame-shift	Novel
PK007	g.30837delAG	c.6730_6731delAG	Exon 15j	p.S2244fs16X	REJ	Deletion, Frame-shift	Yu <i>C et al</i> 2011 (66)
PK137	g.30861delTGG	c.6752delTGG	Exon 15j	p.V2251del	REJ	Deletion, In-frame	Novel
PK151	g.31022delCA	c.6913_6914delCA	Exon 15j	p.Q2305fs113X	REJ	Deletion, Frame-shift	Athena Diagnostics (Unpublished)
PK036 PK152	g.27889ins7	c.7000_c.7001ins7 (GCTGGCG)	Exon 16	p.V2334fs	REJ	Insertion, Frame-shift	Rossetti <i>et al</i> 2001 (60)
PK093	g.33411G>T	c.7863+1G>T	IVS20	p.R2568Sfs33X	REJ	Splicing Defect	Novel
PK072	g.44241C>G	c.10718C>G	Exon 36	p.S3573X	TM3	Nonsense	Novel
PK124	g.49021T>C	c.11176T>C	Exon 39	p.W3726R	Topological domain	Missense	Reed <i>et al.</i> 2008 (67)
PK030 PK125	g.6044_46081del insAGTCC	c.11348_11385del insAGTCC	Exon 40	p.V3783_W3795 delinsES	Topological domain	Ins/Del, In-Frame	Novel
PK099	g.49529C>G	c.11393C>G	Exon 40	p.S3798X	Topological domain	Nonsense	Novel
PK121	g.50417A>G	c.11713-2A>G	Intron 42	p.V3847Cfs40X	TM7	Splicing defect	Novel
PK016 PK065	g.47074G>A	c.11807G>A	Exon 43	p.W3936X	Topological domain	Nonsense	Novel
PK090	g.50905C>T	c.12124C>T	Exon 44	p.Q4042X	TM10	Nonsense	Daniells <i>et al</i> 1998 , Badenas <i>et al</i> 1999 , Bogdanova <i>et al</i> 2000, Zhang <i>et al</i> 2005 (68-71)
PK133	g.51052T>A	c.12188T>A	Exon 45	p.L4063X	Topological domain	Nonsense	Novel
PK022	g.51115_51116 insTGTCAACC	c.12251_12252ins TGTCAACC	Exon 45	p.L4085Vfs	Topological domain	Insertion, Frame-shift	Novel
PK085 PK146	g.51433delC	c.12479delC	Exon 46a	p.4160Rfs	Topological domain	Deletion, Frame-shift	Novel
PK044	g.48239C>T	c.12724C>T	Exon 46b	p.Q4242X	Coiled coil	Nonsense	Stekrova <i>J et al</i> 2009 (72) Hoefele <i>J et al</i> 2010 (73)

ตารางที่ 9. Indeterminate variants ที่ตรวจพบในยีน *PKD1* จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (22 *PKD1* variants in 21 ADPKD Families)

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Family Code	Prediction by PolyPhen-2	Prediction by MutationTaster	PKD Mutation Database (PKDB)	Remarks
c.542T>C	V181A	5a	PK024	Benign	Disease causing	-	Novel
c.1396G>A	V466M	7	PK135- PK139	Probably damaging	Disease causing	Indeterminate	Athena Diagnostics (Unpublished) Rossetti <i>et al.</i> , 2007 (45)
c.1402A>G	I468V	7	PK077	Possibly damaging	Polymorphism	-	Novel
c.1728G>C	M576I	9	PK097	Possibly damaging	Polymorphism	-	Novel
c.2027C>T	P676L	10	PK139	Probably damaging	Polymorphism	-	Novel
c.2081C>A	P694H	10	PK010, PK025	Probably damaging	Disease causing	-	Novel
c.4343C>T	S1448F	15d	PK013	Benign	Disease causing	-	Novel
c.4769C>T	P1590L	15e	PK008	Probably damaging	Disease causing	-	Novel
c.5588C>A	S1863Y	15g	PK102	Probably damaging	Polymorphism	-	Novel
c.6779T>G	I2260S	15j	PK088	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.6785G>A	G2262D	15j	PK088	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.7013T>C	F2338S	16	PK156	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.7138G>A	E2380K	17	PK102	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.7810G>A	D2604N	20	PK135	Probably Damaging	Disease causing	Indeterminate	Phakdeekitcharoen <i>et al.</i> , 2000 (34)
c.8279T>A	M2760K	23a	PK100	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.8744A>G	N2915S	23b	PK001, PK041	Possibly Damaging	Disease causing	-	Novel
c.9463G>A	D3155N	27	PK027	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.9685C>A	L3229M	28	PK088	Possible damaging	Polymorphism	-	Novel
c.10652C>T	P3551L	36	PK111	Probably damaging	Disease causing	-	Novel
c.10973A>G	K3658R	37	PK041	Benign	Polymorphism	Indeterminate	Tsuchiya <i>et al.</i> , 2001 (71) Zhang <i>et al.</i> , 2005 (74)
c.11969T>G	L3990R	43	PK108	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel
c.12706G>T	V4236F	46b	PK059	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel

ตารางที่ 10. **Definite mutations** ที่ตรวจพบในยีน **PKD2** จากผู้ป่วย **ADPKD** ชาวไทยในงานวิจัยนี้
(6 **PKD2** mutations in 11 **ADPKD** Families)

ADPKD Family	Mutation Nomenclature		Location	Effect on Polycystin-2	Protein domain	Mutation Type	Remarks
	gDNA	cDNA					
PK128 PK138	g.11879C>A (TAC>TAA)	c.681C>A	Exon 2	p.Y227X	TM1	Nonsense	Chang <i>et al</i> , 2005 (75)
PK083 PK145	g.30677C>T (CGA>TGA)	c.916C>T	Exon 4	p.R306X	Topological domain	Nonsense	Veldhuisen <i>et al</i> 1997, Reiterova <i>et al</i> 2002, Magistroni <i>et al</i> 2003, Stekrova <i>et al</i> 2004, Vouk <i>et al</i> 2006, Rossetti <i>et al</i> 2007, Garcia-Gonzalez 2007 (41, 45, 76-80)
PK103	g.30719C>T (CGA>TGA)	c.958C>T	Exon 4	p.R320X	Topological domain	Nonsense	Reynolds <i>et al</i> 1999 (81) Rossetti <i>et al</i> 2007 (45)
PK037 PK046 PK073 PK096	g.60300C>T (CGA>TGA)	c.2407C>T	Exon 13	p.R803X	EF hand & coiled-coil Linker	Nonsense	Deltas <i>et al</i> 2001, Zhang <i>et al</i> 2005, Chung <i>et al</i> 2006 (47, 48, 71)
PK143	g.60412delAA GTG	c.2519del AAGTG	Exon 13	p.Q840Lfs2X	Coiled coil	Deletion, Frame-shift	Novel
PK006	g.67165G>C (IVS13-1G>C)	c.2522-1G>C	IVS 13	p.V841fs (Ex 14 skipping)	Coiled coil	Splicing Defect	Novel

ตารางที่ 11. **Indeterminate variants** ที่ตรวจพบในยีน **PKD2** จากผู้ป่วย **ADPKD** ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (4 **PKD2** variants in 5 **ADPKD** Families)

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Family Code	Prediction by PolyPhen-2	Prediction by MutationTaster	PKD Mutation Database (PKDB)	Remarks
c.83G>C	R28P	1	PK057	Possibly damaging	Polymorphism	Neutral	Reiterova <i>et al</i> . 2002, (77) CRISP Consort. (Unpublished)
c.361G>T (GGC>TGC)	G121C	1b	PK129, PK149	Probably damaging	Polymorphism	-	Novel
c.1546G>T (GTG>TTG)	V516L	4	PK141	Benign	Disease causing	-	Novel
c.1765A>T (ACC>TCC)	T589S	8	PK117	Probably Damaging	Disease causing	-	Novel

ตารางที่ 12. Polymorphisms ที่พบในยีน *PKD1* จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (90 SNPs)

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Family Code	PKD Mutation Database (PKDB)	Reference
c.288-90A>G	-	IVS2	PK098	-	This study
c.288-32A>G	-	IVS2	PK003, PK023, PK028, PK047	Neutral	CRISP Consortium (Unpublished)
c.288-11G>C	-	IVS2	PK003, PK023, PK028, PK047, PK098	Neutral, IVS silent	CRISP Consortium (Unpublished)
c.360-5T>C	-	IVS3	PK001, PK139, PK143	Unclassified	Athena Diagnostics (Unpublished)
c.674C>T	S225L	Ex 5a	PK003 (PK015)	Prob Dam/ Poly	This study
c.934G>C	A312P	Ex5(b)	PK021, PK024, PK029, PK034, PK047, PK050	-	This study
c.1021G>A	A341T	Ex5(b)	PK021, PK024, PK029, PK034, PK037*, PK047, PK050, PK075	-	This study
c.1119C>T	L373L	Ex5(b)	PK016*, PK027, PK036*, PK092, PK095, PK104, PK106, PK107	Neutral	Reported SNP
c.1248C>T	N416N	Ex6	PK007	-	This study
c.1310A>G	Q437R	Ex6	PK007, PK037*	-	This study
c.1327G>A	A443T	Ex6	PK037*	-	This study
c.1396G>A	V466M	Ex7	PK006*, PK112*	Indeterminate	Reported SNP
c.1402A>G	I468V	Ex7	PK077	-	This study
c.1515C>T	A505A	Ex7	PK135, PK139	Likely Neutral	This study
c.1598A>G	Q533R	Ex7	PK006*, PK112	-	This study
c.1602C>T	P534P	Ex7	PK006*, PK112	Neutral	This study
c.1606+63C>T	-	IVS8	PK119	-	This study
c.1850-4A>G	-	IVS9	PK106, PK139	Likely Neutral	Reported SNP
c.1978T>C	C660R	Ex10	PK128 (PKD2+)	-	This study
c.2039A>T	Y680F	Ex10	PK123	Likely Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished) Reported SNP
c.2216G>A	R739Q	Ex11(a)	PK018 (homo), PK027	-	rs40433
c.2350T>C	L784L	Ex11(a)	PK018	-	This study
c.2367A>G	G789G	Ex11(a)	PK018	-	This study
c.2986-15C>T	-	IVS12	PK001, PK014, PK018, PK028, PK037, PK105, PK106, PK131	Neutral	Reported 2 times
c.3161-18C>G	-	IVS13	PK021	-	This study
c.3275T>C	M1092T	Ex14	PK021	-	Reported 6 times
c.3288T>C	A1096A	Ex14	PK080	Neutral	This study
c.3444G>A	P1148P	Ex15(a)	PK094	-	Reported SNP
c.3495C>T	D1165D	Ex15(a)	PK118	-	This study
c.4053G>T	R1351R	Ex15c	PK094	Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished)
c.4071G>A	L1357L	Ex15c	PK106	Neutral	Reported many times
c.4674G>A	T1558T	Ex15(e)	PK103	Neutral	Reported many times
c.6984G>A	G2328G	Ex16	PK089	Neutral	This study
c.7020G>C	L2340L	Ex16	PK089	Neutral	This study
c.7077G>C	R2359R	Ex17	PK102	Neutral	Reported many times, rs4018162
c.7165T>C	L2389L	Ex17	PK102	Neutral	Reported 5 times rs2457533
c.7753A>G	T2585A	Ex20	PK121	-	This study
c.8087T>G	L2696P	Ex22	PK003	Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished) Reported 2 times

