



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของกระเจตนา

โดย รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร. กัญญา ศุภปิติพร และคณะ

เดือน มิถุนายน ปี 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ป่วยและครอบครัวของผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณทีมแพทย์ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การดูแลรักษาผู้ป่วยอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณนางสาวศิริประภา ทองกอบเพชร นายเฉลิมพล ศรีจอมทอง นักวิทยาศาสตร์ สำหรับความมุ่งมั่น ทุ่มเททั้งร่างกาย แรงใจและสติปัญญาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์แพทย์หญิงอุษา ทิสยากร ศาสตราจารย์นายแพทย์ยัง ภู่วรรณ และศาสตราจารย์นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ในการทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.พญ.วิลาวัณย์ พวงศรีเจริญ จากภาควิชาจุฬารักษวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศาสตราจารย์นายแพทย์ John J. Hopwood จาก Lysosomal Diseases Research Unit, SA Pathology, North Adelaide, Australia ที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุน และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ เช่น สถานที่ เงินทุน และเจ้าหน้าที่ อย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณบุคลากร ครอบครัว สำหรับความเข้าใจ และกำลังใจที่มีให้อย่างสม่ำเสมอตลอดมา

Abstract

Project Code: RSA5480022

Project Title: Genetic analysis of inherited corneal disorders

Investigator: Kanya Suphapeetiporn, MD, PhD

E-mail Address: kanya.su@chula.ac.th

Project Period: 3 years

Corneal disorders are important factors causing visual loss, a major disability in humans. Several corneal disorders can be inherited and some are found to be resulted from genetic defects. Congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2) is an inherited corneal disorder with the disease onset at birth or early childhood. Recently mutations in the sodium bicarbonate transporter-like solute carrier family 4 member 11 (*SLC4A11*) have been identified in individuals with CHED2. Corneal abnormalities can also be found in some inherited storage diseases. Mucopolysacchridosis type I (MPS I) is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by a deficiency of the enzyme alpha-L-iduronidase (IDUA). As a result of defects inside the lysosomes, accumulation of partially degraded glycosaminoglycans, heparan and dermatan sulfate leads to the progressive cellular dysfunction. MPS I has been classified into three clinical phenotypes with different severity and age of onset. Hurler syndrome (MPS IH) is the most severe with symptoms including severe developmental delay, hepatosplenomegaly, skeletal deformities and corneal clouding. The *IDUA* gene is found to be responsible for MPS I. Cystinosis is another autosomal recessive disorder characterized by defective transport of cystine across the lysosomal membrane and resulting in ophthalmic, renal, and other organ abnormalities.

Here, we identified two novel pathogenic mutations in a Thai family with CHED2. The newly identified c.778A>G (p.K260E) mutation was inherited from the mother and was not identified in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes. The lysine residue at codon 260 was highly conserved. The 68-kb deletion encompassing the whole *SLC4A11* gene was inherited from the father. This is the first study to describe the largest deletion in patients with CHED2. Further analysis to identify such deletion in the previously reported CHED2 patients with undetected *SLC4A11* mutations using conventional PCR-sequencing technique is warranted. We also reported two Thai patients: one with Hurler syndrome, the most severe form, and the other with Scheie syndrome (MPS IS), the mildest. Mutation analyses revealed that the MPS IH patient was homozygous for a previously reported mutation, c.252insC, while the MPS IS patient was found to harbor a novel c.826G>A (p.E276K) mutation. When combined with the previous study in Thai MPS IH patients, the c.252insC mutant allele was found in 3 out of 6

alleles, accounting for 50 % of the mutations making it a possible common mutant allele for MPS IH in the Thai population. Transient transfection of the p.E276K construct into COS-7 cells revealed a significant reduction of IDUA activity compared to that of the wild-type IDUA suggesting it as a disease-causing mutation. Mutation analysis in the *CTNS* gene causing cystinosis was also performed. PCR sequencing of the entire coding regions of *CTNS* in six cystinosis patients from four families identified all eight mutant alleles, including two novel mutations, p.G309D and p.Q284X. This study expands the mutational and population spectrum of cystinosis.

This study expands the mutational spectrum and emphasizes an important role of genetic testing for definite diagnosis, early initiation of appropriate therapy as well as genetic counseling in inherited corneal disorders.

คำหลัก: Hereditary corneal disorder, SLC4A11, mutations, mucopolysaccharidosis type I, IDUA, cystinosis, CTNS

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5480022

ชื่อโครงการ: การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของกระจกตา

ชื่อนักวิจัย: รศ.พญ. ด.ร. กัญญา ศุภปิติพร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: kanya.su@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

ความผิดปกติของแก้วตาเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียการมองเห็นซึ่ง merupakan ความทุกข์ทรมานที่สำคัญ ความผิดปกติของแก้วตาหลายชนิดสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ ความผิดปกติอาจพบเฉพาะที่แก้วตา หรือพบร่วมกับอวัยวะหลายระบบ และบางชนิดได้รับการค้นพบถึงสาเหตุซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน โรค congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2) เป็นโรคพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความผิดปกติของแก้วตาตั้งแต่แรกเกิดหรือวัยเด็กเล็ก การกลายพันธุ์ในยีน sodium bicarbonate transporter-like solute carrier family 4 member 11 (SLC4A11) พบในผู้ที่ เป็นโรค CHED2 นอกจากนี้ ความผิดปกติของแก้วตาพบในกลุ่มโรคพันธุกรรมบางโรคที่มีการสะสมสารในเซลล์ต่างๆของร่างกาย โรคมิวโคโพลีแซคคาไรโดซิส ชนิดที่ 1 (mucopolysacchridosis type I, MPS I) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมในลักษณะด้อยที่มีการสะสมสารในไลโซโซม เกิดจากการขาดหรือการพร่องของเอนไซม์ alpha-L-iduronidase (IDUA) นำไปสู่การสะสมของสารไกลโคสะมิโนไกลแคน เฮปาริน ซัลเฟต และเดอร์มาแทน ซัลเฟตในเซลล์ต่างๆ ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ MPS I แบ่งตามความรุนแรงของอาการและอายุที่เริ่มมีอาการได้เป็น 3 ลักษณะ กลุ่มอาการ Hurler มีอาการรุนแรงที่สุดประกอบด้วยพัฒนาการที่ช้า ตับและม้ามโต กระดูกผิดปกติและแก้วตาขุ่น ยีน IDUA เกี่ยวข้องกับการเกิด MPS I สำหรับโรค cystinosis เป็นโรคทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดในลักษณะด้อยบนออโซม การกลายพันธุ์ในยีน CTNS ทำให้เกิดความบกพร่องในการขนส่ง cystine ของโปรตีน cystinosin ผ่านเยื่อไลโซโซม (lysosomal membrane) และทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ที่สำคัญ เช่น ตา และไต เป็นต้น ผลการศึกษาวิจัยในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค CHED2 นี้ พบการกลายพันธุ์ใหม่สองชนิด การกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) ถ่ายทอดมาจากมารดาซึ่งพบเป็นพาหะของการกลายพันธุ์ ไม่พบในโครโมโซมที่ได้จากผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 100 โครโมโซม กรดอะมิโนไลซีนที่ตำแหน่ง 260 เป็นตำแหน่งที่อนุรักษ์ (conserved) การกลายพันธุ์อีกชนิดเกิดจากการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 68 kb ซึ่งครอบคลุมถึงส่วนของยีน SLC4A11 ทั้งหมด ซึ่งพบว่าถ่ายทอดมาจากบิดา การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่บรรยายการขาดหายไปของสารพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยโรค CHED2 การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาการขาดหายไปดังกล่าวในผู้ป่วยโรค CHED2 ที่ได้มีรายงานมาก่อนแต่ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อใช้วิธี PCR-sequencing มีความจำเป็น นอกจากนี้ ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยไทยที่เป็นกลุ่มอาการ Hurler (MPS IH) ชนิดรุนแรงมากและกลุ่มอาการ Scheie (MPS IS) ชนิดรุนแรงน้อย พบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่มีการรายงานมาก่อนในผู้ป่วย MPS IH ทั้งสองอัลลีล ในขณะที่พบการกลายพันธุ์ใหม่ชนิด c.826G>A (p.E276K) ในผู้ป่วย MPS IS เมื่อรวมผลการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC พบใน 3 อัลลีล

จากทั้งหมด 6 อัลลีล ในผู้ป่วย MPS IH คิดเป็นร้อยละ 50 ของการกลายพันธุ์ที่พบ การกลายพันธุ์ชนิดนี้อาจจะเป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในประเทศไทย การทดสอบผลของการกลายพันธุ์ชนิด p.E276K ในเซลล์ COS-7 พบมีการลดลงของการทำงานของเอนไซม์ IDUA อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งสนับสนุนว่าเป็นการกลายพันธุ์นี้เป็นสาเหตุของโรค การศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน CTNS ในผู้ป่วยโรค cystinosis จำนวน 6 คนจากทั้งหมด 4 ครอบครัว ด้วยวิธี PCR sequencing พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 อัลลีลซึ่งรวมทั้งการกลายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิดคือ p.G309D และ p.Q284X การศึกษานี้ได้ค้นพบการกลายพันธุ์ใหม่เพิ่มเติมจากเดิมและได้ขยายการศึกษาในประเทศไทยที่เป็น cystinosis

การศึกษาวินิจฉัยนี้ได้เพิ่มชนิดของการกลายพันธุ์และเน้นถึงบทบาทที่สำคัญของการทดสอบทางพันธุกรรมในการให้การวินิจฉัยได้อย่างแน่นอน การให้การรักษาในระยะแรกเริ่ม และการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม

คำหลัก: ความผิดปกติของแก้วตาที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้, SLC4A11, การกลายพันธุ์, มิวโคโพลีแซคคาไรโดซิส ชนิดที่ 1, IDUA, cystinosis, CTNS

บทนำ

ความผิดปกติของกระจกตา ส่วนหนึ่งเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม การทราบสาเหตุและกลไกที่นำไปสู่ความผิดปกติ ทำให้การดูแลรักษามีประสิทธิภาพ ลดความทุพพลภาพที่เกิดจากการสูญเสียการมองเห็น ซึ่งมีผลกระทบต่อผู้ป่วย ครอบครัวและสังคมอย่างยิ่ง การที่สามารถให้การวินิจฉัยความผิดปกติได้อย่างถูกต้อง ประกอบกับการใช้ความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์ สามารถที่จะค้นหาสมาชิกครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค นำไปสู่การป้องกัน และการให้คำปรึกษาการพันธุกรรมได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

การศึกษาวินิจฉัยความผิดปกติของกระจกตาที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ได้นำไปสู่การค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมามากขึ้นเรื่อยๆ ความผิดปกติของกระจกตาชนิด epithelial corneal dystrophies ลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และยีนที่เกี่ยวข้องสรุปได้ดังในตารางที่ 1¹

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มอาการความผิดปกติของกระจกตา การถ่ายทอดทางพันธุกรรม และช่วงที่เริ่มมีอาการ

	CHED1	CHED2	PPCD1	PPCD2	PPCD3	FECD1	FECD2
การถ่ายทอด	dominant	recessive	dominant	dominant	dominant	dominant	dominant
ยีนที่เกี่ยวข้อง	unknown	SLC4A11	VSX1	COL8A2	TCF8	COL8A2	unknown
ช่วงที่เริ่มมีอาการ	early	birth	early	early	early	early	late

กลุ่มอาการ congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) เชื่อว่าเกิดจากการเสื่อม (degeneration) หรือ การเจริญได้น้อย (hypoplasia) ของกลุ่มเซลล์ endothelium² การถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นได้ทั้งลักษณะเด่น (CHED1) และลักษณะด้อย (CHED2) ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบในชั้นส่วนของกระจกตาที่ผิดปกติ ประกอบด้วย การบวม (edema) ทั้งส่วนของ epithelium และ stroma ความผิดปกติในส่วนของ Bowman membrane เซลล์ corneal epithelium จะเปลี่ยนเป็นลักษณะมีหลายนิวเคลียส (multinucleated) และส่วนของ Descemet's membrane จะหนาขึ้น³

โรค CHED ชนิดที่ 1 (CHED1) ที่ถ่ายทอดในลักษณะเด่นและ CHED ชนิดที่ 2 (CHED2) ที่ถ่ายทอดในลักษณะด้อย มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางคลินิกและสาเหตุทางพันธุกรรม⁴ ผู้ป่วยที่เป็นโรค CHED2 จะเริ่มมีอาการตั้งแต่แรกเกิดหรือในช่วงเดือนแรก (neonatal period) ในขณะที่ ผู้ป่วยที่เป็นโรค CHED1 มักจะเริ่มมีอาการในช่วงวัยเด็ก (childhood) อาการที่พบในผู้ป่วย CHED2 โดยทั่วไปจะมีอาการรุนแรงกว่าที่พบในผู้ป่วยที่เป็นโรค CHED1 อาการที่พบ ประกอบด้วย แก้วตาขุ่น (cloudy cornea) ตามัว (blurred vision) และอาจจะมีตากระตุก (nystagmus) ได้ในผู้ป่วยบางราย²

การศึกษาในครอบครัวที่มีสมาชิกหลายคนเป็นโรค CHED สามารถค้นหาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED2 ได้ที่ตำแหน่งโครโมโซม 20p13⁵ ซึ่งแตกต่างจากตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED1 ซึ่งอยู่ที่ 20p11.2-q11.2 บริเวณ pericentromere⁶ จากการค้นพบดังกล่าวนำไปสู่การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED โดยยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ bicarbonate transporters เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED2 ยีนดังกล่าวมีชื่อว่า sodium bicarbonate transporter-like solute carrier family 4 member 11 (SLC4A11)⁷ ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เป็น bicarbonate transporter สำคัญ SLC4A11

เป็น electrogenic Na/borate cotransporter ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเพิ่ม borate ในเซลล์ และเพิ่มการทำงานของ MAPK pathway⁸ สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CHED1 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

การศึกษาที่ผ่านมา พบการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A11* ในครอบครัวที่มีผู้ป่วยเป็นโรค CHED2 ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบ ประกอบด้วย การกลายพันธุ์ชนิด nonsense, missense และ frameshift ทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นมีขนาดสั้นลง ไม่สามารถทำงานได้ (loss of function)^{7, 9-17} การที่เซลล์ขาดโปรตีน *SLC4A11* ส่งผลให้การขนส่ง sodium และ bicarbonate ผิดปกติ ทำให้เกิดการบวมของเซลล์ corneal epithelium นอกจากนี้ ยังมีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ เนื่องจาก *SLC4A11* ทำหน้าที่เป็น borate transporter ด้วย