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Family Code	PKD Mutation Database (PKDB)	Reference
c.8160+21T>C	-	IVS22	PK003	Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished) Reported 2times
c.8556A>G	A2852A	Ex23(b)	PK010	-	This study
c.8681_8689del9 (CCAACTCCG)	2894_2896 delANS	Ex23(b)	PK003, PK010, PK018	Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished) Reported 3 times
c.8948+11C>T	-	IVS24	PK115, PK130, PK138	Likely Neutral	Reported SNP
c.9201-20C>T	-	IVS25	PK099	-	This study
c.9201-7C>T	-	IVS25	PK099	-	This study
c.9207G>A	P3069P	Ex26	PK099	-	This study
c.9319C>T	R3107C	Ex26	PK099	-	This study (Poss Dam/Poly)
c.9330T>C	P3110P	Ex26	PK099	Neutral	Reported many times
c.9397+12A>G	-	IVS26	PK099	Likely Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished)
c.9492C>T	S3164S	Ex27	PK018	-	This study
c.9506G>A	R3169Q	Ex27	PK018	Neutral	Reported SNP
c.9558C>T	H3186H	Ex27	PK027	-	This study
c.9568+3T>C	-	IVS27	PK018	-	This study
c.9568+7G>A	-	IVS27	PK018	-	This study
c.9568+39C>T	-	IVS27	PK018	-	This study
c.9569-13T>C	-	IVS27	PK018	Likely Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished) CRISP Consortium (Unpublished) Reported 4 times
c.9598G>A	V3200I	Ex28	PK018	-	This study
c.9631G>A	A3211T	Ex28	PK018	Neutral	CRISP Consortium (Unpublished)
c.9712+16A>G	-	IVS28	PK018	-	This study
c.9712+19G>T	-	IVS28	PK010	-	This study
c.9714C>T	S3238S	Ex29	PK003, PK007, PK010	-	This study
c.9715G>C	D3239H	Ex29	PK003, PK007, PK010	-	This study
c.9726T>G	L3242L	Ex29	PK007, PK010	-	This study
c.9820C>T	R3274C	Ex29	PK003, PK007, PK010, PK077	-	This study (Poss Dam/ Dis)
c.9854T>A	V3285D	Ex29	PK003, PK007, PK010	-	This study
c.9909C>A	G3303G	Ex29	PK003, PK007, PK010	-	Rs2855354, Thongnoppakhun <i>et al</i> 2004 (40)
c.9923+22G>A	-	IVS29	PK007, PK010	-	This study
c.9932A>G	H3311R	Ex30	PK007, PK019	Neutral	Phakdeekitcharoen <i>et al</i> 2001 (61)
c.9947G>A	S3316N	Ex30	PK007, PK019	-	Thongnoppakhun <i>et al</i> 2004 (40)
c.10023T>C	L3341L	Ex30	PK007, PK010, PK019	Neutral	Phakdeekitcharoen <i>et al</i> 2001 (61)
c.10325C>T	A3442V	Ex33	PK018	-	This study
c.10499+10C>T		IVS34	PK121	Likely Neutral	This study
c.10529C>T	T3510M	Ex35	PK001, PK005, PK032, PK051, PK068, PK072*, PK075, PK087, PK090, PK098, PK133	Neutral	rs45478794 CRISP Consortium (Unpublished) Reported many times
c.10619-13delT	-	IVS35	PK067	Neutral	Reported SNP
c.10678G>A	G3560R	Ex36	PK073	Likely Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished) Reported 2 times (Prob Dam/Poly)
c.10801C>T	L3601F	Ex36	PK012, PK086	Likely Neutral	This study

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Family Code	PKD Mutation Database (PKDB)	Reference
c.10821+61_+65del C	-	Ex36	PK094, PK098, PK103	Likely Neutral	This study
c.10973A>G	K3658R	Ex37	PK041	Indeterminate	Reported 2 times
c.11016G>A	R3672R	Ex37	PK001	Likely Neutral	This study
c.11246T>C	L3749P	Ex39	PK089	Highly Likely Pathogenic	Athena Diagnostics (Unpublished)
c.11272C>G	L3758V	Ex40	PK065, PK016*	-	This study
c.11319A>G	A3773A	Ex40	PK102	Likely Neutral	This study
c.11363C>G	P3788R	Ex40	PK051	-	This study
c.11537+20C>T (IVS41+20C>T)	-	IVS41	PK007	Likely Neutral	Reported SNP
c.11616G>A	E3872E	Ex42	PK003, PK068	Neutral	Reported 2 times
c.12004-5C>A (IVS43-5C>A)	-	IVS43	PK106	Likely Neutral	This study
c.12133A>G	I4045V	Ex44	PK106	Likely Neutral	Reported 4 times CRISP Consortium (Unpublished)
c.12276A>G	A4092A	Ex45	PK019, PK106	Likely Neutral	Reported 4 times CRISP Consortium (Unpublished) (rs3087632)
c.12313A>C	I4105L	Ex45	PK061, PK111	-	This study
c.12399C>T	F4133F	Ex45	PK116	-	This study
c.12666G>A	L4222L	Ex46(b)	PK059	Neutral	CRISP Consortium (Unpublished)

ตารางที่ 13. Polymorphisms ที่พบในยีน *PKD2* จากผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยในงานวิจัยนี้ (9 SNPs)

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Family Code	PKD Mutation Database (PKDB)	Reference
c.83G>C	p.R28P	1a	PK057 PK098	Likely Neutral	CRISP Consortium (Unpublished) Reported 2 times
c.420G>A	p.G140G	1b	PK046 PK095 PK097 PK100	Likely Neutral	CRISP Consortium (Unpublished) Reported 2 times
c.568G>A	p.A190T	1c	PK077 PK012 PK036	Likely Neutral	Athena Diagnostics (Unpublished)
c.595+15C>T	-	1c	PK077	IVS silent	This study
c.894-22 G>A	-	4	PK083	IVS silent Likely Neutral	This study
c.1354A>G	p.I452V	6	PK093 PK141	Likely Neutral	Reported 3 times
c.2139C>T	p.V713V	11	PK102	Likely Neutral	This study
c.2163C>T	p.T721T	Ex11(a)	PK118	-	This study
g.68098A>G	-	Ex15	PK090	-	This study

ตามตารางที่ 8-13 จะเห็นได้ว่าการกลายพันธุ์ของทั้งยีน *PKD1* และ *PKD2* อยู่กระจายไปทั่วทั้งยีน ไม่มีการกระจุกตัวที่ใดโดยเฉพาะ การใช้ DHPLC ในการศึกษาทำให้ได้อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์รวมทั้งสองยีนถึงร้อยละ 91.4 (64/70) โดยที่เป็น definite mutation ถึงร้อยละ 54.3 (38/70), เป็น indeterminate variant ร้อยละ 37.1 (26/70) (ดูตารางที่ 7) และยังตรวจพบ polymorphism ของทั้งสองยีนอีกเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในยีน *PKD1*

ถ้าพิจารณาในแง่สัดส่วนของการกลายพันธุ์แต่ละประเภทที่พบ (ตามตารางที่ 14) เมื่อนำข้อมูลจากงานวิจัยนี้ไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นที่ทำในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่หลายๆ ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกัน กล่าวคือ Consortium for Radiologic Imaging Study of PKD (CRISP) ADPKD population จำนวน 202 ราย (45) และฐานข้อมูลผู้ป่วย ADPKD จากทุกเชื้อชาติทั่วโลกใน ADPKD: Mutation Database 1,471 ราย (52) ในกรณีของยีน *PKD1* งานวิจัยนี้พบจำนวน nonsense mutations ไม่ต่างจากงานวิจัยอื่นนัก ขณะที่พบ splicing defects และ frame-shift deletions/insertions ได้น้อยกว่างานวิจัยอื่น แต่กลับพบ missense variants สูงกว่าที่อื่นพบเป็นอย่างมาก รวมทั้งพบ in-frame del/ins ค่อนข้างมากกว่าที่อื่น ส่วนกรณีของยีน *PKD2* งานวิจัยนี้กลับพบ nonsense mutations ได้สูงกว่างานวิจัยอื่นเป็นอย่างมาก ส่วนการกลายพันธุ์ประเภทอื่นพบน้อยกว่า

สัดส่วนของการกลายพันธุ์โดยรวมของงานวิจัยนี้ พบที่ยีน *PKD1* เพียง 75.0% (48/64) แต่ที่ยีน *PKD2* พบถึง 25.0% (16/64) ของผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 64 ครอบครัว (ตารางที่ 14) ซึ่งต่างจากสัดส่วนโดยทั่วไปซึ่งของยีน *PKD1* เป็น 85% และยีน *PKD2* เป็น 15% และงานวิจัยนี้นับเป็นการรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *PKD2* เป็นครั้งแรกในผู้ป่วยชาวไทย

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ (mutation detection rate) ในยีน *PKD1* และ *PKD2* จากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นที่ใช้วิธีการเดียวกัน รวมทั้งวิธีการอื่นๆ ที่เป็นเทคโนโลยีล่าสุดที่ใช้กันในปัจจุบัน (ตารางที่ 15) จะเห็นได้ว่า งานวิจัยนี้มีอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* โดยรวมแล้วสูงกว่าของงานวิจัยอื่น แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะ definite mutation จะพบว่ามีต่ำ คือ 54.3% (38/70) เมื่อเทียบกับ 64% (29/45) ของกลุ่ม Rossetti และคณะ (42) ในทางกลับกัน อัตราการตรวจพบ missense variants กลับสูงถึง 37.1% (26/70) ซึ่งสูงกว่า 11% (5/45) ของ Rossetti และคณะ (42) เป็นอย่างมาก อัตราการตรวจพบที่สูงในงานวิจัยนี้จึงได้มาจากส่วนของ missense variants ซึ่งยังมีความไม่แน่นอนอยู่พอสมควรว่าจะเป็นสาเหตุของโรค ADPKD ที่แท้จริงหรือไม่ ต้องการการพิสูจน์เพิ่มเติมต่อไปอีก ซึ่งอยู่นอกเหนือขอบเขตที่งานวิจัยนี้จะสามารถสรุปได้ในขณะนี้

อย่างไรก็ตาม ในแง่ของเทคโนโลยีที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ยังนับว่า DHPLC เป็นเทคนิคที่มีความไวและประสิทธิภาพสูง คุ่มค่า และได้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีการอื่นๆ ที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ จึงเป็นที่นิยมใช้ในงานวิจัยหลายกลุ่มดังยกมาเป็นตัวอย่างในตารางที่ 15 (42, 45, 66, 82) ส่วนวิธี direct sequencing ถึงแม้จะราคาแพงมาก แต่ยังคงถือเป็น gold standard ที่ใช้กันอยู่โดยประยุกต์ใช้ร่วมกับ long-range PCR และ multiplex PCR เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าการใช้ conventional PCR เพียงอย่างเดียว ทำให้สามารถศึกษาผู้ป่วย ADPKD ชาวฝรั่งเศส 700 รายได้ผลเป็นอย่างดี (83)

ปัจจุบัน มีความพยายามของนักวิจัยหลายกลุ่มที่นำเอาเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่อาจมีข้อดีข้อเสียต่างจาก DHPLC และ direct sequencing อาทิ high resolution melt (HRM) analysis (84) และ next-generation DNA sequencing (85, 86) มาใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้เทคโนโลยีให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการที่ใดที่หนึ่งย่อมขึ้นกับปัจจัยหลายด้านที่ต้องพิจารณาเป็นรายๆ ไป

สำหรับผู้ป่วยที่ยังไม่สามารถระบุชนิดการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ได้ในงานวิจัยนี้นั้น อาจเป็นเพราะการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุนั้นเป็นชนิด large deletions ซึ่งไม่ได้ตรวจในงานวิจัยนี้ อีกกรณีหนึ่งอาจเป็นเพราะมีการกลายพันธุ์แบบไม่ปกติ (atypical mutations) เกิดขึ้น เช่น base substitution ที่อยู่นอกบริเวณที่ถูกครอบคลุมในการตรวจ ได้แก่ regulatory elements หรือส่วนของ intron ที่อยู่ไกลออกไปจาก coding region มากๆ ซึ่งอาจเป็น splice enhancers นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้อีกหลายสาเหตุ คือ มียีนอื่นนอกเหนือจากยีน *PKD1* และ *PKD2* เป็นสาเหตุแต่แสดงอาการคล้ายกัน