นอกจากความผิดปกติของกระจกตาที่เกิดจาก epithelial corneal dystrophies ยังมีโรคพันธุกรรมทางเมแทบอลิซึมที่ผู้ป่วยมีความผิดปกติของกระจกตาร่วมด้วย โรคที่มีความสำคัญและถ่ายทอดทางพันธุกรรมในลักษณะด้อย คือ กลุ่มอาการ mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 (MPS I) เป็นความผิดปกติที่มีการสะสมของสารในไลโซโซม (lysosomal storage) MPS I เกิดจากความบกพร่องของการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แอล-ไอดูโรนิเดส (α -L-iduronidase, IDUA) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในส่วนของ α -L-iduronide glycosidic bond ที่อยู่ส่วนปลายของสาร glycosaminoglycans (GAGs) dermatan และ heparan sulphates การขาดเอนไซม์หรือการที่เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง ทำให้เกิดการสะสมของสารไกลโคซามิโนไกลแคนที่ไม่ถูกย่อยสลายหรือสลายได้เพียงบางส่วนในไลโซโซมของเนื้อเยื่อต่างๆนำไปสู่อาการและอาการแสดงที่พบในโรค MPSI¹⁸ ลักษณะอาการที่พบใน MPS I แบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามความรุนแรงที่พบและอายุที่เริ่มมีอาการ ได้แก่ Hurler, Hurler/Scheie, และ Scheie กลุ่มอาการ Hurler เป็นชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด ประกอบด้วย ตับและม้ามโต กระดูกผิดปกติ พัฒนาการช้า และแก้วตาขุ่น ซึ่งพบมีอาการในขวบปีแรก ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตก่อนอายุ 10 ปี จากภาวะหายใจอุดตัน การติดเชื้อในทางเดินหายใจ และภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นกับหัวใจ สำหรับผู้ป่วยกลุ่มอาการ Scheie อาการจะรุนแรงน้อยกว่าและเริ่มเมื่ออายุมากกว่า ผู้ป่วยมีแก้วตาขุ่น กระดูกผิดปกติโดยเฉพาะมือ ทำให้มีข้อติด (stiff joints) ตับและม้ามโตไม่มาก การพัฒนาการและสติปัญญา มักจะปกติ สำหรับผู้ป่วยกลุ่มอาการ Hurler/Scheie จะมีอาการรุนแรงอยู่ในระหว่างสองชนิดที่กล่าวมาข้างต้น อาการมักจะเริ่มในช่วงเด็กโตหรือช่วงเข้าวัยรุ่น จะมีความผิดปกติของอวัยวะเช่นเดียวกับผู้ป่วยกลุ่มอาการ Hurler แต่การพัฒนาการหรือสติปัญญาค่อนข้างดี¹⁸

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมา สามารถค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ α -L-iduronidase (*IDUA*) อยู่บนโครโมโซม 4p16.3^{19, 20} ประกอบด้วย 14 exons สร้าง mRNA ที่มีขนาด 2.3 kb และโปรตีนเริ่มต้นที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 653 ตัว^{20, 21}

ในปัจจุบัน การวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีลักษณะอาการทางคลินิกเข้าได้กับ MPS I อย่างแน่นอนสามารถกระทำได้โดยการวัดปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ α -L-iduronidase ในเม็ดเลือดขาว (leucocytes) หรือเซลล์เพาะเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากผู้ป่วย (fibroblast cultures) อย่างไรก็ตาม การวัดการทำงานของเอนไซม์ไม่สามารถนำมาใช้ค้นหาผู้ที่เป็นพาหะของโรค และช่วยในการวินิจฉัยก่อนคลอดได้

การทดสอบและวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *IDUA* ในครอบครัวที่มีผู้ป่วยเป็นโรค MPS I ได้นำไปสู่ความเข้าใจและพบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์และลักษณะที่พบในผู้ป่วยได้ในระดับหนึ่ง (genotype/phenotype correlation) ผู้ป่วยกลุ่มอาการ Hurler จะมีลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *IDUA* ที่ทำให้

ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำงานได้ ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มอาการ Scheie จะมีการกลายพันธุ์ที่ยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ยังพอทำงานได้บ้าง (residual enzyme activity) นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การกลายพันธุ์ที่เป็น non-pathogenic polymorphisms มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน²¹ ดังนั้น การทดสอบและวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยโรค MPS I ในประชากรต่าง ๆ สามารถนำไปสู่การเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่าง genotype และ phenotype ที่เพิ่มขึ้น และการค้นพบลักษณะการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการรักษาสำหรับผู้ป่วยได้ในอนาคต รวมทั้งการค้นหาผู้ที่เป็นพาหะของโรค และการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

โรค cystinosis เป็นโรคพันธุกรรมอีกโรคหนึ่งที่ถ่ายทอดในลักษณะด้อยซึ่งเกิดจากการสะสมของสารในไลโซโซม เนื่องมาจากความบกพร่องในการขนย้ายของ cystine ออกจากไลโซโซม ทำให้มีผลกระทบต่อหลายอวัยวะ ได้แก่ ตา และไต เป็นต้น²². การกลายพันธุ์ในยีน CTNS เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค cystinosis²³ ยีน CTNS ประกอบด้วย 12 exons สร้างโปรตีน cystinosin ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 367 ตัว เป็นโปรตีนอยู่ที่ membrane ของไลโซโซม

การศึกษานี้เป็นการรวบรวมผู้ป่วยไทยที่มีอาการและอาการแสดงที่เข้าได้กับโรค ได้แก่ กลุ่มอาการ congenital hereditary endothelial dystrophy, mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 และ cystinosis ซึ่งผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์ด้วยเรื่องความผิดปกติของกระจกตาาร่วมด้วย การศึกษาหาการกลายพันธุ์ของยีน นำไปสู่การยืนยันการวินิจฉัยโรค การรักษาที่ถูกต้องเหมาะสมและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมแก่ครอบครัว เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วยและครอบครัว นอกจากนี้ การศึกษาเพิ่มเติมถึงการทำงานของยีนที่เกิดจากการการกลายพันธุ์ ช่วยให้เกิดความเข้าใจเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับการทำงานของยีน ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ที่พบและการแสดงออกของโรค นำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกการเกิดโรค ซึ่งความรู้เหล่านี้อาจจะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการรักษาโรคต่อไปในอนาคตได้

วิธีการทดลอง

1. กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง คือ ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 ซึ่งมารับการดูแลรักษาที่แผนกจักษุ และแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งขณะนี้ มีครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 อย่างน้อย 1 ครอบครัว และครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรค mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 อย่างน้อย 2 ครอบครัว การศึกษานี้ จะครอบคลุมผู้ป่วยทุกรายที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค ถ้าพบผู้ป่วยมากขึ้นระหว่างการศึกษ ทางกลุ่มวิจัยก็จะรับผู้ป่วยเข้าศึกษาในโครงการถ้าผู้ป่วยและครอบครัวยินยอม การศึกษานี้จะศึกษาลักษณะทางคลินิกและการกลายพันธุ์ของยีนในสมาชิกครอบครัวอย่างน้อย 2 รุ่น

แต่ละครอบครัวจะได้รับการวิเคราะห์พงศาวลี เพื่อหาสมาชิกครอบครัวที่เป็นโรค สมาชิกที่เป็นพาหะหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค

กลุ่มควบคุม คือ ผู้ที่ไม่เป็นโรคดังกล่าวและไม่มีประวัติสมาชิกอื่นๆในครอบครัวเป็นโรค ในกรณีที่พบมีการกลายพันธุ์ใหม่ของยีนดังกล่าวในผู้ป่วย จะมีการนำสารพันธุกรรม DNA จากกลุ่มควบคุมจำนวน 100 คน มาตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเฉพาะตรงบริเวณที่พบการกลายพันธุ์ เป็นการยืนยันว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวสำคัญต่อการเกิดโรค

2. การยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยได้รับจากผู้ป่วยหรือผู้ปกครองและโครงการได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เข้าร่วมการวิจัยใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) เพื่อสกัดสารพันธุกรรม

4. การสกัดสารพันธุกรรม (RNA และ DNA)

สารพันธุกรรม RNA และ genomic DNA จะถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยวิธีมาตรฐานโดยใช้ Qiagen RNA and DNA extraction kits (Qiagen, Valencia, CA)

5. การทำ genotyping โดยใช้ markers ในบริเวณโครโมโซม 20p ซึ่งอยู่ในบริเวณตำแหน่งของยีน *SLC4A11*

เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าการถ่ายทอดของยีนที่ผิดปกติไปได้กับ markers ที่อยู่ใกล้หรือในยีน *SLC4A11* ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่า โรค congenital hereditary endothelial dystrophy ที่พบในสมาชิกครอบครัวน่าจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A11* การทำ genotyping จะใช้ microsatellite markers ที่เคยได้รับการศึกษามาก่อนหน้านี้ (ABI linkage mapping set, Foster City, CA)¹⁶

6. การเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนที่ต้องการโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

สำหรับการเพิ่มปริมาณของส่วนของยีน *SLC4A11* ที่สร้างโปรตีน โดยวิธี PCR โดยใช้ primers ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง primers และ condition สำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ exon ต่างๆ ของยีน *SLC4A11*

Exon	Primer Sequences for PCR 5' to 3'		Annealing Temperature (°C)
	Forward	Reverse	
1	CTAGGGTGGCGTGGGTTG	AGCACTAGAGTGGCCCAGAT	60
2-3	GATGGCCTCTCCCACCAC	CTCCCTGTTGAGCTGCTCCT	60
4-5	TCCAGGAGCAGCTCAACAG	TCTTCTCCCAAGTTGGTTGG	60
6	CAAGGTCGAGGGGGTTCT	GTTTCTGACACACCCACAGG	60
7-8	AGCCTGGGTGACAGTGAGAC	ACAGCCTTGTTTTTCCCAAT	60
9-10	ACTGATGGTACGTGGCCTCT	CGTCCATGCGTAGAAGGAGT	60
11-12	CATTGGTGATTCTGCTGACC	ACTCAGCTTGAGCCAGTCCT	60
13-14	GAGCCCTTTCTCCCTGAGAT	GGTTGTAGCGGAACCTTGCTC	60
A15	GCCTTCTCCCTCATCAGCTC	GTAGGCAGTGCCCTTCACC	60
16	AATGCACCGGAGAACAGGT	CCGCGAGTGTCACCTCTG	60
17	CGTGGACCCTGAGGAGTG	CCCTCCGGATGTAGTGTGTC	60
18	CTCGATGGCAACCAGCTC	CTAGGCAGGACCCCTCCTC	66

19	CAGGAGGGGCTCCAGTCTA	ACAGAGCAGTCACCCACACA	66
----	---------------------	----------------------	----

สำหรับการเพิ่มปริมาณของส่วนของยีน *IDUA* ที่สร้างโปรตีน โดยวิธี PCR ใช้ primers ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง primers และ condition สำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ exon ต่างๆ ของยีน *IDUA*

Exon	Primer Sequences for PCR 5' to 3'		Annealing Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
	Forward	Reverse	
1	ACCCAACCCCTCCCAC	AGCTTCAGAGACCGGAGC	58
2	GAACGTGTGTGTCAGCCG	GCTCGGAAGACCCCTTGT	62
3-4	TTCCAGCCTGGAGCATGGAG	GTTGCACCCCTATCACGCAG	62
5-6	TCACCTTGACCCCTCCCTCC	GCTGACCCTGGTGGTGCTGA	62
7	TGCGGCTGGACTACATCTC	GCAGCATCAGAACCTGCTACT	62
8	CCACCTTCCTCCCGAGAC	GGAGCGCACTTCCTCCAG	62
9-10	TCCTTCACCAAGGGGAGG	TCCTCAGGGTTCTCCAGG	58
11-12	GTGTGGGTGGGAGGTGGA	CTTCACCCATGCGGTCAC	62
13-14	CTGCCTGCTCCCACCTTTGA	CCCATGCTGCCCTCCCATCA	62

7. DNA sequencing ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำไปหาลำดับเบส
ผลผลิตจาก PCR จะได้ถูกนำไปหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc., Seoul, Korea
8. การวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ (mutation analysis)
ข้อมูลลำดับเบสจะได้รับการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Sequencher (version 4.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI)
9. การแยกเม็ดเลือดขาว
เม็ดเลือดขาวจะได้รับการสกัดแยกออกมาจากเลือดที่ได้โดยใช้วิธี dextran extraction เพื่อนำเม็ดเลือดขาวไปใช้ในขั้นตอนการวัดการทำงานของเอนไซม์ต่อไป
10. การวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากเซลล์ (cell lysates)
วัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (Bradford protein assay)
11. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในยีน *IDUA* ที่พบในผู้ป่วย MPS I
 - 11.1 การสร้าง expression constructs ที่ประกอบด้วย mutant *IDUA* cDNA โดยวิธี site-directed mutagenesis
Wild-type *IDUA* cDNA ที่ได้รับการใส่ (clone) เข้าไปในระหว่าง *EcoRI* restriction sites ของพลาสมิด (plasmid) pEFNeo (pEFNeo/wtIDUA) ซึ่งได้รับมาจาก Professor John Hopwood, Professor Hopwood เป็นนักวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับยีนดังกล่าวและมีผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารชั้นนำ
pEFNeo/wtIDUA ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสร้าง cDNA ที่มีการเปลี่ยนเบส (*in vitro* mutagenesis) ดังนั้น การสร้าง plasmids ที่ประกอบด้วย *IDUA* cDNA ที่มีการกลายพันธุ์ซึ่งพบในผู้ป่วย (mutant *IDUA* cDNA หรือ pEFNeo/mutant *IDUA*) ทำโดยวิธี *in vitro* mutagenesis โดยใช้ pEFNeo/wtIDUA เป็น plasmid ต้นแบบ plasmid ที่ได้จากการทำ *in vitro* mutagenesis จะได้รับการทดสอบยืนยันว่าเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ต้องการ โดย direct sequencing
 - 11.2 Cell culture, transfection assay
เซลล์ที่นำมาใช้ คือ COS-7 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการนำมาใช้ในการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ *IDUA* แล้ว เซลล์ได้รับการเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium ที่มี 10 % fetal-calf serum และ ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) เซลล์ได้รับการเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 6 หลุม (six-well plates) โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย จำนวน 2×10^5 เซลล์ เซลล์ได้รับการเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีระดับความเข้มข้นของ CO₂ ที่ร้อยละ 5 ก่อนที่จะได้รับการ transfection ภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับ plasmids ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ pEFNeo/wtIDUA และ pEFNeo/mutant *IDUA*

Plasmids ที่ต้องการทดสอบ ได้รับการใส่เข้าไปในเซลล์ (transfection) โดยใช้ Effectene (Qiagen) สำหรับปริมาณ plasmids ที่นำมาใช้ในการทำ transfection เป็นดังนี้ 0.8 $\mu\text{g}/\text{well}$ หลังจาก transfection เซลล์ได้รับการเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีระดับความเข้มข้นของ CO₂ ที่ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เซลล์ถูกทำให้สลายเพื่อแยกโปรตีน และนำไปทดสอบการทำงานของ เอนไซม์ IDUA ต่อไป

11.3 การศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ IDUA

วัดระดับการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีวัดค่าการเปล่งแสงของฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ 4-methylumbelliferyl-alpha-L-iduronide (Glycosynth) เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา การทดลองของแต่ละ constructs ที่นำมาศึกษาจะทำเป็น triplicate

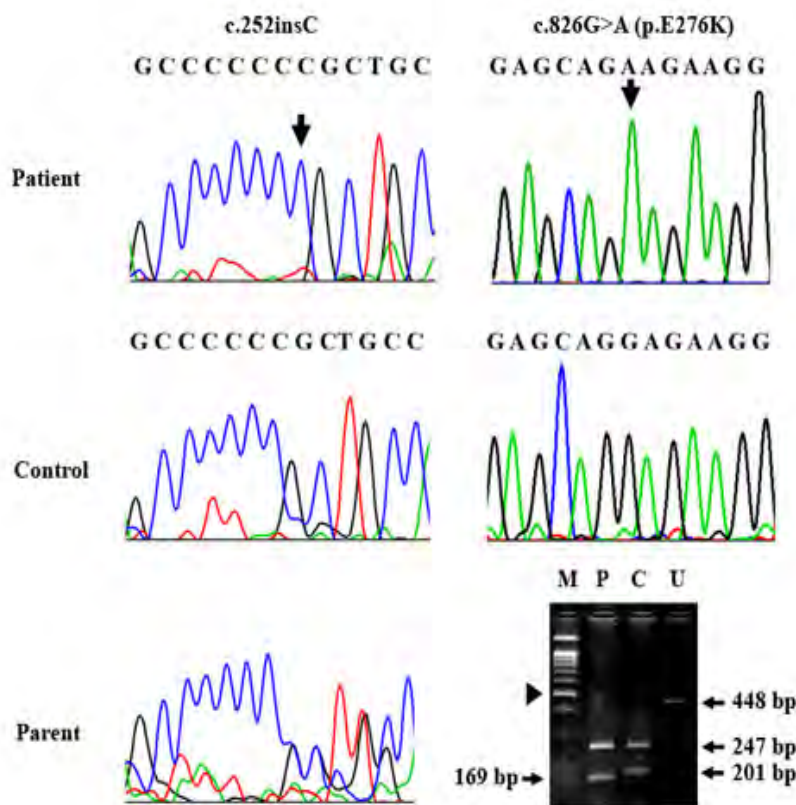
11.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลลำดับเบสได้รับการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Sequencher (version 4.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI)

ข้อมูลที่แสดงถึงระดับการทำงานของเอนไซม์ IDUA เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ค่าดังกล่าวได้รับการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากผู้ป่วยโรค MPS I และคนที่ไม่เป็นโรค

ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยในผู้ป่วยไทยกลุ่มอาการ mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 พบผู้ป่วยรายที่ 1 เป็นกลุ่มอาการ Hurler หรือ MPS IH ซึ่งมีอาการรุนแรงมากที่สุด และรายที่ 2 เป็นกลุ่มอาการ Scheie หรือ MPS IS ซึ่งมีอาการรุนแรงน้อยกว่า การยืนยันการวินิจฉัยโรคทำโดยการทดสอบทางเคมีและทางพันธุกรรม การตรวจหาการกลายพันธุ์พบว่าผู้ป่วย MPS IH มีการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ซึ่งเคยมีการรายงานมาก่อน ขณะที่ผู้ป่วย MPS IS มีการกลายพันธุ์ชนิด c.826G>A (p.E276K) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงาน (รูปที่ 1) เมื่อรวบรวมการศึกษาในผู้ป่วยไทยที่เป็น MPS IH การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC พบ 3 ใน 6 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 50 ของการกลายพันธุ์ที่พบ ซึ่งอาจจะบ่งบอกว่า การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในผู้ป่วยไทยที่เป็น MPS IH สำหรับการกลายพันธุ์ใหม่ชนิด p.E276K ไม่พบในคนไทยที่ไม่เป็นโรคจำนวน 50 คน (100 control chromosomes) ผลการทดสอบการทำงานของยีนที่สร้างเอนไซม์ alpha-L-iduronidase ในเซลล์ COS-7 พบการทำงานที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับยีนที่สร้างเอนไซม์ได้ปกติ (ตารางที่ 3) ซึ่งสนับสนุนการกลายพันธุ์ชนิด p.E276K เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ดังในบทความ (manuscript) เรื่อง “A novel IDUA mutation, c.826G>A, in a Thai patient with mucopolysaccharidosis type I” ที่แนบมา (ภาคผนวก)

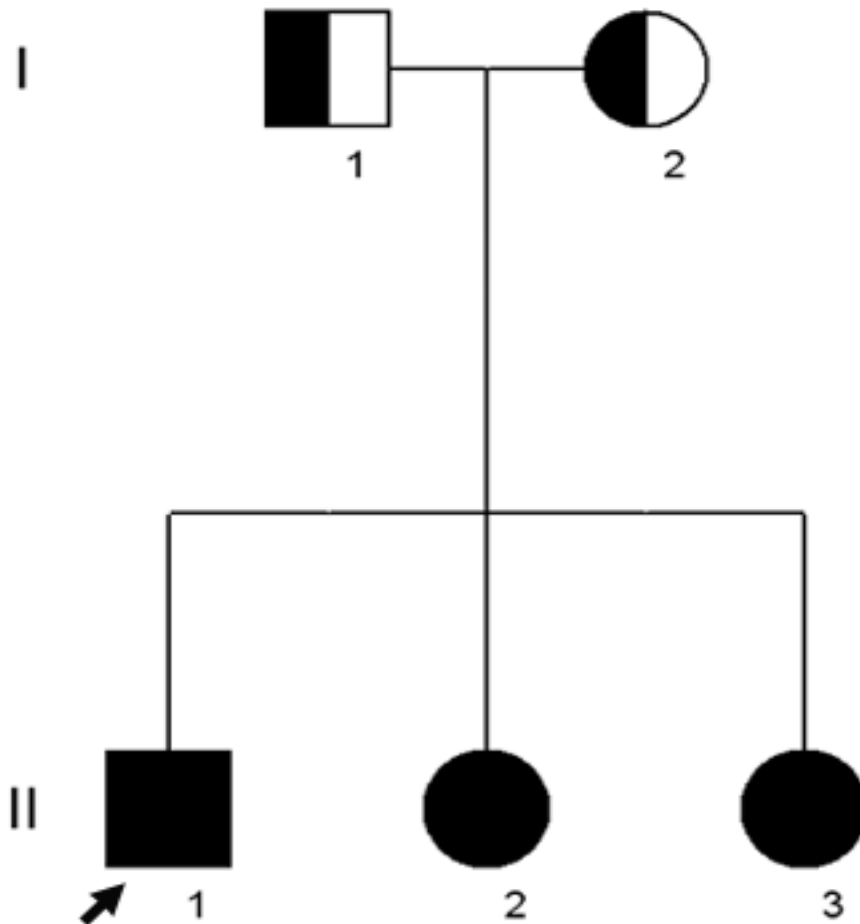


รูปที่ 1 การศึกษาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยกลุ่มอาการ mucopolysaccharidosis ชนิดที่ 1 (ด้านซ้าย) การกลายพันธุ์ชนิด c.252insC (ลูกศร) พบในผู้ป่วย MPS IH ซึ่งมีบิดาและมารดาเป็นพาหะ (ด้านขวา) การกลายพันธุ์ชนิด c.826G>A (p.E276K) (ลูกศร) พบในผู้ป่วย MPS IS
M=100-bp marker, P=patient, C=control, U=uncut amplified products หัวลูกศรชี้ขนาด 500 bp

ตารางที่ 3 α -L-iduronidase activity ในเซลล์ COS-7 ที่ได้รับการใส่ส่วนของ *IDUA* ที่ปกติหรือ *IDUA* ที่มีการกลายพันธุ์

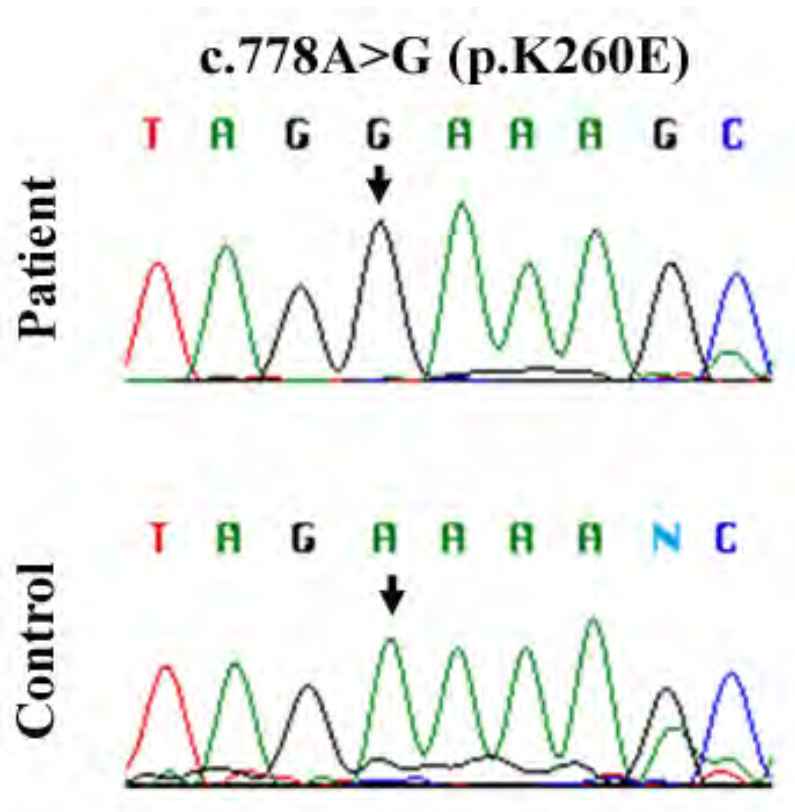
Constructs	α -L-iduronidase activity	Phenotype
	(nmol/h/mg cell protein) mean $\pm$ SD	
None	27.17 $\pm$ 4.89	-
pEFNeo	32.52 $\pm$ 10.58	-
pEFNeo/ <i>IDUA</i>	435.04 $\pm$ 56.23	-
pEFNeo/p.W402X	21.10 $\pm$ 12.57	Hurler
pEFNeo/p.E276K	31.88 $\pm$ 6.05	Scheie

การศึกษาในผู้ป่วยโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 พบครอบครัวผู้ป่วยไทยที่มีบุตรทั้ง 3 คนมีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 บิดาและมารดาแข็งแรง ไม่ได้เป็นญาติกัน พงสาวลีของครอบครัวสรุปได้ดังรูปที่ 2



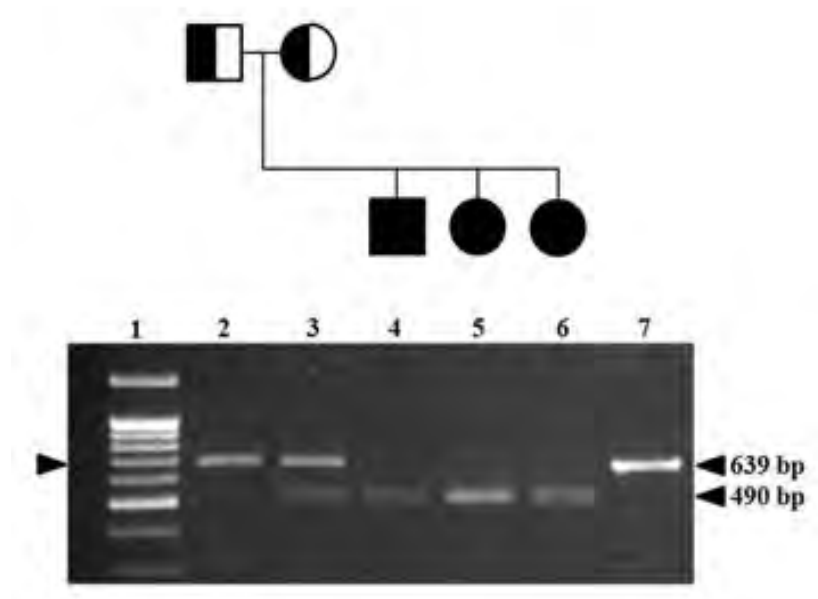
รูปที่ 2 แสดงพงสาวลีของครอบครัวที่มีสมาชิกเป็นโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2

ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี PCR-sequencing พบการกลายพันธุ์ชนิด missense ในยีน *SLC4A11* โดยมีการเปลี่ยนเบสนิวคลีโอไทด์จาก A เป็น G (c.778A>G) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 260 จากไลซีนเป็นกลูตามิก (p.K260E) ดังแสดงในรูปที่ 3