ตารางที่ 14. สัดส่วนของประเภทการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่ตรวจพบจากงานวิจัยนี้
เปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นที่ทำในประชากรกลุ่มใหญ่ๆ

Gene	Mutation Types	Percentage of Mutations Detected		
		This study	Rossetti <i>et al</i> , 2007 (45)	ADPKD: Mutation Database (52)
<i>PKD1</i>	45 Mutations (48 Families) (48/64 = 75.0%)	48/70 (68.6%)	153/202 (75.7%)	1,471 Families
	– Nonsense mutations	10/48 (20.8%)	38/153 (24.8%)	322/1,471 (21.9%)
	– Splicing Defects	3/48 (6.3%)	16/153 (10.5%)	129/1,471 (8.8%)
	– Frame-shift Deletions Insertions (Del/Ins)	9/48 (18.8%)	49/153 (32.0%)	389/1,471 (26.4%)
	– In-frame Del/Ins	4/48 (8.3 %)	9/153 (5.9%)	110/1,471 (7.5%)
	– Missense variants	22/48 (45.8%)	41/153 (26.8%)	504/1,471 (34.3%)
	– Large deletions	Not Done	Not Done	17/1,471 (1.2%)
<i>PKD2</i>	10 Mutations (16 Families) (16/64 = 25.0%)	16/70 (22.9%)	27/202 (13.4%)	360 Families
	– Nonsense mutations	9/16 (56.2%)	9/27 (33.3%)	127/360 (35.3%)
	– Splicing Defects	1/16 (6.2%)	6/27 (22.2%)	58/360 (16.1%)
	– Frame-shift Del/Ins	1/16 (6.2%)	7/27 (25.9%)	101/360 (28.1%)
	– In-frame Del/Ins	-	2/27 (7.4%)	12/360 (3.3%)
	– Missense variants	5/16 (3.1%)	3/27 (11.1%)	58/360 (16.1%)
<i>PKD1 + PKD2</i> (48+16/64 = 100%)		64/70 (91.4%)	180/202 (89.1%)	-

ตารางที่ 15. อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* จากงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นที่ใช้วิธีการเดียวกันและวิธีการอื่นๆ ที่ใช้กันในปัจจุบัน

Methods	Groups of	Mutation Detection Rate			
References	Mutations/Patients	<i>PKD1</i> gene	<i>PKD2</i> gene	<i>PKD1</i> + <i>PKD2</i>	Total
DHPLC					
This study	- Definite mutation	38.6% (27/70)	15.7% (11/70)	54.3% (38/70)	91.4% (64/70)
	- Indeterminate variants	30.0% (21/70)	7.1% (5/70)	37.1% (26/70)	
	All mutations	68.6% (48/70)	22.9% (16/70)		
Rossetti <i>et al</i> , 2002 (42)	Definite mutation Missense variants	58% (26/45) 11% (5/45)	6% (3/45)	64% (29/45) 11% (5/45)	75% (34/45)
Rossetti <i>et al</i> , 2007 (45)	All mutations	75.7% (153/202)	13.4% (27/202)		89.1% (180/202)
Li J <i>et al</i> , 2011 (82)	All mutations	56% (53/94)	8.5% (8/94)		64.9% (61/94)
Yu <i>et al</i> , 2011 (66)	All mutations	46.1% (30/65)	6.1% (4/65)		52.3% (34/65)
Direct sequencing					
Garcia-Gonzalez <i>et al</i> , 2007 (41)	Class I mutations	29.3% (24/82)	12.2% (10/82)	41.5% (34/82)	78% (64/82)
	Class II mutations	32.9% (27/82)	3.7% (3/82)	36.6% (30/82)	
Hoefele <i>et al</i> , 2011 (87)	All mutations	55.9% (52/93)	8.6% (8/93)		64.5% (60/93)
Audrézet <i>et al</i> , 2012 (83)	Familial ADPKD	75.9% (401/528)	14.8% (78/528)		90.7% (479/528)
	Sporadic ADPKD	73.2% (126/172)	13.9% (24/172)		87.2% (150/172)
High Resolution Melt Analysis					
Bataille <i>et al</i> , 2011 (84)		67.6% (25/37)	8.1% (3/37)		75.7% (28/37)
Next-generation DNA sequencing					
Rossetti S <i>et al</i> , 2012 (85)	All mutations	51.9% (95/183)	10.9% (20/183)		63% (115/183)

ข้อสรุปที่ได้จากงานวิจัยนี้

1. เหตุผลที่โรค ADPKD สมควรมีการตรวจวินิจฉัยทางพันธุศาสตร์เพื่อหาการกลายพันธุ์ในยีนที่เป็นสาเหตุทั้งสองยีน (*PKD1* และ *PKD2*) เนื่องจากเป็นโรคที่พบได้บ่อย, อาการค่อนข้างรุนแรง, มีการปรากฏอาการในอัตราสูง (high penetrance), มีแนวทางดูแลและป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่ได้ผลดี, ให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling) ได้ และมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับ แต่มีข้อโต้แย้งที่ทำให้ไม่นาตรวจอยู่เช่นกัน ได้แก่ อัตราค่าตรวจแพงเพราะยีนขนาดใหญ่และวิธีตรวจยาก, มีชนิดของการกลายพันธุ์ที่หลากหลายจำนวนมาก ไม่สามารถเลือกตรวจแบบเจาะจงได้ และมีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งประมาณร้อยละ 30-40 ที่ยังไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้แน่นอน
2. งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลการกลายพันธุ์ในยีนที่เป็นสาเหตุของโรค ADPKD ทั้งสองยีน คือ *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วยโรค ADPKD ในประเทศไทย ซึ่งจะได้เสนอเข้าไปสมทบกับฐานข้อมูลสากล (Polycystic Kidney Disease Mutation Database, PKDB) ต่อไปเพื่อเป็นการขยายขอบเขตของฐานข้อมูลให้กว้างขวางครอบคลุมกลุ่มประชากรโลกเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ ในส่วนของยีน *PKD1* มีการกลายพันธุ์ที่ถือเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อน (novel mutations) จำนวน 35 ชนิด (ซึ่งเป็น definite mutations 15 ชนิด) กับที่เคยมีรายงานแล้วอีก 11 ชนิด ส่วนของยีน *PKD2* มีการกลายพันธุ์ชนิดที่พบใหม่จำนวน 5 ชนิด (เป็น definite mutation 2 ชนิด) กับที่เคยรายงานแล้วอีก 5 ชนิด ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน *PKD2* เป็นครั้งแรกของประชากรชาวไทย
3. การค้นพบการกลายพันธุ์ชนิด in-frame deletions/insertions และ missense mutations ในยีน *PKD1* จำนวน 26 ชนิด (เป็น novel mutations 23 ชนิด) และในยีน *PKD2* 4 ชนิด (เป็น novel mutations 3 ชนิด) ถือเป็นข้อมูลสำคัญที่อาจแสดงถึงตำแหน่งกรดอะมิโนหรือบริเวณของโปรตีน polycystins ที่มีความสำคัญในการทำหน้าที่ในเซลล์และช่วยให้ความกระจ่างถึงกลไกระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิดถุงน้ำในไตในโรค ADPKD โดยเฉพาะในผู้ป่วยรายที่ชนิดของการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์ไปกับการแสดงของโรค (genotype-phenotype relationship) อย่างชัดเจน ความเข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดโรคนี้สามารถนำไปสู่การป้องกันและรักษาที่ได้ผลดีต่อไปในอนาคต
อย่างไรก็ตาม missense variants จำนวนมากที่พบในงานวิจัยนี้ยังต้องการการตรวจสอบเพิ่มเติมว่าเป็นสาเหตุของโรคจริงหรือไม่ ด้วยข้อจำกัดในแง่สมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยซึ่งไม่สามารถหาช่วยยืนยันได้ และความยากลำบากในการศึกษายีน *PKD1* ที่มีโครงสร้างซ้ำซ้อน การพิสูจน์ missense variants จึงยังทำได้ไม่สมบูรณ์ และให้ถือว่า missense variants เป็น indeterminate variants ไว้ก่อน
4. เมื่อใดก็ตามที่การรักษาโรค ADPKD สามารถทำได้จริงจึงโดยการผลิตยาที่สามารถบรรเทาอาการของโรคอย่างได้ผล เมื่อนั้นต้องมีการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องแม่นยำเสียก่อน เพราะข้อมูลพันธุกรรม (genotype) ของผู้ป่วยจะมีอิทธิพลต่อการตัดสินใจใช้ยานั้นด้วย การตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วยโรค ADPKD จะยิ่งทวีความสำคัญขึ้นอีกมาก สำหรับงานวิจัยนี้ การตรวจพบการ

กลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่เป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วย ADPKD ได้ให้ประโยชน์ด้านการแพทย์แก่ผู้ป่วยและครอบครัว อย่างสำคัญหลายประการ ได้แก่

- สามารถระบุตัวญาติผู้ป่วยที่มีศักยภาพในการบริจาคไต (kidney donors) ให้ผู้ป่วยเพื่อทำการปลูกถ่ายไต (renal transplantation) ได้
- สามารถระบุการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ (*de novo mutations*) ในผู้ป่วยที่ไม่เคยมีประวัติการเป็นโรค ADPKD ในครอบครัวมาก่อน
- สามารถวินิจฉัยโรคแยกจากโรคอื่น (differential diagnosis) ได้อย่างแม่นยำในรายที่อาการไม่ชัดเจน (atypical symptoms) หรือสงสัยว่าจะเป็นโรค ADPKD เพื่อการดูแลรักษาที่ถูกต้อง
- สามารถวินิจฉัยโรคได้ก่อนที่จะมีอาการ (pre-symptomatic diagnosis) ในคนอายุน้อยที่มีประวัติครอบครัวเป็นโรค ADPKD และตรวจพบอาการแทรกซ้อนได้แต่เนิ่นๆ เป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังการเกิดโรค
- สามารถเริ่มให้การรักษาอาการแทรกซ้อนได้เร็ว (early therapeutic interventions) ทำให้ไม่เกิดภาวะไตวาย
- สามารถใช้ข้อมูลสำหรับพยากรณ์โรคในผู้ป่วยและญาติ เนื่องจากมีข้อแตกต่างของการเป็นโรคชนิด *PKD1* หรือ *PKD2*
- ใช้ในการวางแผนครอบครัวเพื่อป้องกันการถ่ายทอดโรคที่ทำให้เกิดโรคซ้ำในรุ่นลูกหลานโดยการรับคำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์จากแพทย์เวชพันธุศาสตร์ ปัจจุบันมีคู่สมรสที่ต้องการเลือกบุตรที่ไม่เป็นโรค ADPKD โดยการขอให้ตรวจวินิจฉัยพันธุกรรมของตัวอ่อนก่อนการฝังตัว (pre-implantation genetic diagnosis, PGD) ซึ่งจะสามารถทำได้ต่อเมื่อทราบชนิดการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* หรือ *PKD2* ที่เป็นสาเหตุของโรคแล้วเท่านั้น

5. งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) ในการศึกษา ยีน *PKD1* และ *PKD2* ซึ่งนับว่า DHPLC เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง มีความไว เชื่อถือได้ ใช้งานได้ สะดวกรวดเร็วแบบกึ่งอัตโนมัติ คุ่มค่ากว่าหลายวิธีที่เคยใช้มาก่อนหน้านี้ มีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งกับการศึกษายีนขนาดใหญ่ๆ ในจำนวน samples มากๆ เช่นในกรณีนี้ ทำให้ได้ข้อมูลจำนวนมากที่นำไปใช้ประโยชน์แก่ผู้ป่วยและสมาชิกครอบครัวได้

6. งานวิจัยนี้ได้พัฒนาแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐาน, คุ่มค่า และมีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ได้ในทางปฏิบัติในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วย ADPKD ซึ่งเหมาะสมกับสภาวะของผู้ป่วยไทยในปัจจุบันได้ระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม แนวทางและวิธีการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองยีนนี้ยังสามารถพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นได้อีกในอนาคต โดยอาศัยเทคนิคอื่นมาช่วยประกอบ ได้แก่ long-range PCR,

multiplex PCR รวมทั้งการใช้ SURVEYOR Nuclease (Transgenomic, USA) (62) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้จะช่วยลดเวลาและแรงงานในการตรวจวิเคราะห์ทั้งสองยีนนี้ลงได้อีก

7. งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายของ DNA polymorphisms ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ของคนไทยเป็นจำนวนมาก กล่าวคือพบ SNPs ในยีน *PKD1* จำนวน 90 ชนิดซึ่งเป็นชนิดที่ค้นพบใหม่ในคนไทย 50 ชนิด และพบ SNPs ในยีน *PKD2* จำนวน 9 ชนิดซึ่งเป็นชนิดที่ค้นพบใหม่ในคนไทย 5 ชนิด SNPs เหล่านี้อาจใช้เป็นฐานข้อมูลในประชากรไทยเพื่อประโยชน์อื่นๆ เช่น ใช้เป็น markers ที่จำเพาะสำหรับยีน *PKD1* และ *PKD2* ในการทำ linkage analysis หรือ haplotype analysis เพื่อวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนกลายพันธุ์ในครอบครัวผู้ป่วย ADPKD ให้แม่นยำและมีประสิทธิภาพมากขึ้น หรือใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทาง molecular evolution study ต่อไป
 8. งานวิจัยนี้ได้สร้างฐานงานวิจัยทางด้านอณูพันธุศาสตร์ของโรค ADPKD ในประเทศไทยไว้ให้มีความต่อเนื่อง ทันต่อยุคสมัยแห่งการเปลี่ยนแปลง และเตรียมรองรับเทคโนโลยีใหม่ที่จะช่วยให้การตรวจวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ของโรคนี้มีประสิทธิภาพสูงสุด อนึ่ง เนื่องจากยีน *PKD1* เป็นยีนที่พบบ่อยเป็นอย่างมากหลายประการดังได้กล่าวไว้ในงานวิจัยนี้ การศึกษายีนนี้จึงถือเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษายีนอื่นๆ ได้เป็นอย่างดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์สำหรับโรคพันธุกรรมอื่นๆ ได้
-

หนังสืออ้างอิง (References)

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. Grantham JJ: **Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease.** *N Engl J Med* 2008, **359**(14):1477-1485.
3. Wilson PD: **Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(10):1868-1873.
4. Torres VE, Harris PC, Pirson Y: **Autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Lancet* 2007, **369**(9569):1287-1301.
5. Peters DJM, Sandkuijl LA: **Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe.** *Contrib Nephrol* 1992, **97**:128-139.
6. 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):881-894.
7. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A *et al*: **PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein.** *Science* 1996, **272**(5266):1339-1342.
8. Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S: **Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Genomics* 1995, **25**(3):733-736.
9. Pei Y, Paterson AD, Wang KR, He 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, **68**(2):355-363.
10. Hateboer N, Lazarou LP, Williams AJ, Holmans P, Ravine D: **Familial phenotype differences in PKD11.** *Kidney Int* 1999, **56**(1):34-40.
11. Milutinovic J, Rust PF, Fialkow PJ, Agodoa LY, Phillips LA, Rudd TG, Sutherland S: **Intrafamilial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Am J Kidney Dis* 1992, **19**(5):465-472.
12. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG: **The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I.** *Cell* 1996, **87**(6):979-987.

13. Koptides M, Hadjimichael C, Koupepidou P, Pierides A, Constantinou Deltas C: **Germinal and somatic mutations in the PKD2 gene of renal cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Hum Mol Genet* 1999, **8**(3):509-513.
14. Burn TC, Connors TD, Dackowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Millholland JM, Venet M, Miller G, Hakim RM, Landes 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**(4):575-582.
15. The International Polycystic Kidney Disease Consortium: **Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein.** *Cell* 1995, **81**(2):289-298.
16. Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, Wu G, Cai Y, Somlo S: **Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2).** *Genomics* 1997, **44**(1):131-136.
17. Ong AC, Harris PC: **Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex.** *Kidney Int* 2005, **67**(4):1234-1247.
18. Harris PC, Rossetti S: **Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Nat Rev Nephrol* 2010, **6**(4):197-206.
19. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM: **The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13**(10):2508-2516.
20. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ *et al*: **Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells.** *Nat Genet* 2003, **33**(2):129-137.
21. 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):447-452.
22. Torres VE, Harris PC: **Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years.** *Kidney Int* 2009, **76**(2):149-168.
23. Braun WE: **Autosomal dominant polycystic kidney disease: emerging concepts of pathogenesis and new treatments.** *Cleve Clin J Med* 2009, **76**(2):97-104.
24. Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J: **Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular analysis.** *Hum Mol Genet* 1995, **4 Spec No**:1745-1749.

25. 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):333-341.
26. Afzal AR, Hand M, Ternes-Pereira E, Saggarr-Malik A, Taylor R, Jeffery S: **Novel mutations in the 3 region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene.** *Hum Genet* 1999, **105**(6):648-653.
27. 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**(1):75-80.
28. Van Raay TJ, Burn TC, Connors TD, Petry LR, Germino GG, Klinger KW, Landes GM: **A 2.5 kb polypyrimidine tract in the PKD1 gene contains at least 23 H-DNA-forming sequences.** *Microb Comp Genomics* 1996, **1**(4):317-327.
29. Loftus BJ, Kim UJ, Sneddon VP, Kalush F, Brandon R, Fuhrmann J, Mason T, Crosby ML, Barnstead M, Cronin L *et al*: **Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q.** *Genomics* 1999, **60**(3):295-308.
30. Peral B, Gamble V, Strong C, Ong AC, Sloane-Stanley J, Zerres K, Winearls CG, Harris PC: **Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach.** *Am J Hum Genet* 1997, **60**(6):1399-1410.
31. 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):126-132.
32. Peters DJ, Ariyurek Y, van Dijk M, Breuning MH: **Mutation detection for exons 2 to 10 of the polycystic kidney disease 1 (PKD1)-gene by DGGE.** *Eur J Hum Genet* 2001, **9**(12):957-960.
33. Thomas R, McConnell R, Whittacker J, Kirkpatrick P, Bradley J, Sandford R: **Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**(1):39-49.
34. Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Ahn C, Whang DY, Burkhart B, Germino GG: **Thirteen novel mutations of the replicated region of PKD1 in an Asian population.** *Kidney Int* 2000, **58**(4):1400-1412.
35. Afzal AR, Jeffery S: **Amplification of a 13.5-kb region of the PKD1 gene containing the 2.5-kb polypyrimidine tract in intron 21 facilitates mutation detection in this gene.** *Genet Test* 2001, **5**(1):57-59.

36. Watnick TJ, Piontek KB, Cordal TM, Weber H, Gandolph MA, Qian F, Lens XM, Neumann HP, Germino GG: **An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of PKD1 is revealed by use of a novel strategy for mutation detection.** *Hum Mol Genet* 1997, **6**(9):1473-1481.
37. Peltola P, Lumiaho A, Miettinen R, Pihlajamaki J, Sandford R, Laakso M: **Genetics and phenotypic characteristics of autosomal dominant polycystic kidney disease in Finns.** *J Mol Med* 2005, **83**(8):638-646.
38. 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.
39. Perrichot R, Mercier B, Quere I, Carre A, Simon P, Whebe B, Cledes J, Ferec C: **Novel mutations in the duplicated region of PKD1 gene.** *Eur J Hum Genet* 2000, **8**(5):353-359.
40. Thongnoppakhun W, Limwongse C, Vareesangthip K, Sirinavin C, Bunditworapoom D, Rungroj N, Yenchitsomanus PT: **Novel and de novo PKD1 mutations identified by multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism (MRF-SSCP).** *BMC Med Genet* 2004, **5**:2.
41. Garcia-Gonzalez MA, Jones JG, Allen SK, Palatucci CM, Batish SD, Seltzer WK, Lan Z, Allen E, Qian F, Lens XM *et al*: **Evaluating the clinical utility of a molecular genetic test for polycystic kidney disease.** *Mol Genet Metab* 2007, **92**(1-2):160-167.
42. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggar-Malik A, Winearls CG, Torres VE, Harris PC: **A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC.** *Kidney Int* 2002, **61**(5):1588-1599.
43. O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P: **Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection.** *Genomics* 1998, **52**(1):44-49.
44. Xiao W, Oefner PJ: **Denaturing high-performance liquid chromatography: A review.** *Hum Mutat* 2001, **17**(6):439-474.
45. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, Torres VE, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Bennett WM, Meyers CM, Walker DL, Bae K *et al*: **Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease.** *J Am Soc Nephrol* 2007, **18**(7):2143-2160.

46. Dai B, Mei CL: **Research on autosomal dominant polycystic kidney disease in China.** *Chin Med J (Engl)* 2006, **119**(22):1915-1924.
47. Deltas CC: **Mutations of the human polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene.** *Hum Mutat* 2001, **18**(1):13-24.
48. Chung W, Kim H, Hwang YH, Kim SY, Ko AR, Ro H, Lee KB, Lee JS, Oh KH, Ahn C: **PKD2 gene mutation analysis in Korean autosomal dominant polycystic kidney disease patients using two-dimensional gene scanning.** *Clin Genet* 2006, **70**(6):502-508.
49. Ariyurek Y, Lantinga-van Leeuwen I, Spruit L, Ravine D, Breuning MH, Peters DJ: **Large deletions in the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene.** *Hum Mutat* 2004, **23**(1):99.
50. Watnick TJ, Gandolph MA, Weber H, Neumann HP, Germino GG: **Gene conversion is a likely cause of mutation in PKD1.** *Hum Mol Genet* 1998, **7**(8):1239-1243.
51. Gout AM, Ravine D, Harris PC, Rossetti S, Peters D, Breuning M, Henske EP, Koizumi A, Inoue S, Shimizu Y *et al*: **Analysis of published PKD1 gene sequence variants.** *Nat Genet* 2007, **39**(4):427-428.
52. Gout AM, Martin NC, Brown AF, Ravine D: **PKDB: Polycystic Kidney Disease Mutation Database--a gene variant database for autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Hum Mutat* 2007, **28**(7):654-659.
53. Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millan JL, Zerres K, Barratt TM, Ozen S, Torres VE, Bergstralh EJ *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):1230-1237.
54. Rossetti S, Chauveau D, Kubly V, Slezak JM, Saggarr-Malik AK, Pei Y, Ong AC, Stewart F, Watson ML, Bergstralh EJ *et al*: **Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype.** *Lancet* 2003, **361**(9376):2196-2201.
55. Hateboer N, Veldhuisen B, Peters D, Breuning MH, San-Millan JL, Bogdanova N, Coto E, van Dijk MA, Afzal AR, Jeffery S *et al*: **Location of mutations within the PKD2 gene influences clinical outcome.** *Kidney Int* 2000, **57**(4):1444-1451.
56. Lantinga-van Leeuwen IS, Leonhard WN, Dauwerse H, Baelde HJ, van Oost BA, Breuning MH, Peters DJ: **Common regulatory elements in the polycystic kidney disease 1 and 2 promoter regions.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**(5):649-659.
57. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N, Flask CA, Novick AC, Goldfarb DA, Kramer-Zucker A *et al*: **The mTOR pathway is regulated by polycystin-**

- 1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(14):5466-5471.
58. Walz G: **Therapeutic approaches in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): is there light at the end of the tunnel?** *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**(7):1752-1757.
 59. Rungroj N, Thongnoppakhun 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):1308-1316.
 60. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, Burton S, Sneddon V, Peral B, Roy S, Bakkaloglu A, Komel R, Winearls CG *et al*: **Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications.** *Am J Hum Genet* 2001, **68**(1):46-63.
 61. 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):955-963.
 62. Tan YC, Blumenfeld JD, Anghel R, Donahue S, Belenkaya R, Balina M, Parker T, Levine D, Leonard DG, Rennert H: **Novel method for genomic analysis of PKD1 and PKD2 mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Hum Mutat* 2009, **30**(2):264-273.
 63. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nat Methods* 2010, **7**(4):248-249.
 64. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D: **MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.** *Nat Methods* 2010, **7**(8):575-576.
 65. Burtey S, Lossi AM, Bayle J, Berland Y, Fontes M: **Mutation screening of the PKD1 transcript by RT-PCR.** *J Med Genet* 2002, **39**(6):422-429.
 66. Yu C, Yang Y, Zou L, Hu Z, Li J, Liu Y, Ma Y, Ma M, Su D, Zhang S: **Identification of novel mutations in Chinese Hans with autosomal dominant polycystic kidney disease.** *BMC Med Genet* 2011, **12**:164.
 67. Reed B, McFann K, Kimberling WJ, Pei Y, Gabow PA, Christopher K, Petersen E, Kelleher C, Fain PR, Johnson A *et al*: **Presence of de novo mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease patients without family history.** *Am J Kidney Dis* 2008, **52**(6):1042-1050.