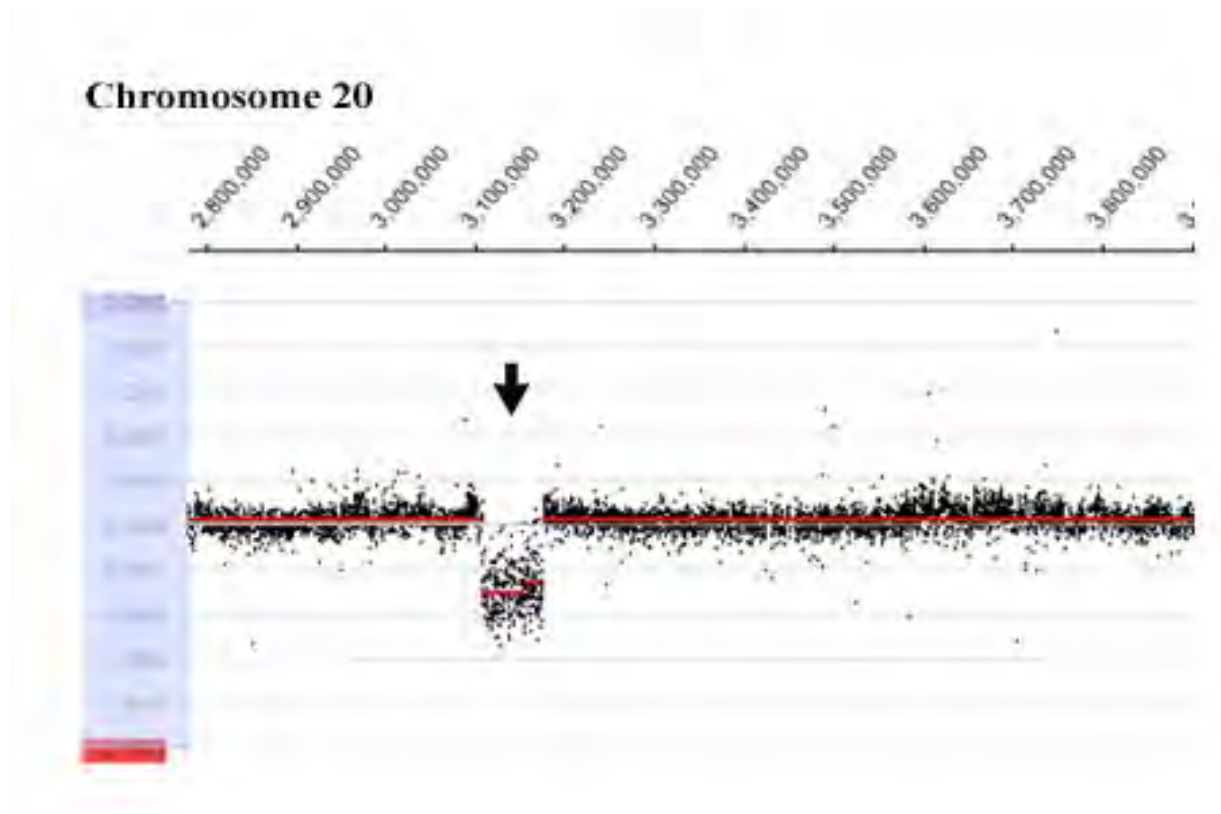
รูปที่ 3 แสดงการกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) ในยีน *SLC4A11* ซึ่งพบในผู้ป่วยโรค CHED2

การกลายพันธุ์ชนิดนี้ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จากการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *SLC4A11* ในบิดาและมารดาของผู้ป่วย พบการกลายพันธุ์ชนิด missense ในมารดา แต่ไม่พบในบิดา ดังแสดงในรูปที่ 4 นอกจากนี้ ได้ทำการหาลำดับเบสในบริเวณ promoter ของยีน *SLC4A11* ผล PCR-sequencing ไม่พบการกลายพันธุ์



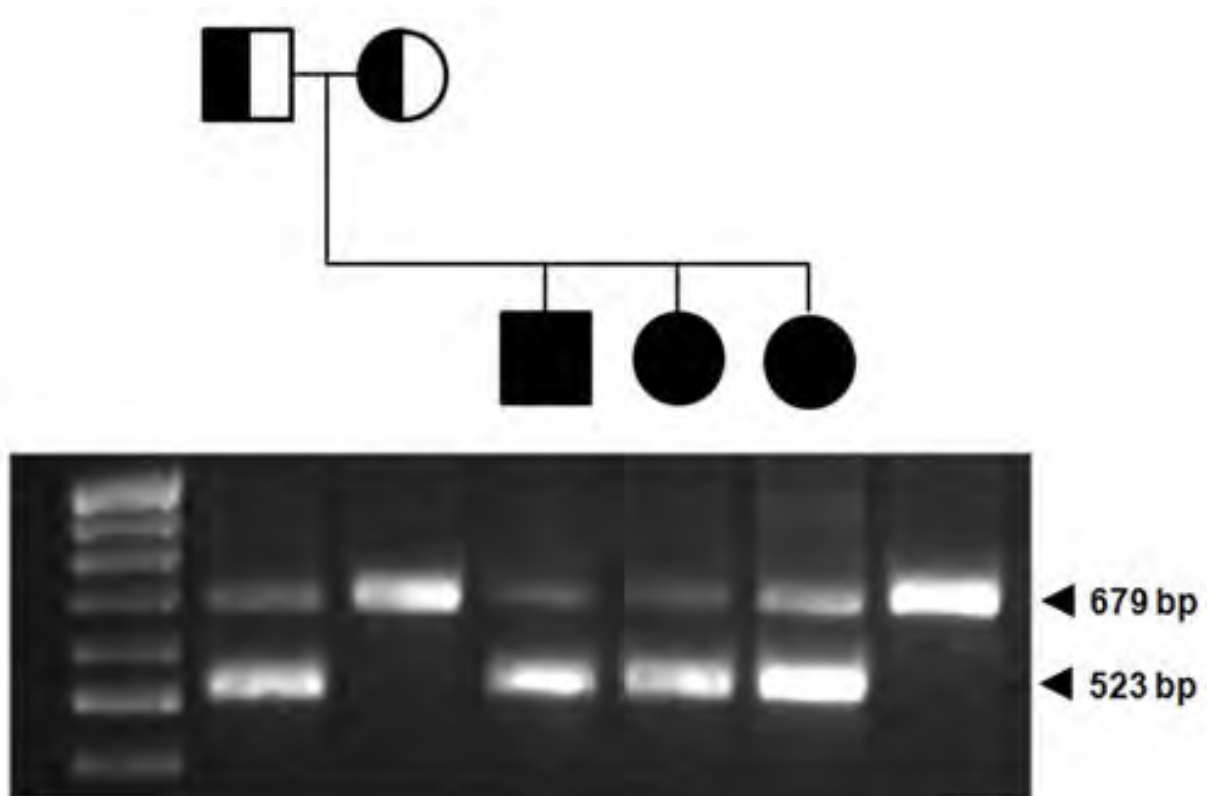
รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจการกลายพันธุ์ชนิด missense พบว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวพบในผู้ป่วยและในมารดา

จากข้อมูลนี้ เป็นไปได้ว่า บิดามีการขาดหายไป (deletion) ของยีน *SLC4A11* ทำให้พบการกลายพันธุ์เป็นในลักษณะ hemizygous deletion ผลการตรวจหา deletion บนโครโมโซมที่ 20 ในผู้ป่วยโดยวิธี array CGH พบ deletion ตั้งแต่บริเวณ 3107501 ถึง 3174468 ซึ่งมีขนาดประมาณ 67 กิโลเบส ครอบคลุมบริเวณที่มียีน *SLC4A11* (ตำแหน่ง 3156063-3166373_NCBI36/hg18) ทำให้เกิดการขาดหายไปทั้งยีน (whole gene deletion) ดังแสดงในรูปที่ 5



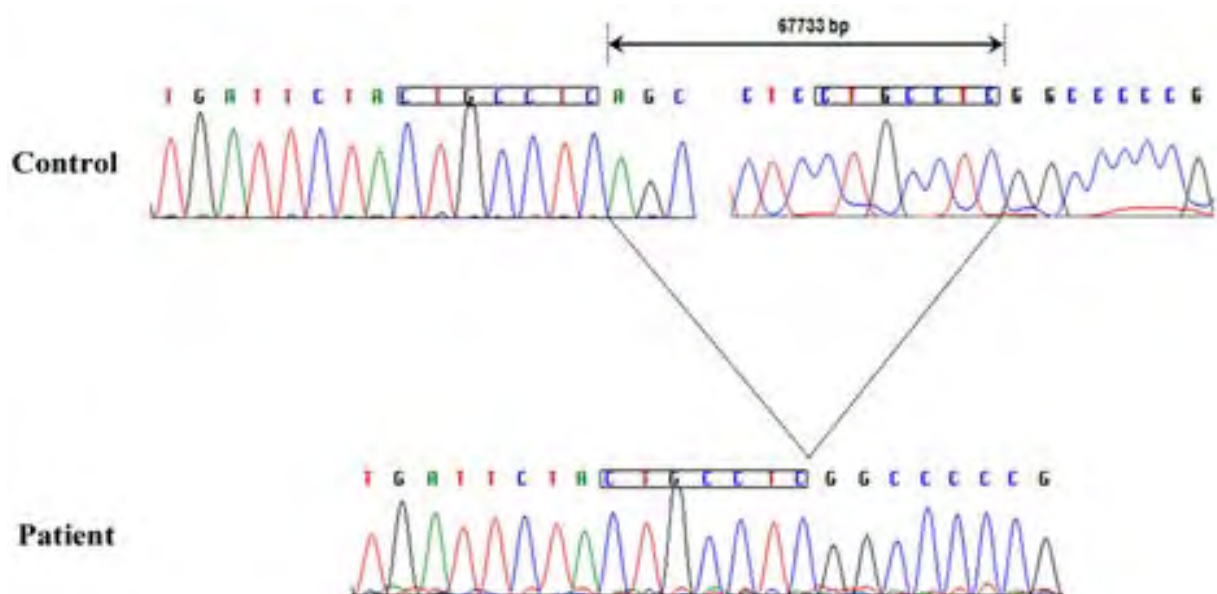
รูปที่ 5 array CGH แสดงการขาดหายไปของสารพันธุกรรมซึ่งบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยยีน *SLC4A11*

การกลายพันธุ์ชนิด deletion นี้ได้รับการยืนยันอีกครั้งโดยวิธี PCR และพบว่าผู้ป่วยทั้งสามราย และบิดามี deletion ดังกล่าว ในขณะที่ไม่พบ deletion ในมารดา ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การทดลองโดย PCR เพื่อยืนยัน deletion พบการขาดหายดังกล่าวในผู้ป่วยและบิดา

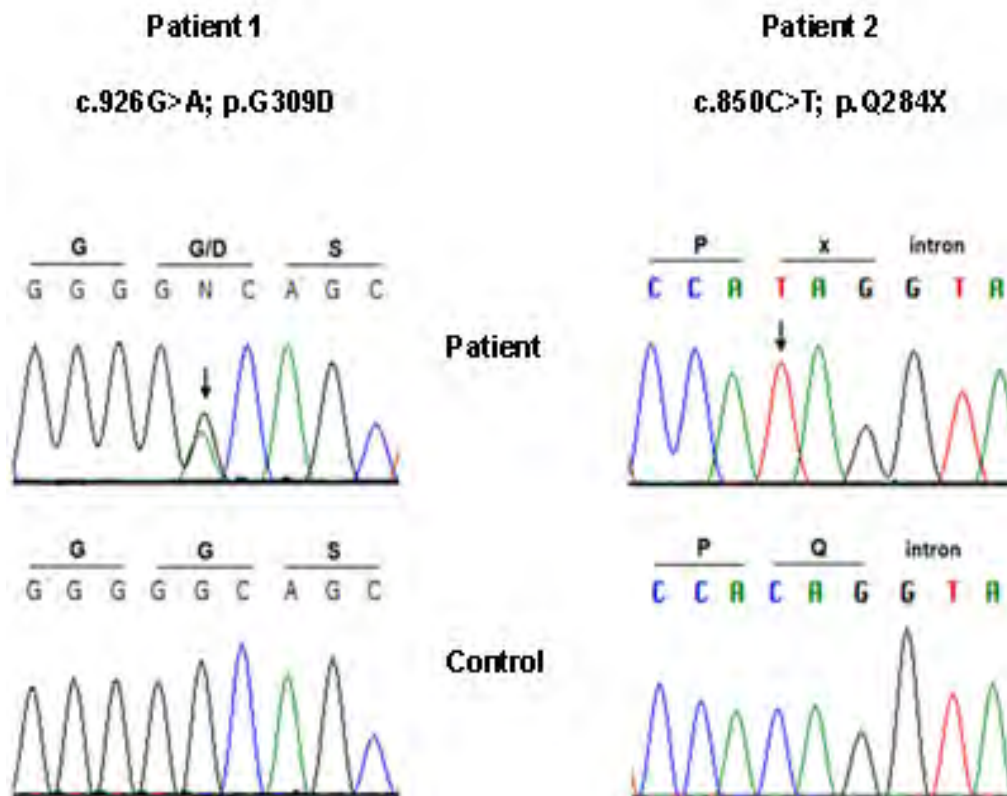
นอกจากนี้ได้ทำการหาจุดที่เกิดการขาดหายไป (deletion break points) ที่แน่นอนโดยวิธี PCR-sequencing พบการขาดหายไปมีขนาด 67,733 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 โครมาโตแกรมแสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่หายไปผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ปกติในผู้ที่ไม่เป็นโรค

จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่า ผู้ป่วยทั้ง 3 รายมีการกลายพันธุ์ในยีน *SLC4A11* ทั้ง 2 อัลลีล โดยพบการกลายพันธุ์ชนิด missense ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดา และการกลายพันธุ์ชนิด whole gene deletion ซึ่งได้รับมาจากบิดา ผลการศึกษาทั้งหมด ดังแสดงในบทความ (manuscript) เรื่อง “Two novel mutations including a large deletion of the *SLC4A11* gene causing autosomal recessive hereditary endothelial dystrophy” ที่แนบมา (ภาคผนวก)

การศึกษากการกลายพันธุ์ในยีน *CTNS* ในผู้ป่วยโรค cystinosis จำนวน 6 คนจากทั้งหมด 4 ครอบครัว ด้วยวิธี PCR-direct sequencing พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 อัลลีลซึ่งรวมทั้งการกลายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิดคือ c.926G>A (p.G309D) และ c.850C>T (p.Q284X) ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมแสดงการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยโรค cystinosis (ด้านซ้าย) การกลายพันธุ์ชนิด c.926G>A (p.G309D) (ด้านขวา) การกลายพันธุ์ชนิด c.850C>T (p.Q284X)

การวินิจฉัยโรคนี้อาศัยการตรวจตาที่พบผลึกที่มีลักษณะจำเพาะ (corneal crystals) และการเพิ่มขึ้นของระดับ cystine ในเม็ดเลือดขาว ลักษณะอาการและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ สรุปได้ดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางแสดงลักษณะอาการและการกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วยโรค cystinosis

Patient/ Ethnic group	Age of onset	Type	Inbred	WBC Cystine ¹	DNA change	Amino acid change	Novel
1/Thai	9 mo	Nephro- pathic	No	4.5	c.926G>A/ c.969C>G	p.G309D/ p.N323K	Yes No
2/Thai	7 mo	Nephro- pathic	Yes	NA	c.850C>T/ c.850C>T	p.Q284X/ p.Q284X	Yes Yes
3/Thai	15 mo	Nephro- pathic	No	NA	c.18-21del/ c.971- 12G>A	T7fsX13	No No
4/Cam- bodian	13 y	Inter- mediate	Yes	0.5	c.969C>G/ c.969C>G	p.N323K/ p.N323K	No
5/Cam- bodian	10 y	Inter- mediate	Yes	0.5	c.969C>G/ c.969C>G	p.N323K/ p.N323K	No
6/Cam- bodian	18 mo	Inter- mediate	Yes	0.6	c.969C>G/ c.969C>G	p.N323K/ p.N323K	No

¹Nanomoles of half-cystine/mg of WBC protein. Normal values are <0.2 and heterozygous values are less than 1.0.