68. Daniells C, Maheshwar M, Lazarou L, Davies F, Coles G, Ravine D: **Novel and recurrent mutations in the PKD1 (polycystic kidney disease) gene.** *Hum Genet* 1998, **102**(2):216-220.
69. Badenas C, Torra R, San Millan JL, Lucero L, Mila M, Estivill X, Darnell A: **Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene.** *Kidney Int* 1999, **55**(4):1225-1233.
70. Bogdanova N, McCluskey M, Sikmann K, Markoff A, Todorov V, Dimitrakov D, Schiavello T, Thomas M, Kalaydjieva L, Dworniczak B *et al*: **Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene in 41 Bulgarian and Australian kindreds reveals a prevalence of protein truncating mutations.** *Hum Mutat* 2000, **16**(2):166-174.
71. Zhang S, Mei C, Zhang D, Dai B, Tang B, Sun T, Zhao H, Zhou Y, Li L, Wu Y *et al*: **Mutation analysis of autosomal dominant polycystic kidney disease genes in Han Chinese.** *Nephron Exp Nephrol* 2005, **100**(2):e63-76.
72. Stekrova J, Reiterova J, Svobodova S, Kebrdlova V, Lnenicka P, Merta M, Viklicky O, Kohoutova M: **New mutations in the PKD1 gene in Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease.** *BMC Med Genet* 2009, **10**:78.
73. Hoefele J, Mayer K, Scholz M, Klein HG: **Novel PKD1 and PKD2 mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD).** *Nephrol Dial Transplant* 2010, **26**(7):2181-2188.
74. Tsuchiya K, Komeda M, Takahashi M, Yamashita N, Cigira M, Suzuki T, Suzuki K, Nihei H, Mochizuki T: **Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene in Japanese families.** *Mutat Res* 2001, **458**(3-4):77-84.
75. Chang MY, Fang JT, Huang CC, Wu IW, Wu Chou YH: **Mutations of the PKD2 gene in Taiwanese patients with autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Ren Fail* 2005, **27**(1):95-100.
76. Veldhuisen B, Saris JJ, de Haij S, Hayashi T, Reynolds DM, Mochizuki T, Elles R, Fossdal R, Bogdanova N, van Dijk MA *et al*: **A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2).** *Am J Hum Genet* 1997, **61**(3):547-555.
77. Reiterova J, Stekrova J, Peters DJ, Kapras J, Kohoutova M, Merta M, Zidovska J: **Four novel mutations of the PKD2 gene in Czech families with autosomal dominant polycystic kidney disease.** *Hum Mutat* 2002, **19**(5):573.

78. Magistroni R, He N, Wang K, Andrew R, Johnson A, Gabow P, Dicks E, Parfrey P, Torra R, San-Millan JL *et al*: **Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease**. *J Am Soc Nephrol* 2003, **14**(5):1164-1174.
79. Stekrova J, Reiterova J, Merta M, Damborsky J, Zidovska J, Kebrdlova V, Kohoutova M: **PKD2 mutations in a Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease**. *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**(5):1116-1122.
80. Vouk K, Strmecki L, Stekrova J, Reiterova J, Bidovec M, Hudler P, Kenig A, Jereb S, Zupanic-Pajnic I, Balazic J *et al*: **PKD1 and PKD2 mutations in Slovenian families with autosomal dominant polycystic kidney disease**. *BMC Med Genet* 2006, **7**:6.
81. Reynolds DM, Hayashi T, Cai Y, Veldhuisen B, Watnick TJ, Lens XM, Mochizuki T, Qian F, Maeda Y, Li L *et al*: **Aberrant splicing in the PKD2 gene as a cause of polycystic kidney disease**. *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**(11):2342-2351.
82. Li J, Yu C, Tao Y, Yang Y, Hu Z, Zhang S: **Putative mutation of PKD1 gene responsible for autosomal dominant polycystic kidney disease in a Chinese family**. *Int J Urol* 2011, **18**(3):240-242.
83. Audrezet MP, Cornec-Le Gall E, Chen JM, Redon S, Quere I, Creff J, Benech C, Maestri S, Le Meur Y, Ferec C: **Autosomal dominant polycystic kidney disease: comprehensive mutation analysis of PKD1 and PKD2 in 700 unrelated patients**. *Hum Mutat* 2012, **33**(8):1239-1250.
84. Bataille S, Berland Y, Fontes M, Burtey S: **High Resolution Melt analysis for mutation screening in PKD1 and PKD2**. *BMC Nephrol* 2011, **12**:57.
85. Rossetti S, Hopp K, Sikkink RA, Sundsbak JL, Lee YK, Kubly V, Eckloff BW, Ward CJ, Winearls CG, Torres VE *et al*: **Identification of gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeted resequencing**. *J Am Soc Nephrol* 2012, **23**(5):915-933.
86. Qi XP, Du ZF, Ma JM, Chen XL, Zhang Q, Fei J, Wei XM, Chen D, Ke HP, Liu XZ *et al*: **Genetic diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease by targeted capture and next-generation sequencing: Utility and limitations**. *Gene*. 2012 Dec 21. pii: S0378-1119(12)01590-9. doi: 10.1016/j.gene.2012.12.060. [Epub ahead of print]
87. Hoefele J, Mayer K, Scholz M, Klein HG: **Novel PKD1 and PKD2 mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)**. *Nephrol Dial Transplant* 2011, **26**(7):2181-2188.

Output ที่ได้จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ขณะนี้ยังไม่มี อยู่ระหว่างการเตรียม manuscript โดยมีชื่อเรื่องที่กำลังจะตีพิมพ์ คือ

- Application of DHPLC for molecular analysis of *PKD1* gene in autosomal dominant polycystic kidney disease
- Identification of *PKD2* mutations in Thai ADPKD patients: First report and recurrent mutations

รายชื่อวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่กำลังจะตีพิมพ์ได้ คือ

- Genetics in Medicine หรือ
- Clinical Genetics หรือ
- BMC Medical Genetics หรือ
- Journal of Human Genetics หรือ
- Clinical Nephrology

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) เชิงพาณิชย์

ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ ในสังกัดสถานส่งเสริมการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แห่งเดียวในประเทศไทยที่ให้บริการตรวจวินิจฉัยทางพันธุศาสตร์ของโรค ADPKD สามารถนำเอาแนวทางและวิธีการของ DHPLC analysis ซึ่งมีความคุ้มค่าที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ไปใช้ได้จริงในการปฏิบัติงานเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วย ADPKD ชาวไทยรวมทั้งชาวต่างชาติที่มาขอรับบริการ ได้โดยมีค่าบริการตรวจวิเคราะห์ที่ก่อให้เกิดรายได้เข้าสู่คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

2) เชิงนโยบาย

ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลได้ปรับเปลี่ยนวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วย ADPKD จากวิธีดั้งเดิมที่เคยใช้คือ multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism, MRF-SSCP) มาเป็น DHPLC analysis ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้มาตรฐานได้ผลถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และมีความไวในการตรวจเพิ่มขึ้น

3) เชิงสาธารณะ

มีเครือข่ายความร่วมมือกับแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคไตและแพทย์เวชพันธุศาสตร์ภายในคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลโดยการใช้ผลงานวิจัยนี้ไปช่วยในการดูแลรักษา ผู้ป่วยโรค

ป้องกันการเกิดโรคซ้ำในครอบครัวผู้ป่วย และที่สำคัญคือใช้ในการตัดสินใจในการตัดสินใจเลือกผู้บริจาคไตให้ผู้ป่วยเพื่อปลูกถ่ายไต (renal transplantation) และมีกระแสมความสนใจในการวางแผนชีวิตครอบครัวโดยการขอให้ตรวจวินิจฉัยพันธุกรรมของตัวอ่อนก่อนการฝังตัว (pre-implantation genetic diagnosis, PGD) เพื่อเลือกบุตรที่ไม่เป็นโรค ADPKD

4) เชิงวิชาการ

- มีข้อมูลจากงานวิจัยไปใช้ปรับปรุงพัฒนาเนื้อหาในการเรียนการสอนที่เกี่ยวข้องในเรื่องเกี่ยวกับอณูพันธุศาสตร์ของโรค ADPKD และการใช้เทคโนโลยี DHPLC ในการตรวจวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์
- สร้างนักวิจัยใหม่จากผู้ช่วยวิจัยของโครงการวิจัยนี้ให้มีประสบการณ์การทำงานวิจัยและเขียนผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในระดับสากล

5) อื่น ๆ

A. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- a) Wanna Thongnoppakhun, Duangkamon Bunditworapoom, Manop Pithukpakorn, Kriengsak Vareesangthip, Pa-thai Yenchitsomanus, Chanin Limwongse. Rapid detection of *PKD1* gene mutations causing ADPKD by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) analysis. ใน “บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี หน้า 187.
- b) Thongnoppakhun W, Bunditworapoom D, Pithukpakorn M, Vareesangthip K, Yenchitsomanus P, Limwongse C. First report of *PKD2* mutations in Thai ADPKD patients using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) analysis ใน “บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี หน้า 129.
- c) ดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ, เกรียงศักดิ์ วารีแสงทิพย์, มานพ พิทักษ์ภากร, ชรินทร์ ลิมวงศ์ และ วรรณาทองนพคุณ. การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD ในผู้ป่วยไทย การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ครั้งที่ 19 โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข วันที่ 17-19 สิงหาคม 2554 โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ หน้า 113.

- d) Thongnoppakhun W, Bunditworapoom D, Pithukpakorn M, Vareesangthip K, Yenchitsomanus P, Limwongse C. Molecular Genetic Approach for Detection of *PKD1* and *PKD2* Mutations in Thai Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) Patients. ใน “บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบบรรยาย” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 11 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) วันที่ 19-21 ตุลาคม 2554 ณ โรงแรม ฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท บีช ภูเก็ต หน้า 36.

B. เอกสารประกอบการอบรมระยะสั้นและการประชุมเชิงปฏิบัติการ

วรรณาทองนพคุณ. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ “Molecular and Cellular Biology Workshop 2009” เรื่อง “Genetic mutation/polymorphism analysis using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)” วันที่ 26 พฤษภาคม 2552 ณ. หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

C. กิจกรรมที่เกี่ยวข้อง

- a) เป็นอาจารย์พิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต/ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาอณูชีววิทยา และสาขาชีวภาพการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ราชวิทยาลัยอณูชีววิทยาของโรคพันธุกรรม (อช 601) Molecular genetic diseases (MO601) สอนภาคบรรยายเรื่อง “Polycystic kidney diseases” วันที่ 8 สิงหาคม 2551 และ 4 ธันวาคม 2552 เวลา 8.00-12.00 น. ณ ห้องประชุมภาควิชาชีวเคมี ชั้น 6 อาคารเรียนรวมพรีคลินิก วิทยาศาสตร์ (15) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ
- b) เป็นวิทยากรบรรยาย เรื่อง "Genetic mutation/polymorphism screening and analysis by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)" และสาธิตการใช้เครื่อง DHPLC ในโครงการบรรยายและฝึกอบรมภาคปฏิบัติ "Molecular and Cellular Biology Workshop 2009" ณ หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (ตึกอดุลยเดชวิกรม ชั้น 10) วันที่ 26 พฤษภาคม 2552
- c) เป็น Reviewer ให้ BioMed Central (BMC) Medical Genetics เมื่อ 28 กุมภาพันธ์ - 19 มิถุนายน 2552 (Stekrova J, Reiterova J, Svobodova S, Kebrdlova V, Lnenicka P, Merta M, Viklicky O, Kohoutova M. New mutations in the *PKD1* gene in Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease. BMC Med Genet. 2009 Aug 17;10:78.
- d) เป็นวิทยากรบรรยายและสาธิตการใช้เครื่อง DHPLC ในการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์แก่อาจารย์ และบุคลากรหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 26 ธันวาคม 2552 ณ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

ภาคผนวก (Appendix)

โปสเตอร์และบทคัดย่อเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

- 1) Wanna Thongnoppakhun, Duangkamon Bunditworapoom, Manop Pithukpakorn, Kriengsak Vareesangthip, Pa-thai Yenchitsomanus, Chanin Limwongse. Rapid detection of *PKD1* gene mutations causing ADPKD by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) analysis. ใน “บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี หน้า 187.
- 2) Thongnoppakhun W, Bunditworapoom D, Pithukpakorn M, Vareesangthip K, Yenchitsomanus P, Limwongse C. First report of *PKD2* mutations in Thai ADPKD patients using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) analysis ใน “บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 10 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี หน้า 129.
- 3) ดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ, เกรียงศักดิ์ วารีแสงทิพย์, มานพ พิทักษ์ภากร, ชนินทร์ ลิ้มวงศ์ และ วรรณ ทอนนพคุณ. การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD ในผู้ป่วยไทย การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ครั้งที่ 19 โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข วันที่ 17-19 สิงหาคม 2554 โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ หน้า 113.
- 4) Thongnoppakhun W, Bunditworapoom D, Pithukpakorn M, Vareesangthip K, Yenchitsomanus P, Limwongse C. Molecular Genetic Approach for Detection of *PKD1* and *PKD2* Mutations in Thai Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) Patients. ใน “บทคัดย่อการเสนอผลงานแบบบรรยาย” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 11 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) วันที่ 19-21 ตุลาคม 2554 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี หน้า 36.

บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ แมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9

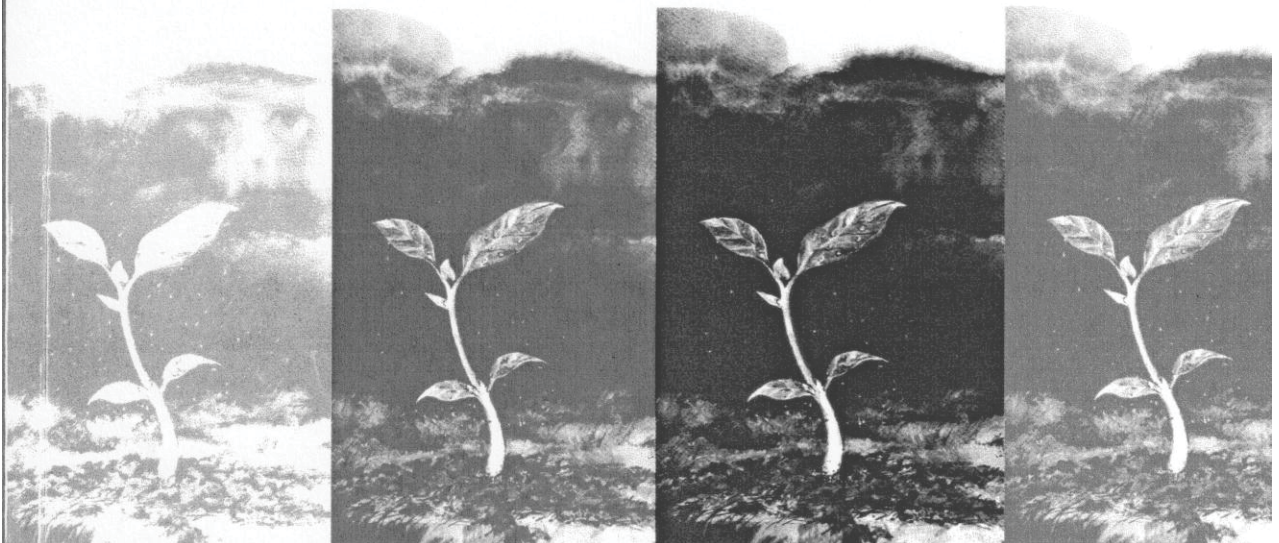
วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552

โรงแรมฮอติเดย์อินน์ ริสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



Rapid Detection of *PKD1* Gene Mutations Causing ADPKD by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) Analysis

Thongnoppakhun, W.^{1*}, Bunditworapoom, D.², Pithukpakorn, M.²,
Vareesangthip, K.³, Yenchitsomanus, P.⁴, Limwongse, C.^{1,2}

¹Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

³Renal Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital

⁴Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Mutations in *PKD1* gene are the major cause of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). The *PKD1* gene is large and complicated, comprising a major (3/4) reiterated area at 3' end (exons 1-33) and a minor (1/4) unique region at 3' end (exons 34-46). A challenge to correctly diagnosing ADPKD is that the sophisticated structure of the *PKD1* gene makes identification of mutations labor intensive, time consuming and expensive. In this study we present the application of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for mutation screening at DNA level in the *PKD1* unique region. The 14 different PCR amplicons in the *PKD1* unique region (exons 34-46) of 11 unrelated ADPKD patients were analyzed by DHPLC across a range of optimum temperatures (59.5-70.0°C) for partial fragment denaturation based on the melting profile of each specific fragment. Mutations were identified by their distinct elution peak patterns (non-wild-type profiles) on the chromatogram and were confirmed by DNA sequencing. Sequencing analysis revealed three different novel *PKD1* mutations in three ADPKD patients: S3573X, W3936X and Q4242X. Our preliminary results show that DHPLC is a fast, sensitive, cost-efficient, and reliable method for the screening of *PKD1* mutations and polymorphisms of large number of samples.

Keywords: denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC, *PKD1* gene, autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD, mutation, mutation detection

*Corresponding author.

Tel: 0-2419-7000 ext. 6633; Fax: 0-2418-3565

E-mail: siwtn@mahidol.ac.th



Rapid Detection of *PKD1* Gene Mutations Causing ADPKD by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) Analysis

Wanna Thongnoppakhun^{1*}, Duangkamon Bunditworapoom², Manop Pithukpakom²,
Kriengsak Vareesangthip³, Pa-thai Yenchitsomanus⁴, Chanin Limwongse^{1,2}

¹ Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, E-mail: siwthn@mahidol.ac.th.

² Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

³ Renal Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

⁴ Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most common monogenic human disease, being found in every ethnic groups with an incidence of 1 in 500-1,000. Its manifestations are the progressive development of renal cysts (Figure 1) and a variety of extrarenal manifestations such as liver cysts, intracranial aneurysms, and cardiac valve defect.

Mutations in *PKD1* gene are the major cause of ADPKD. The *PKD1* gene is large and complicated, comprising a major (3/4) reiterated area at 5' end (exons 1-33) and a minor (1/4) unique region at 3' end (exons 34-46) (Figure 2). A challenge to correctly diagnosing ADPKD is that the sophisticated structure of the *PKD1* gene makes identification of mutations labor intensive, time consuming and expensive.



Figure 1. Normal and polycystic kidneys

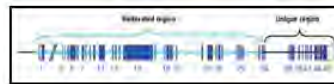


Figure 2. *PKD1* gene structure

Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) has recently emerged as one of the most powerful tools for genetic analysis in a wide variety of diseases with sensitivity and specificity higher than 96%.

This semi-automated method exploits the differential retention, thus different elution profiles of homoduplex and heteroduplex DNA species under partial heat denaturation within a linear acetonitrile gradient (Figure 3).

Any point mutations have been detected successfully by on-line UV or fluorescence detection within 3 minutes in unpurified amplicons. DHPLC has been used in mutation detection of *PKD1* gene with a maximal detection rate of 76%.

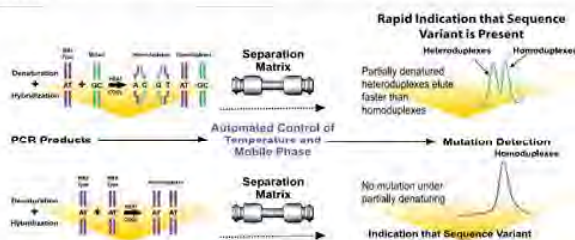


Figure 3. Principle of mutation detection by DHPLC (<http://www.transgenomic.com>)

In this study we present the application of DHPLC for mutation screening at DNA level in the *PKD1* unique region. The primary objective was to establish a rapid, sensitive and cost-effective method for screening of *PKD1* mutations for Thai population.

METHODS

- DNA was extracted from blood samples of 11 unrelated ADPKD patients.
- Fourteen PCR amplicons, size range from 219-472 bp, were designed to cover the *PKD1* unique region (exons 34-46).
- In the PCR reactions, Phusion® Taq Polymerase (Qiagen) with proofreading activity was used to produce high fidelity PCR products.
- The PCR amplicons were analyzed by DHPLC using a Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System (Transgenomic) across a range of optimum temperatures (59.5-70.0°C) for partial fragment denaturation based on the melting profile of each specific fragment.
- For those PCR-fragments showing different DHPLC-elution profiles, we confirmed the nucleotide change responsible for the variation through direct sequencing.

RESULTS

We found 3 distinct elution peak patterns (non-wild-type profiles) on the DHPLC chromatograms from 3 unrelated ADPKD patients. The mutations were identified by DNA sequencing analysis which revealed the presence of 3 novel nonsense mutations in the *PKD1* gene: S3573X, W3936X and Q4242X (Table 1).

Table 1. *PKD1* mutations detected in this study.

Family	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Elution peak		Sequencing result
				Normal	Mutant	
PKX 01	36	c.10718C>G (TCA>TGA)	S3573X			
PKX 02	43	c.11807G>A (TGA>TAG)	W3936X			* Reversed sequence
PKX 03	46b	c.12724C>T (CAG>IAG)	Q4242X			

DHPLC was also used as a direct detection method for a nonsense mutation, Q4242X in 13 available family members of PKX 03 as shown in Figure 4. Besides the proband (II-7), additional 3 members also carry Q4242X (as having the same "2-peaks patterns" like the proband).

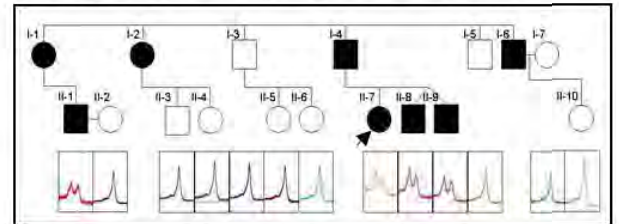


Figure 4. Direct detection of Q4242X by DHPLC in PKX 03 family.