ผลการศึกษาทั้งหมด ดังแสดงในบทความ (manuscript) เรื่อง “Two novel *CTNS* mutations in cystinosis patients in Thailand” ที่แนบมา (ภาคผนวก)

บทวิจารณ์

การศึกษาในผู้ป่วยโรค MPS ชนิดที่ 1 ที่มีอาการรุนแรง (MPS IH) พบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ในยีน *IDUA* ของผู้ป่วยทั้งสองอัลลีล และพบการกลายพันธุ์ใหม่ชนิด c.826G>A (p.E276K) ในผู้ป่วยที่เป็น MPS ชนิดที่ 1 ที่มีอาการรุนแรงน้อย (MPS IS) ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้ทำให้การทำงานของเอนไซม์ *IDUA* ลดลง

ก่อนหน้านี้ ได้มีการรายงานผู้ป่วยไทย 2 รายที่เป็น MPS IH และพบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC ร่วมด้วย²⁴ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวร่วมกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบการกลายพันธุ์ชนิด c.252insC เป็นจำนวนร้อยละ 50 (3 ใน 6 อัลลีล) เป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์นี้เป็นการกลายพันธุ์ที่พบ

บ่อยในผู้ป่วยไทยที่เป็น MPS IH การศึกษาหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่เป็น MPS IH จำนวนมากขึ้น จะทำให้ได้ข้อสรุปที่แน่ชัด ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยโดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย สำหรับผู้ป่วยที่เป็น MPS ชนิดที่ 1 ที่มีอาการรุนแรงน้อย พบมีการกลายพันธุ์ใหม่ชนิด c.826G>A (p.E276K) มีหลักฐานที่สนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค หลักฐานแรก คือ การที่ไม่พบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 50 คนหรือ 100 โครโมโซม หลักฐานที่สอง คือ การที่ตำแหน่ง 276 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนกลูตามิกเป็นตำแหน่งที่สงวน (conserved) และหลักฐานที่สำคัญที่สุด คือ เมื่อใส่ส่วนของ cDNA ของยีน *IDUA* ซึ่งมีการกลายพันธุ์ชนิด p.E276K เข้าไปในเซลล์ COS-7 พบว่า การทำงานของเอนไซม์ *IDUA* ลดลง การศึกษานี้ได้เพิ่มจำนวนการกลายพันธุ์ของยีน *IDUA* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค MPS ชนิดที่ 1

การศึกษาผู้ป่วยโรค congenital hereditary endothelial dystrophy ชนิดที่ 2 จำนวน 3 รายจาก 1 ครอบครัว พบการกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) และการขาดหายไปซึ่งมีขนาดประมาณ 68 กิโลเบส ครอบคลุมยีน *SLC4A11* การกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

การกลายพันธุ์ชนิด c.778A>G (p.K260E) ในผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดมาจากมารดา หลักฐานที่สนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ประกอบด้วย การกลายพันธุ์นี้ไม่พบในผู้ที่ไม่เป็นโรคจำนวน 50 คนหรือ 100 โครโมโซม กรดอะมิโนไลซีนที่ตำแหน่ง 260 เป็นบริเวณที่ conserved การกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนตัวของกรดอะมิโนจากประจุบวกเป็นประจุลบ การทำนายผลกระทบของการกลายพันธุ์โดยโปรแกรม PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) และ SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) พบการกลายพันธุ์มีผลต่อการทำงานของโปรตีนโดยมีคะแนน 1.000 โดยใช้โปรแกรม PolyPhen-2 และ 0.91 โดยใช้โปรแกรม SIFT

การศึกษาก่อนหน้านี้เพื่อหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้กับ CHED2 โดยวิธี PCR-sequencing บริเวณที่สร้างโปรตีนและบริเวณ promoter ของยีน *SLC4A11* ไม่พบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยบางราย^{11-13, 16, 25} หลักฐานที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ได้ชี้บ่งว่าการขาดหายไปของยีน *SLC4A11* อีกหนึ่งอัลลีล เป็นสาเหตุของการเกิดโรค CHED2 การศึกษาโดยวิธี array CGH พบการขาดหายไปซึ่งมีขนาด 68 กิโลเบส ครอบคลุมยีน *SLC4A11* โดยได้รับการถ่ายทอดมาจากบิดา การทดลองเพิ่มเติมโดย PCR-directing sequencing สามารถพบตำแหน่งที่ขาดหายไปได้แน่นอนซึ่งมีขนาด 67,733 เบส บริเวณที่ขาดหายไปนี้อยู่ในบริเวณที่ได้มีการรายงานว่าเป็น deletion polymorphism ในฐานข้อมูล Database of Genomic Variant (DGV) (variation_5121). นอกจากนี้ พบมีส่วนที่ขาดหายไปขนาดแตกต่างกันอีก 4 แบบในบริเวณดังกล่าว การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า copy number variations (CNVs) ซึ่งรวมถึง microdeletions และ microduplications เป็นสาเหตุสำคัญของความผันแปรทางโครงสร้างพันธุกรรมของมนุษย์^{26, 27} นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาหลายชิ้นได้บ่งชี้ว่า deletion polymorphisms อาจจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดลักษณะที่มีสาเหตุจากพหุปัจจัยและวิวัฒนาการด้านจีโนม.²⁸⁻³¹ นอกจากนี้ ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมในลักษณะด้อย เช่น ยีน *NEB* ในโรค nemaline myopathy และ ยีน *GCNT2* ใน congenital cataracts และ i blood group พบมีชนิดของ

การขาดหายไปในลักษณะดังกล่าว³²⁻³⁵ การขาดหายไปที่เป็น microdeletion ในบริเวณที่พบจากการศึกษานี้ อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับโรค CHED2 ในผู้ป่วยก่อนหน้านี้ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ในส่วนที่สร้างโปรตีนของยีน *SLC4A11* การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสัดส่วนของการขาดหายไปที่เป็นสาเหตุของโรค CHED2 จะเป็นข้อมูลสำคัญในการพิจารณาเพื่อพัฒนาขั้นตอนหรือกระบวนการทดสอบทางพันธุกรรมในผู้ป่วยโรค CHED2 นำไปสู่การให้การวินิจฉัยและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *CTNS* ในผู้ป่วย 6 รายจาก 4 ครอบครัว พบการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด โดย 2 ชนิด ได้แก่ ชนิด c.926G>A (p.G309D) และ ชนิด c.850C>T (p.Q284X) เป็นการกลายพันธุ์ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน โปรแกรม PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) ได้ทำนายว่า การกลายพันธุ์ชนิด c.926G>A (p.G309D) น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค โดยมีคะแนน 0.999 และตำแหน่งของกรดอะมิโนเป็นตำแหน่งที่สงวน (conserved) สำหรับการกลายพันธุ์ชนิด c.850C>T (p.Q284X) ทำให้เกิดการเปลี่ยนจากกลูตามีนที่ตำแหน่ง 284 เป็นรหัสหยุด การศึกษานี้ได้พบลักษณะการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึงความรุนแรงของอาการในผู้ป่วยได้และพบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในผู้ป่วยไทย

Output จากโครงการวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า)

ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้วจำนวน 2 เรื่อง โปรดดูในภาคผนวก

- Yeetong P, Tongkobpetch S, Kingwatanakul P, Deekajorndech T, Bernardini IM, **Suphapeetiporn K***, Gahl WA, Shotelersuk V. Two novel CTNS mutations in cystinosis patients in Thailand. Gene. 2012;499(2):323-5.

-Prommajan K, Ausavarat S, Srichomthong C, Puangsricharern V, **Suphapeetiporn K***, Shotelersuk V. A novel p.E276K IDUA mutation decreasing α -L-iduronidase activity causes mucopolysaccharidosis type I. Mol Vis. 2011;17:456-60.

บทความที่อยู่ในระหว่างการพิจารณาตีพิมพ์ (submitted) จำนวน 1 เรื่อง โปรดดูในภาคผนวก

-Puangsricharern V, Yeetong P, Charumalai C, **Suphapeetiporn K***, Shotelersuk V. Two novel mutations including a large deletion of the SLC4A11 gene causing autosomal recessive hereditary endothelial dystrophy (submitted)

*Corresponding author

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)

ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เพื่อพัฒนาการวินิจฉัย การดูแลรักษา และการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรมแก่ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของแก้วตาที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ เช่น โรค congenital hereditary endothelial dystrophy โรค mucopolysaccharidosis และ โรค cystinosis เป็นต้น ขณะนี้ ห้องปฏิบัติการหน่วยเวชพันธุศาสตร์และเมแทบอลิซึม สามารถเปิดให้บริการการทดสอบทางพันธุกรรมสำหรับโรคต่างๆ เหล่านี้

-เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)

ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปอ้างอิงในการลงทะเบียนผู้ป่วยและสร้างฐานข้อมูลซึ่งจะนำไปใช้ในการกำหนดนโยบายเพื่อช่วยเหลือผู้ป่วยที่เป็นโรคพันธุกรรมโดยเฉพาะกลุ่มโรคพันธุกรรมเมแทบอลิกให้เข้าถึงการรักษา ซึ่งทางเครือข่ายเวชพันธุศาสตร์ได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง

-เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)

ได้มีการสร้างเครือข่ายความร่วมมือเพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ และให้ความรู้แก่ประชาชน เช่น โครงการวันโรคหายาก ประเทศไทย จัดขึ้นปีละ 1 ครั้ง โดยความร่วมมือของเครือข่ายเวชพันธุศาสตร์ ซึ่งประกอบด้วย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และโรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สมาคมพันธุศาสตร์ และการจัดงานเสวนา “ผู้ป่วยโรคพันธุกรรมแอลเอสดี” ปีละ 1 ครั้ง โดยความร่วมมือของมูลนิธิโรคพันธุกรรมแอลเอสดี องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยได้นำมาแลกเปลี่ยนเรียนรู้ระหว่างสถาบันต่างๆ และเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน

-เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

องค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยได้นำมาพัฒนาการเรียนการสอนด้านอณูพันธุศาสตร์และเวชพันธุศาสตร์ในระดับปริญญาบัณฑิต (นิสิตแพทย์) และระดับบัณฑิตศึกษา (นิสิตปริญญาโท นิสิตปริญญาเอก และแพทย์ประจำบ้าน) โดยเพิ่มในส่วนของเนื้อหาให้ทันสมัย และวิธีการเรียนรู้โดยใช้เป็นกรณีศึกษาเพื่อเสริมความเข้าใจให้กับผู้เรียนและทำให้ผู้เรียนเห็นความสำคัญของการวิจัยเพื่อให้ได้องค์ความรู้ นำไปสู่การพัฒนาการดูแลรักษาผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ โครงการวิจัยนี้ ได้เป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนานิสิตซึ่งเป็นผู้ร่วมวิจัย ให้สามารถเตรียมความพร้อมเป็นนักวิจัย โดยฝึกทักษะในหลายๆด้าน เช่น การค้นคว้าหาความรู้ การทดลองในห้องปฏิบัติการ การรวบรวมข้อมูล การวิเคราะห์ การแปลผล และการเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ เป็นต้น

-อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือการจดสิทธิบัตร)

การนำเสนอผลงานในรูปแบบบรรยาย เรื่อง “Inherited corneal disorders” ในงานประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” วันที่ 17 ตุลาคม 2556 ณ เดอะริเจนท์ชะอำปีร์รี่สอร์ทหัวหิน ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

ผลงานส่วนหนึ่งได้เผยแพร่ในหนังสือ “พันธุศาสตร์ในเวชปฏิบัติ Genetics in Clinical Practice” พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทปิยอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์ จำกัด, 2556.

เอกสารอ้างอิง

1. Desir J, Abramowicz M. Congenital hereditary endothelial dystrophy with progressive sensorineural deafness (Harboyan syndrome). *Orphanet J Rare Dis.* **2008**;3:28
2. Maumenee AE. Congenital hereditary corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol.* **1960**;50:1114-24
3. Ehlers N, Modis L, Moller-Pedersen T. A morphological and functional study of Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy. *Acta Ophthalmol Scand.* **1998**;76:314-8
4. Callaghan M, Hand CK, Kennedy SM, FitzSimon JS, Collum LM, Parfrey NA. Homozygosity mapping and linkage analysis demonstrate that autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) and autosomal dominant CHED are genetically distinct. *Br J Ophthalmol.* **1999**;83:115-9
5. Hand CK, Harmon DL, Kennedy SM, FitzSimon JS, Collum LM, Parfrey NA. Localization of the gene for autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2) to chromosome 20 by homozygosity mapping. *Genomics.* **1999**;61:1-4
6. Toma NM, Ebenezer ND, Inglehearn CF, Plant C, Ficker LA, Bhattacharya SS. Linkage of congenital hereditary endothelial dystrophy to chromosome 20. *Hum Mol Genet.* **1995**;4:2395-8
7. Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, et al. Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet.* **2006**;38:755-7
8. Park M, Li Q, Shcheynikov N, Muallem S, Zeng W. Borate transport and cell growth and proliferation. Not only in plants. *Cell Cycle.* **2005**;4:24-6
9. Chai SM, Vithana EN, Venkataraman D, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: SLC4A11. Disease: Corneal endothelial dystrophy 2. *Hum Genet.* **2010**;127:110
10. Aldahmesh MA, Khan AO, Meyer BF, Alkuraya FS. Mutational spectrum of SLC4A11 in autosomal recessive CHED in Saudi Arabia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2009**;50:4142-5
11. Shah SS, Al-Rajhi A, Brandt JD, et al. Mutation in the SLC4A11 gene associated with autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy in a large Saudi family. *Ophthalmic Genet.* **2008**;29:41-5
12. Hemadevi B, Veitia RA, Srinivasan M, et al. Identification of mutations in the SLC4A11 gene in patients with recessive congenital hereditary endothelial dystrophy. *Arch Ophthalmol.* **2008**;126:700-8