CONCLUSIONS

- PCR amplicons were designed and optimized for both accuracy and efficiency in the mutation screening process of *PKD1* gene using DHPLC.
- DHPLC analysis conditions were optimized for mutation detection in each amplicon.
- Three novel nonsense mutations in the unique region of *PKD1* gene were identified in 3 unrelated ADPKD probands.
- Our preliminary results show that DHPLC is a fast, sensitive, cost-efficient, and reliable method for the screening of *PKD1* mutations and polymorphisms of large number of samples.

REFERENCES

1. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggar-Malik A, Winearls CG, Torres VE, Harris PC. Kidney Int. 2002 May;61(5):1588-99.
2. Xiao W, Oefner PJ. Hum Mutat. 2001 Jun;17(6):439-74.

ACKNOWLEDGMENT

TRF-CHE Research Grant for Mid-Career University Faculty (RMU5180045)



บทคัดย่อ

การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลาง
ในสถาบันอุดมศึกษา * เมธีวิจัย สกว. * วุฒิเมธีวิจัย สกว.
และทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.
ครั้งที่ 10

วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553

โรงแรมฮอติเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



**First Report of *PKD2* Mutations in Thai ADPKD Patients
Using Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) Analysis**

Thongnoppakhun, W.^{1*}, Bunditworapoom, D.², Pithukpakorn, M.^{1,2},
Vareesangthip, K.³, Yenchitsomanus, P.⁴, Limwongse, C.^{1,2}

¹*Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand*

²*Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand*

³*Renal Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University,
Bangkok 10700, Thailand*

⁴*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 genetically heterogeneous disorder caused by mutations in at least two different loci, *PKD1* and *PKD2* genes, being classified into PKD1 and PKD2 disease, respectively. PKD2 is characterized by a later onset of end-stage renal disease (ESRD) and a longer survival than PKD1. Mutations in the *PKD2* gene are responsible for approximately 15% of all ADPKD cases. Genetic testing of *PKD1* and *PKD2* is useful for diagnosis and prognosis of the disease, particularly in asymptomatic individuals or those without a family history. So far, 139 *PKD2* mutations have been reported in the ADPKD Mutation Database, but none have been described from Thai population. In this study, all coding sequences of *PKD2* (exons 1-15) of 30 unrelated ADPKD patients were screened in the 17 different PCR amplicons using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) across a range of optimum temperatures (52.0-71.0°C) for partial fragment denaturation based on the melting profile of each specific fragment. Mutations were identified by their distinct elution peak patterns (non-wild-type profiles) on the chromatogram and were confirmed by independent DNA sequencing. Our preliminary data identified three previously reported *PKD2* mutations (p.R306X, p.R320X, p.R803X) in five patients. Interestingly, three unrelated patients carried the same mutation (p.R803X). Overall, we found *PKD2* mutations in 16.7% (five out of 30) of the ADPKD cases screened and this is the first report in Thailand showing the usefulness of DHPLC for diagnosing PKD2.

Keywords: denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC, *PKD2* gene, autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD, mutation

*Corresponding author.

Tel.: 0-2419-7000 ext. 6633; Fax: 0-2418-3565

E-mail: siwtn@mahidol.ac.th



First Report of *PKD2* Mutations in Thai ADPKD Patients Using Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) Analysis

Thongnoppakhun, W.^{1*}, Bunditworapoom, D.², Pithukpakorn, M.^{1,2},
Vareesangthip, K.³, Yenchitsomanus, P.⁴, Limwongse, C.^{1,2}

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

³Renal Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

⁴Division of Medical Molecular Biology, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

*Corresponding author; E-mail: swtn@mahidol.ac.th

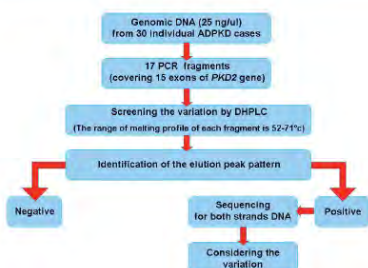
Introduction

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a genetically heterogeneous disorder caused by mutation in at least two genes; *PKD1* and *PKD2* genes, being classified into PKD1 and PKD2 disease, respectively.

PKD2 is characterized by a later onset of end-stage renal disease (ESRD) and longer survival than PKD1. Mutations in the *PKD2* gene are responsible for approximately 15% of all ADPKD cases. So far, 139 *PKD2* mutations have been reported in the ADPKD Mutation Database, but none have been described in Thai population. Genetic testing for *PKD1* and *PKD2* mutations is useful for diagnosis and prognosis of the disease, particularly in asymptomatic individuals or those without a family history.

This study aimed to use denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), a rapid and reliable high-throughput method for mutation analysis in all coding sequence of the *PKD2* gene in 30 unrelated ADPKD patients.

Method



References

- 1) Mizoguchi M *et al.* J Hum Genet 2001;46(9):511-7.
- 2) Rossetti S *et al.* Kidney Int. 2002 May;61(5):1588-99.
- 3) <http://pkdb.mayo.edu/cgi-bin/mutations.cgi>

Acknowledgements

- 1) All ADPKD patients who participated in this study.
- 2) TRF-CHE Research Grant for Mid-Career University Faculty (RMU5180045) to Dr. Wanna Thongnoppakhun



Result

Three previously reported mutations (p.R306X, p.R320X and p.R803X) were identified in exons 4 and 13 of *PKD2* gene in 5 ADPKD patients as shown in Figure 1. Interestingly, a nonsense mutation, p.R803X was found in 3 unrelated patients.

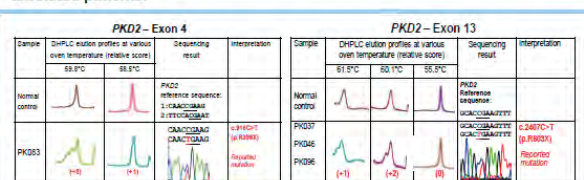


Figure 1. *PKD2* mutations identified in exon 4 (Left) and exon 13 (Right) of *PKD2* gene after DHPLC analysis showing the altered elution profiles (scored as +1, +2 or +3) followed by direct DNA sequencing.

In addition, DHPLC method was further used for direct detection of each causative *PKD2* mutation in each affected family whose members were available as shown in Figure 2-4.

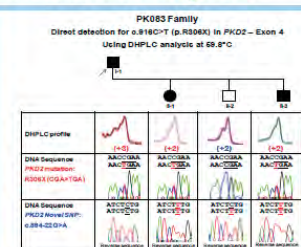


Figure 2. Direct detection of p.R306X in PK083 family revealed the mixed DHPLC elution profiles created by either the mutation itself (+2 red) or the SNP (c.894-22G>A) alone (+2 blue) or both (+3 red). Each peak pattern were clarified by DNA sequencing.

The p.R306X mutation segregated with the ADPKD disease in this family, thus confirming its pathogenicity.

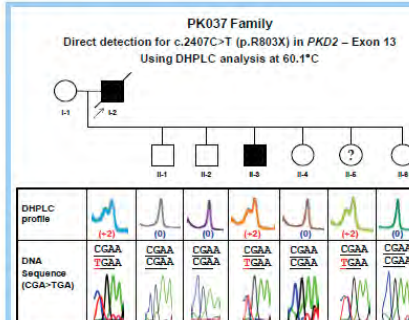


Figure 3. Direct detection of p.R803X in PK037 family revealed the altered DHPLC profiles created by the mutation (+2 red) in 2 affected members (I-2 and II-3) as well as in an unaffected one (II-5).

This result could be a pre-symptomatic diagnosis of having PKD2 disease in this young individual (II-5) which would be useful for her life and family planning.

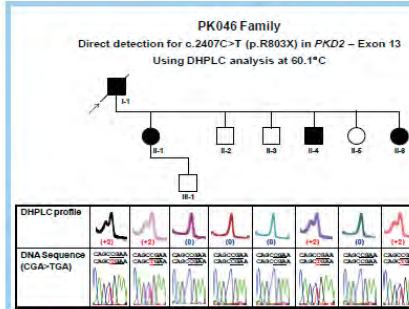


Figure 4. Direct detection of p.R803X in PK046 family showed the altered DHPLC profiles (+2 red) in all 4 affected members, which supported that the mutation was the cause of PKD2 disease in this family.

Conclusion

- Three reported nonsense mutations in the *PKD2* gene, p.R306X, p.R320X and p.R803X were identified. The p.R803X was found commonly in 3 unrelated patients.
- We found *PKD2* mutations in 16.7% (5 out of 30) of the ADPKD cases screened, which was comparable to the frequency of *PKD2* mutations in population worldwide.
- DHPLC is potentially a very useful method for mutation screening of a large gene in a large number of samples. Moreover, this method can be used for direct mutation detection in the families whose causative mutations were identified without the need for DNA sequencing (in most cases of which the elution profile is unique to a given mutation and there is no interference from other DNA variation in the same PCR amplicon).
- This is the first report in Thailand showing the usefulness of DHPLC for diagnosing PKD2 which represents only 15% of ADPKD patients.

"จากเครือข่ายสู่ประชาคมร่วมคิด ร่วมทำ" From Network to Alliance



การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 19

17-19 สิงหาคม 2554 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร



จัดโดย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับ มูลนิธิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

www.dmsc.moph.go.th

P-54 การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD ในผู้ป่วยไทย

ดวงกมล บัณฑิตวรภูมิ*, เกรียงศักดิ์ วารีแสงทิพย์**, มานพ พิทักษ์ภากร*, ***ชนินทร์ ลิ้มวงศ์*, *** และ วรรณนา ทองนพคุณ***

* สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์, **สาขาวิชาวัณโรควิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์

*** หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อยประมาณ 1 ต่อ 500-1,000 คนในประชากรทุกเชื้อชาติ ผู้ป่วยมักมีถุงน้ำในไต มีความดันโลหิตสูง และผู้ป่วยครึ่งหนึ่งมักเสียชีวิตจากภาวะไตวาย งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาชนิดและอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ในยีนที่เป็นสาเหตุของโรคนี้ทั้งสองยีน คือ *PKD1* และ *PKD2* โดยประยุกต์ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงคือ denaturing high performance liquid chromatography (DH-PLC) ตามด้วย direct DNA sequencing ในการศึกษาเพื่อพัฒนาแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐานคุ้มค่า เหมาะสมกับสถานะของผู้ป่วยไทย จากการศึกษาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ADPKD จำนวน 30 รายที่ไม่ได้เกี่ยวข้องเป็นญาติกัน ผลเบื้องต้น พบการกลายพันธุ์ 3 ชนิดในยีน *PKD1* และอีก 3 ชนิดในยีน *PKD2* ในผู้ป่วยรวม 8 ราย (คิดเป็นร้อยละ 26 ของผู้ป่วย) โดยเป็นการศึกษาในยีน *PKD1* เพียงบางส่วน (ร้อยละ 25 ของเนื้อยีน) เท่านั้น ส่วนที่เหลือของยีน *PKD1* อีกร้อยละ 75 อาจให้ข้อมูลการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เพื่อช่วยวินิจฉัยโรค การเฝ้าระวังการเกิดโรค การดูแลรักษาที่เหมาะสม และการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ นอกจากนี้ ยังอาจเป็นฐานข้อมูลในประชากรไทยเพื่อใช้ประโยชน์ด้านงานวิจัยต่อไป



การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD ในผู้ป่วยไทย

ดวงกมล บัณฑิตวารภูมิ*, เกรียงศักดิ์ วารแสงทิพย์**, มานพ พิทักษ์ภากร***

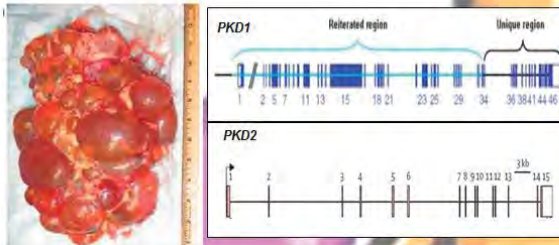
ชนินทร์ ลิ้มวงศ์**** และ วรณดา ทองนพคุณ****

* สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์, ** สาขาวิชาโรคหัวใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์, *** หน่วยยีนพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

โรคไตเป็นถุงน้ำชนิด autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) เป็นโรคพันธุกรรมที่พบได้บ่อยประมาณ 1:500-1,000 คนในทุกเชื้อชาติ ผู้ป่วยมักมีถุงน้ำในไต มีความดันโลหิตสูง และครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตด้วยภาวะไตวาย ร้อยละ 85 ของผู้ป่วยมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ซึ่งอยู่บนโครโมโซม 16 (16p13.3) นอกจากนี้ยังเป็นการกลายพันธุ์ของยีน *PKD2* ที่อยู่บนโครโมโซม 4 (4q22) ปัจจุบันมีการรวบรวมข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีนทั้ง *PKD1* และ *PKD2* แต่ข้อมูลเกือบทั้งหมดเป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรคอเคเซียน พบข้อมูลของชาวเอเชีย โดยเฉพาะชาวไทยน้อยมาก

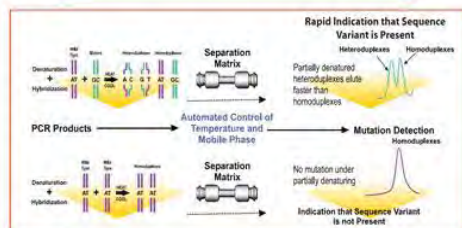
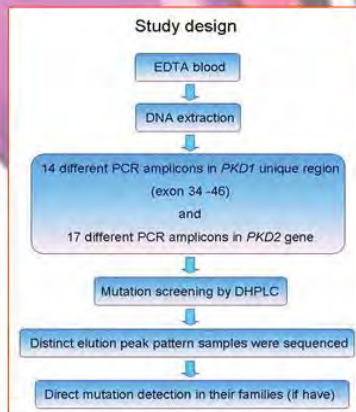
งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาชนิดและอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ในยีน *PKD1* และ *PKD2* ในผู้ป่วย ADPKD ชาวไทย โดยประยุกต์ใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงคือ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) มาคัดกรองหาความผิดปกติของชิ้นส่วน DNA ในแต่ละยีนก่อนนำมาทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี direct DNA sequencing ทั้งนี้ เพื่อพัฒนาแนวทางและวิธีการที่ได้มาตรฐาน คุ่มค่า เหมาะสมกับสภาวะของผู้ป่วยไทย



ภาพที่ 1. ชัย: ลักษณะของไตที่เป็นถุงน้ำ. ขาว: โครงสร้างยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่เป็นสาเหตุของโรค

วิธีการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD จำนวน 30 รายที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับญาติกัน โดย DNA ที่ได้จากการศึกษาจะนำไปเพิ่มปริมาณของยีน *PKD1* จำนวน 14 ชิ้น (exon 34-46) และ *PKD2* จำนวน 17 ชิ้น (exon 1-15) ก่อนนำไปคัดกรองและตรวจหาการกลายพันธุ์ดังแสดงในภาพที่ 2.



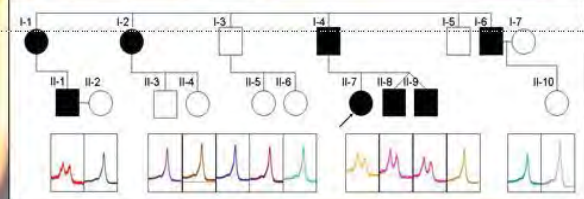
ภาพที่ 2. บน: ขั้นตอนของการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ด้านล่าง: หลักการของการตรวจกรองด้วยวิธี denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

ผลการทดลอง

จากการศึกษาในผู้ป่วย 30 ราย พบการกลายพันธุ์ 3 ชนิดของยีน *PKD1* ในผู้ป่วย 3 ราย และการกลายพันธุ์ของยีน *PKD2* อีก 3 ชนิดในผู้ป่วยอีก 5 ราย การกลายพันธุ์ทั้งหมดเป็นชนิด nonsense mutation ซึ่งส่งผลให้โปรตีนมีขนาดสั้นลงเนื่องจากมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่ง stop codon ดังแสดงในตาราง

Family	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Elution peak		Sequencing result
				Normal	Mutant	
PKD1						
PKX 01	36	c.10718C>G (TCA>TGA)	S3573X			
PKX 02	43	c.11807G>A (TGG>TAG)	W3936X			
PKX 03	46b	c.12724C>T (CAG>TAG)	Q4242X			
PKD2						
PKX 04	4	c.916C>T (CGA>TGA)	R306X			
PKX 05	4	c.958C>T (CGA>TGA)	R320X			
PKX 06 PKX 07 PKX 08	13	c.2407C>T (CGA>TGA)	R803X			

นอกจากนี้ กลุ่มวิจัยได้นำเทคนิค DHPLC มาใช้เพื่อศึกษาการถ่ายทอดการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ในครอบครัวผู้ป่วยที่มีสมาชิกครอบครัวหลายคน ดังแสดงเป็นตัวอย่างในภาพด้านล่าง



สรุป

จากการศึกษานี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* และ *PKD2* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคไตเป็นถุงน้ำชนิด ADPKD คิดเป็นร้อยละ 26 ของจำนวนผู้ป่วยที่ศึกษา แต่เนื่องจากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *PKD1* ได้ทำเฉพาะ exon ที่ 34-46 คิดเป็นร้อยละ 25 ของยีนทั้งหมดนั้น ทางกลุ่มวิจัยคาดหวังว่าถ้าได้ทำการศึกษาในบริเวณที่เหลืออีกร้อยละ 75 จะได้ข้อมูลของการกลายพันธุ์ที่มากขึ้น

นอกจากนี้เทคนิค DHPLC ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถลดระยะเวลาของการตรวจ มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากนัก นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อการคัดกรองหาได้ทั้งการกลายพันธุ์และความหลากหลายของพันธุกรรม (polymorphism)

ผลจากงานวิจัยครั้งนี้ จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค การเฝ้าระวังการเกิดโรค การดูแลรักษาที่เหมาะสม และนำไปใช้ในการให้คำปรึกษาและทำนายทางพันธุศาสตร์ นอกจากนี้ จะนำมารวบรวมเป็นฐานข้อมูลในประชากรไทยเพื่อใช้ประโยชน์ในงานวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Rossetti S, et al. Kidney Int. 2002 May;61(5):1588-99.
2. Xiao W, Oefner PJ. Hum Mutat. 2001 Jun;17(6):439-74.
3. Mizoguchi M, et al. J Hum Genet. 2001;46(9):511-7.
4. Rossetti S, et al. Kidney Int. 2002 May;61(5):1588-99.
5. <http://pkdb.mayo.edu/cgi-bin/mutation.ns.cgi>

ขอขอบคุณ

TRF-CHE Research Grant for Mid-Career University Faculty (RMU5180045)



บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบบรรยาย

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พว. เมาธิวิจัยอาวสุโส สกว.
ครั้งที่ 11

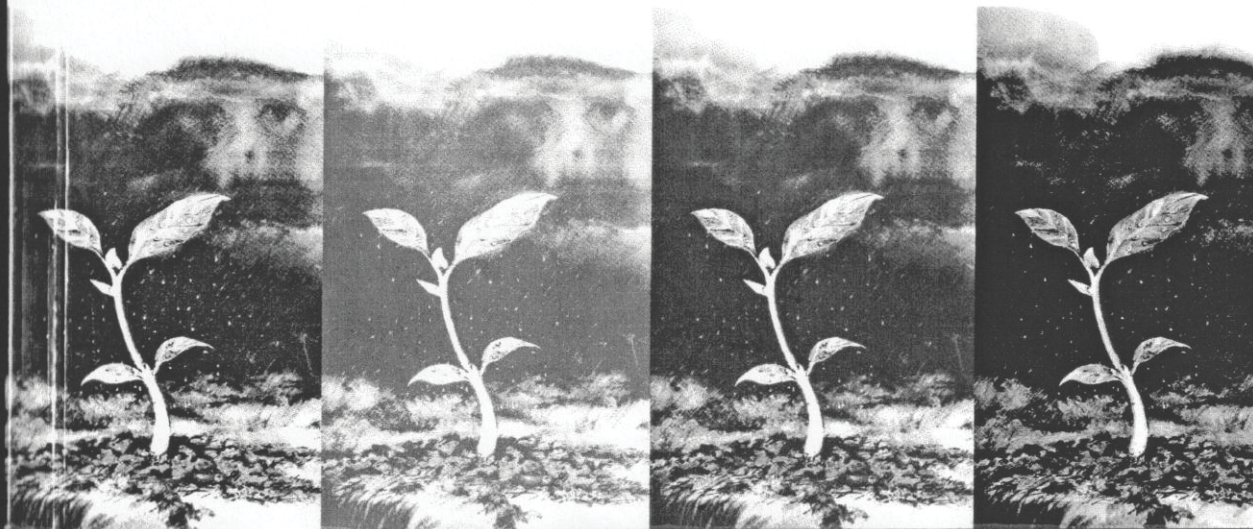
วันที่ 19-21 ตุลาคม 2554

โรงแรมฮอติเตย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



Molecular Genetic Approach for Detection of *PKD1* and *PKD2* Mutations in Thai Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) Patients

Thongnoppakhun, W.^{1*}, Bunditworapoom, D.², Pithukpakorn, M.^{1,2},
Vareesangthip, K.³, Yenchitsomanus, P.⁴, Limwongse, C.^{1,2}

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

³Renal Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University,
Bangkok 10700, Thailand

⁴Division 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 genetically heterogeneous disorder caused by mutations in at least two different loci, *PKD1* and *PKD2* genes, being classified into *PKD1* and *PKD2* disease with a later onset of end-stage renal disease (ESRD) and a longer survival than *PKD1*. Mutations in *PKD1*, a large and complicated gene are the major cause responsible for about 85% of all ADPKD cases, while those of *PKD2* gene causing the remaining cases. Detecting mutations in *PKD1* is hindered by the gene's large size, the presence of six homologous genes and the lack of mutation hotspots. This makes identification of *PKD1* mutations labor intensive, time consuming and expensive. The majority of *PKD1* and *PKD2* mutations are private. Genetic testing of both genes is thus useful for correct diagnosis and prognosis of ADPKD, particularly in asymptomatic individuals or those without a family history. Here we report the application of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for mutation screening in both *PKD* genes. Optimal DHPLC partial denaturing conditions (melting profiles) for mutation detection were established for each PCR amplicon corresponding to the *PKD1* and *PKD2* exons and their adjacent intronic/flanking sequences. All coding sequences of *PKD1* and *PKD2* comprising 59 and 17 PCR amplicons, respectively of the first 30 unrelated ADPKD patients were analyzed by DHPLC across a range of optimum temperatures for partial fragment denaturation. Mutations were identified by their distinct elution peak patterns (non-wild-type profiles) on the chromatogram and were confirmed by DNA sequencing. The efficiency of this approach facilitated detection of different types of mutations, including nonsense mutations (e.g. S3573X, S3798X, W3936X, Q4242X in *PKD1* and R306X, R320X, R803X in *PKD2*), single-base substitutions (i.e. missense mutations and SNPs) and small deletions or insertions. Pathogenicity of any mutations, especially the missense ones had to be proven before conclusion could be made. 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. Nevertheless, DHPLC is a powerful method for molecular diagnosis of ADPKD that should be implemented as a routine test for proper clinical care. Additional molecular analysis on remaining PCR fragments and more patients' samples is ongoing.

Keywords: autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD, *PKD1*, *PKD2*, denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC, mutation

*Corresponding author.

Tel.: 0-2419-7000 ext. 6633; Fax: 0-2418-3565

E-mail: siwtn@mahidol.ac.th