13. Sultana A, Garg P, Ramamurthy B, Vemuganti GK, Kannabiran C. Mutational spectrum of the SLC4A11 gene in autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy. *Mol Vis.* **2007;13:1327-32**
14. Ramprasad VL, Ebenezer ND, Aung T, et al. Novel SLC4A11 mutations in patients with recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Mutation in brief #958*. Online. *Hum Mutat.* **2007;28:522-3**
15. Kumar A, Bhattacharjee S, Prakash DR, Sadanand CS. Genetic analysis of two Indian families affected with congenital hereditary endothelial dystrophy: two novel mutations in SLC4A11. *Mol Vis.* **2007;13:39-46**
16. Jiao X, Sultana A, Garg P, et al. Autosomal recessive corneal endothelial dystrophy (CHED2) is associated with mutations in SLC4A11. *J Med Genet.* **2007;44:64-8**
17. Aldave AJ, Yellore VS, Bourla N, et al. Autosomal recessive CHED associated with novel compound heterozygous mutations in SLC4A11. *Cornea.* **2007;26:896-900**
18. Neufeld EF M, J. The mucopolysaccharidoses. 8 ed. Scriver CR BA, Sly WS, Valle D editor. New York: McGraw-Hill; **2001**.
19. Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, et al. Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991;88:9695-9**
20. Scott HS, Guo XH, Hopwood JJ, Morris CP. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics.* **1992;13:1311-3**
21. Scott HS, Nelson PV, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP. Multiple polymorphisms within the alpha-L-iduronidase gene (IDUA): implications for a role in modification of MPS-I disease phenotype. *Hum Mol Genet.* **1993;2:1471-3**
22. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med.* **2002;347:111-21**
23. Town M, Jean G, Cherqui S, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet.* **1998;18:319-24**
24. Ketudat Cairns JR, Keeratichamroen S, Sukcharoen S, et al. The molecular basis of mucopolysaccharidosis type I in two Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **2005;36:1308-12**
25. Paliwal P, Sharma A, Tandon R, et al. Congenital hereditary endothelial dystrophy - mutation analysis of SLC4A11 and genotype-phenotype correlation in a North Indian patient cohort. *Mol Vis.* **2010;16:2955-63**

26. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* **2004;36:949-51**
27. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* **2004;305:525-8**
28. Olson MV. When less is more: gene loss as an engine of evolutionary change. *Am J Hum Genet.* **1999;64:18-23**
29. Yu CE, Dawson G, Munson J, et al. Presence of large deletions in kindreds with autism. *Am J Hum Genet.* **2002;71:100-15**
30. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* **2007;316:445-9**
31. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science.* **2008;320:539-43**
32. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* **2005;37:727-32**
33. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet.* **2006;38:75-81**
34. Borck G, Kakar N, Hoch J, et al. An Alu repeat-mediated genomic GCNT2 deletion underlies congenital cataracts and adult i blood group. *Hum Genet.* **2012;131:209-16**
35. Kiiski K, Laari L, Lehtokari VL, et al. Targeted array comparative genomic hybridization--a new diagnostic tool for the detection of large copy number variations in nemaline myopathy-causing genes. *Neuromuscul Disord.* **2013;23:56-65**

ภาคผนวก

**Two novel mutations including a large deletion of the
SLC4A11 gene causing autosomal recessive hereditary
endothelial dystrophy**

Journal:	<i>British Journal of Ophthalmology</i>
Manuscript ID:	bjophthalmol-2014-305584
Article Type:	Laboratory science
Date Submitted by the Author:	24-May-2014
Complete List of Authors:	Puangsricharn, Vilavun; Chulalongkorn University, Yeetong, Patra; Chulalongkorn University, Charumalai, Chonticha; Chulalongkorn University, Suphapeetiporn, Kanya; Chulalongkorn University, Pediatrics Shotelersuk, Vorasuk; Chulalongkorn University,
Keywords:	Cornea, Genetics

Two novel mutations including a large deletion of the *SLC4A11* gene causing autosomal recessive hereditary endothelial dystrophy

Vilavun Puangsricharn,^{1,2†} Patra Yeetong,^{3†} Chonticha Charumalai,¹ Kanya Suphapeetiporn,^{4,5*} Vorasuk Shotelersuk^{4,5}

¹Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

²Center of Excellence for Cornea and Limbal Stem Cell Transplantation, King Chulalongkorn Memorial Hospital, the Thai Red Cross Society

³Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University

⁴Center of Excellence for Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁵Excellence Center for Medical Genetics, King Chulalongkorn Memorial Hospital, the Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Kanya Suphapeetiporn, MD, PhD. Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Tel: 662-256-4951; Fax: 662-256-4911; E-mail: kanya.su@chula.ac.th

Keywords: Congenital hereditary endothelial dystrophy, CHED2, *SLC4A11*, novel mutations, a whole gene deletion

Running title: Two novel mutations causing CHED2

Abstract

Aims To characterize the clinical and molecular features of three affected individuals from a non-consanguineous Thai family with autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2).

Methods Physical and slit-lamp examinations were performed in all three affected siblings and their parents. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The entire coding and putative promoter regions of the solute carrier family 4 (sodium borate cotransporter) member 11 (*SLC4A11*) gene were subjected to PCR and direct sequencing. Array CGH on chromosome 20 of the patient's DNA was also performed.

Results All three patients were found to harbor two novel pathogenic mutations. The c.778A>G mutation inherited from the mother was expected to result in a lysine to glutamic acid substitution (p.K260E) at codon 260. It was not identified in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes. The lysine residue at codon 260 was evolutionarily highly conserved. The 68-kb deletion encompassing the whole *SLC4A11* gene inherited from the father was the largest deletion described to date identified in patients with CHED2.

Conclusions This study reported two newly identified mutations in a Thai family with CHED2, extending the mutational spectrum of *SLC4A11*. As there are previously reported CHED2 patients with undetected *SLC4A11* mutations using conventional PCR-sequencing techniques, further analysis to identify chromosomal deletions in these patients is warranted.

INTRODUCTION

Congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED) is an inherited disorder of the corneal endothelium, characterized by bilateral non-inflammatory corneal clouding ranging from a diffuse haze to a ground-glass, milky appearance. CHED can be inherited either as an autosomal dominant (CHED1; MIM 121700) or recessive (CHED2; MIM 217700) manner. CHED2 is more common and severe, usually presenting at birth or early infancy. Bilateral corneal clouding can lead to visual impairment often accompanied by nystagmus in CHED2 patients requiring corneal transplantation.^{1 2}

Mutations in the solute carrier family 4 (sodium borate cotransporter) member 11 (*SLC4A11*) gene have been identified in most of the patients with CHED2.^{3 4} The *SLC4A11* gene contains 18 coding exons and encodes the bicarbonate transporter-related protein 1 (BTR1) of 891 amino acids. Its protein product is also called NaBC1, known to function as a membrane bound electrogenic sodium-borate cotransporter, involved in cell growth and proliferation by increasing intracellular borate and activating the mitogen-activated protein kinase pathway.⁵ Interestingly, *SLC4A11* gene mutations have also been reported to be causative for two different inherited corneal disorders; corneal dystrophy and perceptive deafness (CDPD, MIM 217400) or Harboyan syndrome and dominant late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD4, MIM 613268).^{6 7}

At least 80 different disease-causing mutations scattered throughout the *SLC4A11* gene have been described with the most common being missense mutations (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>, accessed May, 2014). The nonsense, splice-junction alterations, nucleotide deletions or insertions and exon deletions have also been reported. The

1
2
3 *SLC4A11* has been the only gene found to be responsible for CHED2. With PCR-sequencing of
4
5 the entire coding and putative promoter regions of the *SLC4A11* gene, there were, however,
6
7 some clinically-confirmed CHED2 patients with undetected mutations in the *SLC4A11* gene.^{4 8-}
8
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Here, we reported three affected siblings from a Thai family with CHED2. Two novel
alterations in the *SLC4A11* gene including a missense mutation and a 68-kb deletion
encompassing the whole *SLC4A11* gene and its putative promoter were identified. This is the
first study to describe the deletion covering the large genomic region associated with CHED2.

24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

METHODS

Patients and controls

Three affected individuals with CHED2 from a non-consanguineous Thai family were reported.
The pedigree is shown in figure 1A. A diagnosis of CHED was made by clinical course and
features and histopathological findings. The study was approved by the institutional review
board of the Faculty of Medicine of Chulalongkorn University and written informed consent was
obtained from all the patients and parents. The study was conducted in accordance with the
tenets of the Declaration of Helsinki.

All three siblings were referred to King Chulalongkorn Memorial Hospital at the age of
7, 17 and 20 years, respectively. All were reported to have corneal haze since birth. Nystagmus
was present in the 20-year-old brother and the 7-year-old sister. None had sensorineural hearing
loss. Corneal pachymetry revealed increased corneal thickness in all three individuals (> 1000
μm). All had normal intraocular pressure (below 21 mmHg). Both parents had clear corneas

and denied a family history of corneal disorders. The clinical features of three patients were summarized in Table 1

The youngest sibling (7-year-old) had a visual acuity of counting fingers at 2 and 1.5 feet in the right and left eye, respectively. She had horizontal nystagmus with esotropia of 30 prism diopters. There were bilateral corneal haziness and thickening with microcystic edema of the epithelium (figure 1B-C). Her vertical and horizontal corneal diameters were 10 and 11 millimeters, respectively. She received a penetrating keratoplasty of the right eye two years later (figure 1D). Histopathological examination of the excised corneal buttons revealed widening of the stroma and marked thickening of the Descemet’s membrane. The corneal tissues had completely absent endothelium (figure 1E). The electron microscopic findings were consistent with the diagnosis of CHED2 (figure 1F).

An *in vivo* confocal microscopy of the left cornea of the elder brother revealed multiple hypo-reflective bullae in the epithelial layer, and loss of sub-basal epithelial nerve plexus (figure 1G). There was a reduction in the number of stromal keratocytes and loss of normal stromal structures which were replaced by hyper-reflective interwoven bands resembling a “honey-comb” appearance (figure 1H). The endothelial cells could not be demonstrated.

Mutation analysis of *SLC4A11* using PCR-direct sequencing

After informed consent, peripheral blood samples were collected from three affected siblings and their parents. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the ArchivePure DNA Blood Kit according to manufacturer’s instructions (5 Prime Inc., Gaithersburg, MD). Direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products representing the entire coding region of *SLC4A11* was performed. We used the primers from the

previous study⁴ except for the primers for exon 1 which were designed using Primer3 (v. 0.4.0) software (Table 2). The PCR products were treated with ExoSAP-IT (USP Corporation, Cleveland, OH) and directly sequenced at the Macrogen, Inc. (Seoul, Korea). The identified mutation was confirmed by direct sequencing in the opposite direction. PCR-RFLP analysis with the restriction enzyme *AvrII* was used to confirm the presence of the novel missense mutation in the patients and to screen in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes. Specific primers were used to amplify two regions that were predicted to be the *SLC4A11* promoter from the previous study.⁹ The PCR products were sent for sequencing at the Macrogen, Inc. (Seoul, Korea).

Array comparative genomic hybridization (CGH)

Genomic DNA of the patient (II-2) was sent to Macrogen Inc. (Seoul, Korea) for array CGH analysis on chromosome 20 using NimbleGen 385K, according to the company's instruction. Briefly, genomic DNA was labeled with fluorescent dyes, co-hybridized to a NimbleGen Human CGH 385K Chromosome 20 Tiling array, and scanned using a 2- μ m scanner. Log₂-ratio values of the probe signal intensities (Cy3/Cy5) were calculated and plotted versus genomic position using Roche NimbleGen NimbleScan 2.5 software. Data were displayed in Roche NimbleGen SignalMap software. The deletion breakpoints were further analyzed by PCR using three newly designed primers (Table 2). A primer pair, SLC4A11_Deletion-F and SLC4A11_No Del-R, was designed to amplify the non-deleted allele giving the PCR product of 679 bp and another primer pair, SLC4A11_Deletion-F and SLC4A11_Del-R, was used to detect the deleted allele giving the PCR product of 523 bp.

RESULTS

Direct sequencing of PCR products covering the entire coding region of the *SLC4A11* gene revealed a novel c.778A>G mutation in exon 8. This mutation was expected to result in a lysine to glutamic acid substitution (p.K260E) at codon 260 (figure 2A). No other variants were observed. PCR-RFLP analysis with the restriction enzyme *AvrII* of the patients and parents' genomic DNA showed that the mutation was present in all three affected siblings and the mother but was absent in the father (figure 2B). This mutation was not identified in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes (data not shown). It is located at a highly conserved residue (figure 2C) within the anion exchange domain which was predicted with Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) software. As only one mutant allele transmitted from the mother was detected, PCR-sequencing of the putative promoter region was performed and revealed no pathogenic variants.

The fact that direct sequencing of the entire coding region and the putative promoter of the *SLC4A11* gene demonstrated only the c.778A>G (p.K260E) mutation which was inherited from the mother suggested that the patients were hemizygous for the mutant allele. In addition, there were no other heterozygous variants identified. These results prompted us to investigate the possibility of a whole gene deletion occurring in the other allele. Further experiments using array CGH covering chromosome 20 revealed that the patient (II-2) had a chromosomal deletion from position 3107501-3174468 which included the region where the *SLC4A11* gene was located (3156063-3166373_NCB136/hg18) (figure 3A). This loss of chromosomal region is in the structure variant (variation_5121, deletion type, 3076070-3238538_NCB136/hg18) which has been reported in Database of Genomic Variants (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

The presence of the heterozygous deletion was verified in all of the patients by PCR analysis across the predicted deletion points. The size of the PCR products was 523 bp and 679 bp for the deleted and non-deleted alleles, respectively (figure 3B-C). The deletion was present in the father but absent in the mother (figure 3C). We also attempted to identify the precise breakpoints of the deletion by direct sequencing (figure 3D) and confirmed the deletion size of 67,733 base pairs.

DISCUSSION

We described three affected siblings from a Thai non-consanguineous family with CHED2. All were compound heterozygous for a single base pair transition (c.778A>G; p.K260E) and a 68-kb deletion encompassing the *SLC4A11* gene. Both mutations have never been previously described.

The newly identified missense variant was inherited from the patients' mother. Several lines of evidence support the variant as the disease-causing mutation. It was not identified in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes. ClustalX showed the lysine residue at codon 260 which was conserved from *Homo sapiens* to *Caenorhabditis elegans* (figure 2C). The mutation changes polarity of the amino acid residue from a positive charge to a negative charge. PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predicted the variant (c.778A>G; p.K260E) to be probably damaging with a score of 1.000 and SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) predicted it to be deleterious with a score of 0.91.

Previous studies have failed to identify pathogenic mutations in some patients with clinically-confirmed CHED2 using conventional PCR-sequencing of the entire coding and the putative promoter regions of *SLC4A11*.^{4 8-11} The *SLC4A11* has been the only gene found to be

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

responsible for CHED2. The evidence derived from studies in this CHED2 family suggested us to investigate the possibility of a whole gene deletion occurring in the other allele. Using array CGH, we were able to identify a novel 68-kb deletion encompassing the *SLC4A11* gene as another disease-causing allele inherited from the patients' father. PCR-directing sequencing was able to detect the precise deletion points which gave the deletion size of 67,733 base pairs. This deletion resides in the structural variant reported to be a deletion polymorphism in DGV (variation_5121). In addition to the variation_5121, there are four deletion variants with different sizes encompassing the *SLC4A11* gene. The deletion identified in our patient overlaps with these deletions. Copy number variations (CNVs) including microdeletions and microduplications have been demonstrated as a significant cause of structural variation in the human genome.^{12 13} Several studies have suggested deletion polymorphisms may play a significant role in the genetic basis of complex traits as well as in genome evolution.¹⁴⁻¹⁷ In addition, several genes including those responsible for autosomal recessive diseases such as *NEB* in nemaline myopathy and *GCNT2* in congenital cataracts and i blood group, have been found to be affected by such deletions.¹⁸⁻²¹ It has been demonstrated that CNVs preferentially occur near or within the duplicated sequences. CNVs including deletions can be caused by a recombination between flanking direct repeats. This newly identified 68-kb deletion is flanked by repeat sequences which can lead to an aberrant recombination event resulting in loss of the intervening unique sequence in our case (figure 3D). The microdeletions at this genomic region could be the disease-causing alleles responsible for CHED2 in the previously reported cases with unidentified mutations in the coding region of the *SLC4A11* gene. Considering the existence of deletion polymorphisms covering the *SLC4A11* gene, there is a high possibility of finding such deletions in CHED2 patients with unidentified *SLC4A11* mutations on conventional mutation detection

techniques. It would be interesting to investigate what proportions of the chromosomal deletions contribute to CHED2. This information will have significant implications for developing an algorithm for genetic testing in patients with CHED2 leading to more accurate genetic diagnosis and effective genetic counseling.

In summary, we successfully identified two novel mutations in *SLC4A11* in a Thai family and expanded the mutational spectrum of *SLC4A11* causing CHED2. This is the first to characterize the largest deletion identified in CHED2 patients. Microdeletions could be the disease-causing alleles responsible for some of the previously reported cases with undetected mutations in the coding and the putative promoter regions of *SLC4A11*. Our findings support the use of additional mutation detection techniques to identify the deletions if no causative mutations are identified using the conventional PCR-sequencing techniques. It would help increase the detection rate of mutations in patients with CHED2.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Ngamjit Kasetsuwan and Dr. Supawadee Erjongmanee for providing excellent patient care, Dr. Wasee Tulvatana for helpful advices on histopathological interpretation, Dr. Supang Maneesri Le Grand for technical advices on electron microscopic studies, and patients and their families for participating in this study.

This work was supported by the Ratchadapiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RES560530177-HR) and Thailand Research Fund.

Contributors VP collected the data, helped with interpretation of histological data and drafted the manuscript. PY performed molecular studies, analyzed the data and drafted the manuscript.

CC collected the data and helped with analysis of the images. K.S and V.S. designed the study, undertook data analysis and interpretation and wrote the manuscript.

Competing interests None

REFERENCES

1. Ehlers N, Modis L, Moller-Pedersen T. A morphological and functional study of Congenital Hereditary Endothelial Dystrophy. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 1998;76:314-8.

2. Judisch GF, Maumenee IH. Clinical differentiation of recessive congenital hereditary endothelial dystrophy and dominant hereditary endothelial dystrophy. *American journal of ophthalmology* 1978;85:606-12.

3. Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, *et al.* Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nature genetics* 2006;38:755-7.

4. Jiao X, Sultana A, Garg P, *et al.* Autosomal recessive corneal endothelial dystrophy (CHED2) is associated with mutations in SLC4A11. *Journal of medical genetics* 2007;44:64-8.

5. Park M, Li Q, Shcheynikov N, *et al.* NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺ -coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Molecular cell* 2004;16:331-41.

6. Desir J, Moya G, Reish O, *et al.* Borate transporter SLC4A11 mutations cause both Harboyan syndrome and non-syndromic corneal endothelial dystrophy. *Journal of medical genetics* 2007;44:322-6.

7. Vithana EN, Morgan PE, Ramprasad V, *et al.* SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Human molecular genetics* 2008;17:656-66.

- 1
2
3 8. Sultana A, Garg P, Ramamurthy B, *et al.* Mutational spectrum of the SLC4A11 gene in
4
5 autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy. *Molecular vision*
6
7 2007;13:1327-32.
8
9
- 10 9. Hemadevi B, Veitia RA, Srinivasan M, *et al.* Identification of mutations in the SLC4A11 gene
11
12 in patients with recessive congenital hereditary endothelial dystrophy. *Archives of*
13
14 *ophthalmology* 2008;126:700-8.
15
16
- 17 10. Shah SS, Al-Rajhi A, Brandt JD, *et al.* Mutation in the SLC4A11 gene associated with
18
19 autosomal recessive congenital hereditary endothelial dystrophy in a large Saudi family.
20
21 *Ophthalmic genetics* 2008;29:41-5.
22
23
- 24 11. Paliwal P, Sharma A, Tandon R, *et al.* Congenital hereditary endothelial dystrophy -
25
26 mutation analysis of SLC4A11 and genotype-phenotype correlation in a North Indian
27
28 patient cohort. *Molecular vision* 2010;16:2955-63.
29
30
- 31 12. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, *et al.* Detection of large-scale variation in the human
32
33 genome. *Nature genetics* 2004;36:949-51.
34
35
- 36 13. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human
37
38 genome. *Science* 2004;305:525-8.
39
40
- 41 14. Olson MV. When less is more: gene loss as an engine of evolutionary change. *American*
42
43 *journal of human genetics* 1999;64:18-23.
44
45
- 46 15. Yu CE, Dawson G, Munson J, *et al.* Presence of large deletions in kindreds with autism.
47
48 *American journal of human genetics* 2002;71:100-15.
49
50
- 51 16. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, *et al.* Strong association of de novo copy number mutations
52
53 with autism. *Science* 2007;316:445-9.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 17. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, *et al.* Rare structural variants disrupt multiple genes
4
5 in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 2008;320:539-43.
6
7
8 18. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, *et al.* Fine-scale structural variation of the human genome.
9
10 *Nature genetics* 2005;37:727-32.
11
12
13 19. Conrad DF, Andrews TD, Carter NP, *et al.* A high-resolution survey of deletion
14
15 polymorphism in the human genome. *Nature genetics* 2006;38:75-81.
16
17
18 20. Borck G, Kakar N, Hoch J, *et al.* An Alu repeat-mediated genomic GCNT2 deletion
19
20 underlies congenital cataracts and adult i blood group. *Human genetics* 2012;131:209-16.
21
22
23 21. Kiiski K, Laari L, Lehtokari VL, *et al.* Targeted array comparative genomic hybridization--a
24
25 new diagnostic tool for the detection of large copy number variations in nemaline
26
27 myopathy-causing genes. *Neuromuscular disorders : NMD* 2013;23:56-65.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 Clinical features of three affected siblings with CHED2

Case no.	Age/Sex	Nystagmus	BCVA RE	BCVA LE	CCT RE/LE (microns)	Surgical course
1	20/M	Present	CF 1/2 ft	20/200	1087/1089	Underwent PKP RE at age 7, graft rejection
2	17/F	Absent	20/70-1	20/200	1115/1116	Not done
3	7/F	Present	CF 2 ft	CF 1.5 ft	1115/1119	Underwent PKP RE at age 9

M, male; F, female; BCVA, best corrected visual acuity; CCT, central corneal thickness; CF, counting fingers; ft, feet; PKP, penetrating keratoplasty; RE, right eye.

Table 2 Newly designed primers and PCR conditions for *SLC4A11* mutation analysis.

Primer name	Sequence 5'- 3'
SLC4A11-Ex1-F	GAGTTTGGGGTCCAGAAGC
SLC4A11-Ex1-R	GCAGAGCCCTAATGAAACCA
SLC4A11_Deletion-F	GGGACCTTACCCACAGAACA
SLC4A11_No Del-R	ATTGCATTGGATGCCTTGTA
SLC4A11_Del-R	CACAACCCAGGGATACCACT

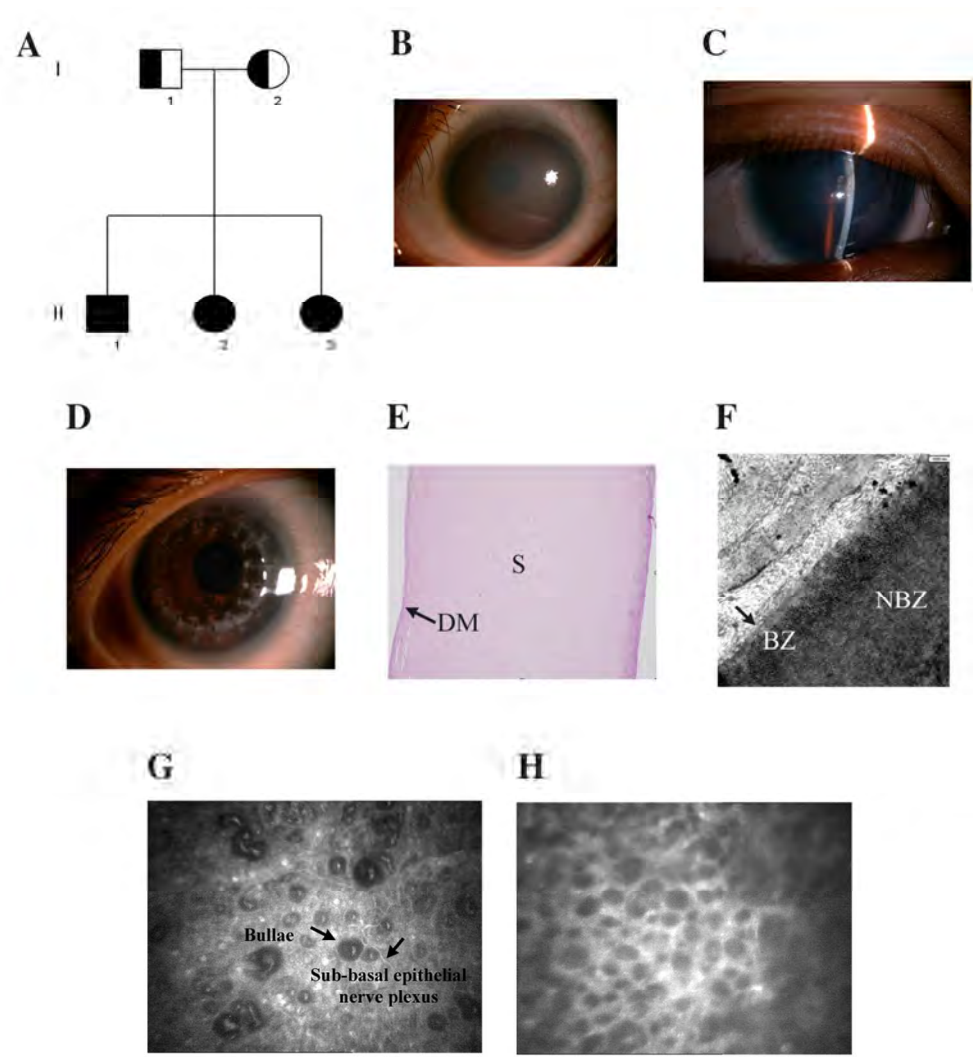
Figure legends

Figure 1. Pedigree of a Thai family with CHED2 and clinical features. (A) Pedigree. (B-C) Slit-lamp photograph of the patient (II-3)’s cornea showing corneal edema and haziness. (D) The patient (II-3)’s cornea after penetrating keratoplasty. (E) Histopathology of corneal button of the patient (II-3) with hematoxylin-eosin staining showing marked stromal and Descemet’s membrane thickening. The endothelial cells were absent. S, stroma; DM, Descemet’s membrane. (F) Electron microscopy (EM) revealed increased thickness of the Descemet’s membrane, due to an increase thickness of the non-banded zone (NBZ). Fragmentation and disorganization of collagen fibers was seen. (G) Confocal image showing multiple hypo-reflective bullae in the epithelial layer. (H) Loss of normal stromal structures including keratocytes, replaced by hyper-reflective interwoven bands giving a “honey-comb” appearance.

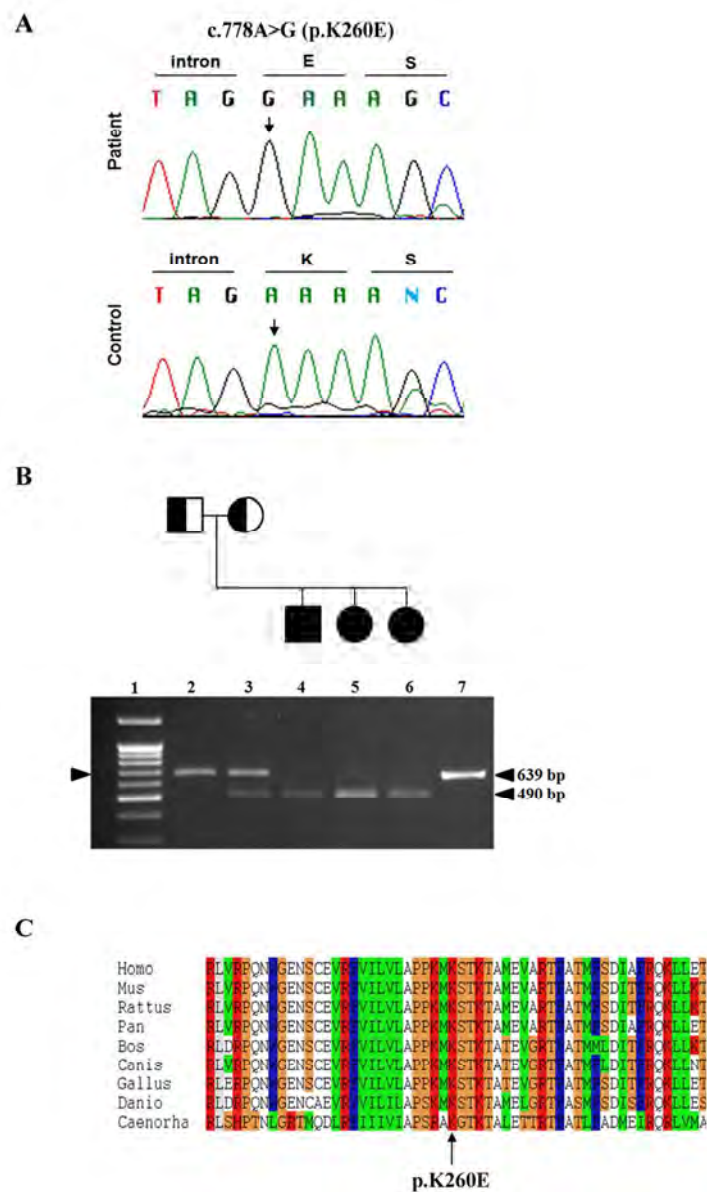
Figure 2. Mutation analysis of the missense mutation. (A) Electropherograms of the patient and unaffected control. The c.778A>G mutation is indicated by an arrow. (B) PCR-RFLP analysis for the c.778A>G mutation. *Avr*II digested the mutant allele into 490 and 149-bp products (an arrow head). The wild-type allele does not harbor the recognition site, leaving the 639-bp PCR product intact. Note that the 149-bp band is not visualized. Lane 1, 100-bp marker; lane 2, father; lane 3, mother; lanes 4-6, affected family members; lane 7, uncut. The 500-bp band is indicated by an arrow head. (C) Sequence alignment of SLC4A11 centering around residue 260 from various species. The site of the p.K260E mutation is indicated by an arrow.

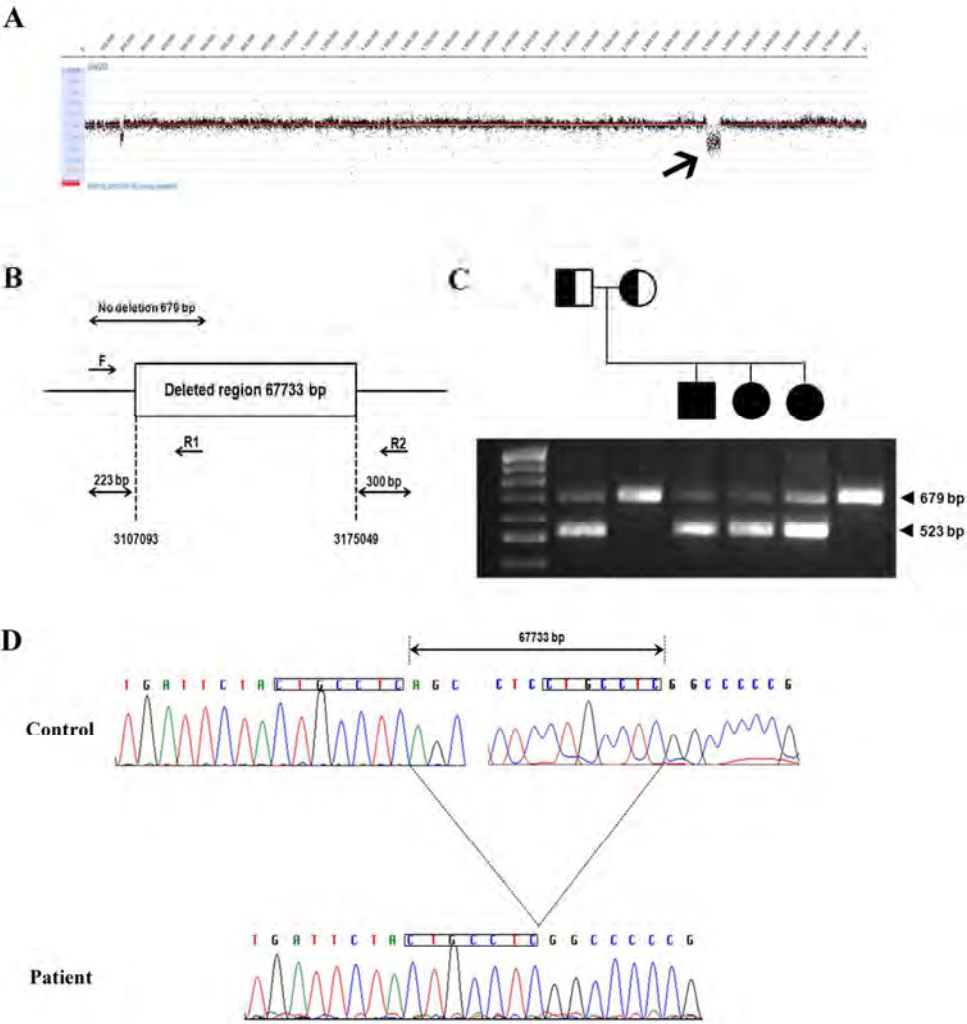
Figure 3. Mutation analysis of the large deletion. (A) Array-CGH analysis showed that the patient (II-2) had a heterozygous deletion from position 3107501 to 3174468 (according to chromosome 20 of hg18) encompassing the *SLC4A11* gene. (B) Schematic representation of the deleted region identified in the patients showing the location of the primers and the expected

1
2
3 size. (C) PCR analysis showing the deletion was present in all patients and their father but not
4 present in their mother. The size of the PCR products was 523 bp and 679 bp for the deleted and
5 non-deleted alleles, respectively (an arrow head). (D) Electropherograms of the patient and
6 unaffected control showing the precise breakpoints of the 67733-bp deletion and the flanking
7 short direct repeats confirming the results from the array-CGH studies.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



101x109mm (300 x 300 DPI)





101x107mm (300 x 300 DPI)



Short communication

Two novel *CTNS* mutations in cystinosis patients in Thailand

Patra Yeetong ^{a,b,d}, Siraprapa Tongkobpetch ^{a,b}, Pornchai Kingwatanakul ^c, Tawatchai Deekajorndech ^c, Isa M. Bernardini ^e, Kanya Suphapeetiporn ^{a,b,*}, William A. Gahl ^e, Vorasuk Shotelersuk ^{a,b}

^a Center of Excellence for Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^b Excellence Center for Medical Genetics, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross, Bangkok, 10330, Thailand

^c Pediatric Nephrology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^d Inter-Department Program of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^e Medical Genetics Branch, National Human Genome Research Institute, Bethesda, Maryland, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 7 March 2012

Available online 16 March 2012

Keywords:

Cystinosis

CTNS

Novel mutations

Thai

ABSTRACT

Cystinosis is an autosomal recessive disorder characterized by defective transport of cystine across the lysosomal membrane and resulting in renal, ophthalmic, and other organ abnormalities. Mutations in the *CTNS* gene cause a deficiency of the transport protein, cystinosin. We performed mutation analysis of *CTNS* in six cystinosis patients from four families in Thailand. Using PCR sequencing of the entire coding regions, we identified all eight mutant alleles, including two mutations, p.G309D and p.Q284X, that have not been previously reported. This study expands the mutational and population spectrum of nephropathic cystinosis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cystinosis is an autosomal recessive lysosomal storage disorder caused by impaired transport of free cystine out of lysosomes; it affects many organs and tissues, but early manifestations involve the kidney (Gahl et al., 2002). The different severities of the disease include classical nephropathic cystinosis, with renal tubular Fanconi syndrome in the first year of life, glomerular failure by 10 years of age, and later involvement of other organ systems. Intermediate cystinosis is characterized by all the clinical manifestations of nephropathic cystinosis, but with later onset. Non-nephropathic, or ocular cystinosis manifests with only corneal crystals and photophobia (Gahl et al., 2001; Nesterova and Gahl, 2008).

In 1995, the cystinosis gene was mapped to chromosome 17p13 (McDowell et al., 1995), and in 1998 Town et al. found that mutations in the *CTNS* gene caused cystinosis (Town et al., 1998). *CTNS* consists of 12 exons with coding regions of 1104 bp. The *CTNS* gene product, cystinosin, contains 367 amino acids and 7 transmembrane domains and serves as an integral lysosomal membrane protein. At least 85 different mutations in *CTNS* have been identified in the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>).

We identified six affected individuals with cystinosis from four families in Thailand, and performed mutation analysis of the *CTNS* gene. Two novel mutations were found in this, the first evaluation of the molecular biology of cystinosis in Thailand.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Six patients from four different families were studied. Patients 1, 2 and 3 were single cases. Patients 4, 5 and 6 were siblings originally from Cambodia and had intermediate cystinosis; their clinical characteristics were previously reported (Kitnarong et al., 2005). These siblings had short stature and leg deformity. They did not have renal dysfunction or ocular symptoms. Further investigations demonstrated Fanconi syndrome and rickets. In all cases, the diagnosis was based upon finding typical corneal crystals and elevated leukocyte cystine levels. Clinical details and leukocyte cystine levels are in Table 1. Parental DNA was available only for the fourth family.

2.2. *CTNS* mutation analysis

Genomic DNA and total RNA were extracted from peripheral leukocytes according to standard protocols. Direct sequencing of PCR-amplified DNA representing the entire coding region of *CTNS* was performed as previously described (Shotelersuk et al., 1998). The PCR products were treated with ExoSAP-IT (USP Corporation, Cleveland, Ohio) and directly sequenced. A novel missense mutation,

Abbreviations: CTNS, cystinosin; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

* Corresponding author at: Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Sor Kor Building 11th floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +66 2 256 4989; fax: +66 2 256 4911.

E-mail address: kanya.su@chula.ac.th (K. Suphapeetiporn).

Table 1
Clinical and molecular characteristics of Thai patients with cystinosis.

Patient/Ethnic group	Age of onset	Type	Inbred	WBC cystine ^a	DNA change	Amino acid change	Novel
1/Thai	9 mo	Nephropathic	No	4.5	c.926G>A/c.969C>G	p.G309D/p.N323K	Yes
2/Thai	7 mo	Nephropathic	Yes	NA	c.850C>T/c.850C>T	p.Q284X/p.Q284X	Yes
3/Thai	15 mo	Nephropathic	No	NA	c.18-21del/c.971-12G>A	T7fsX13	Yes
4/Cambodian	13 y	Intermediate	Yes	0.5	c.969C>G/c.969C>G	p.N323K/p.N323K	No
5/Cambodian	10 y	Intermediate	Yes	0.5	c.969C>G/c.969C>G	p.N323K/p.N323K	No
6/Cambodian	18 mo	Intermediate	Yes	0.6	c.969C>G/c.969C>G	p.N323K/p.N323K	No

^a Nanomoles of half-cystine/mg of WBC protein. Normal values are <0.2 and heterozygous values are less than 1.0. See text for details.

c.926G>A, was analyzed by PCR-RFLP, using *MwoI* restriction enzyme.

3. Results

Patient 1 was compound heterozygous for c.926G>A (p.G309D) and c.969C>G (p.N323K) (Fig. 1). The former mutation has never been described, and was not detected in 50 Thai controls (100 chromosomes), using PCR-RFLP with *MwoI*. Patient 2 had a history of parental consanguinity and was homozygous for a nonsense mutation, c.850C>T (p.Q284X) (Fig. 1), not previously described. Patient 3 was compound heterozygous for a 4 bp deletion (c.18-21del) and a G>A substitution at the –12 position of exon 11 (c.971-12G>A). Both mutations were previously reported (Town et al., 1998).

Patients 4, 5, and 6 were homozygous for a previously described missense mutation at nucleotide position c.969C>G (p.N323K) (Thoene et al., 1999). Both parents were carriers for the mutation. The affected siblings had leukocyte cystine levels approximately 5 times the normal level (Table 1), which is always <0.2 nmol half-cystine/mg protein but averages ~0.1 nmol half-cystine/mg protein.

4. Discussion

We report the *CTNS* mutations in 6 patients from 4 families in Thailand; three had classical nephropathic cystinosis and three had intermediate cystinosis. Patients 1 and 3, who were products of

non-consanguineous parents, had compound heterozygous mutations, while patient 2 and the 3 siblings from family 4, from consanguineous matings, were homozygous. Five different mutations were identified, including a 4 bp deletion, 2 missense mutations, 1 nonsense and a single base pair substitution in intron 11. One missense (c.926G>A, p.G309D) and the nonsense (c.850C>T, p.Q284X) mutations were not previously reported.

The newly identified missense mutation in patient 1 (c.926G>A; p.G309D) was predicted by PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) to be probably damaging with a score of 0.999. ClustalX showed the nucleotide was conserved from *Homo sapiens* to *Oryza sativa* (Fig. 2). Patient 2 was homozygous for a single base pair transition (c.850C>T), expected to result in changing a glutamine at amino acid position 284 into a stop codon (p.Q284X).

Several studies supported the correlation of genotype with phenotype in cystinosis. Among our patients, p.N323K was present in the homozygous state in patients 4, 5, and 6, who had intermediate cystinosis. This is consistent with a previous study reporting patients with intermediate cystinosis, who were also homozygous for p.N323K (Thoene et al., 1999). Both patients had fibroblast cystine values of 1.1 and 1.2 nmol half-cystine/mg protein; our patients' values, 0.5 and 0.6 nmol half-cystine/mg protein, are within the range for individuals who are heterozygous for severe *CTNS* mutations (i.e., <1.0 nmol half-cystine/mg protein). This discrepancy might be related to the difference in cell types assayed, but in any event, it suggests that p.N323K allows for considerable residual cysteine-transporting

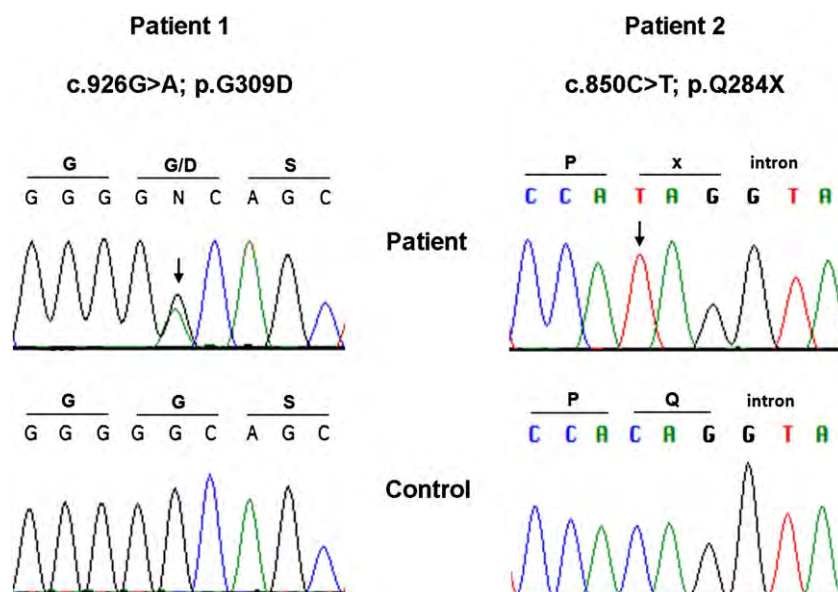


Fig. 1. *CTNS* mutation analysis for patients (upper panels) compared with controls (lower panels). Left panel: Electropherogram of patient 1 using complementary DNA as template shows a heterozygous novel missense mutation c.926G>A (p.G309D) (arrow). Right panel: Electropherogram of patient 2 using genomic DNA as template reveals a homozygous novel nonsense mutation c.850C>T (p.Q284X) (arrow).

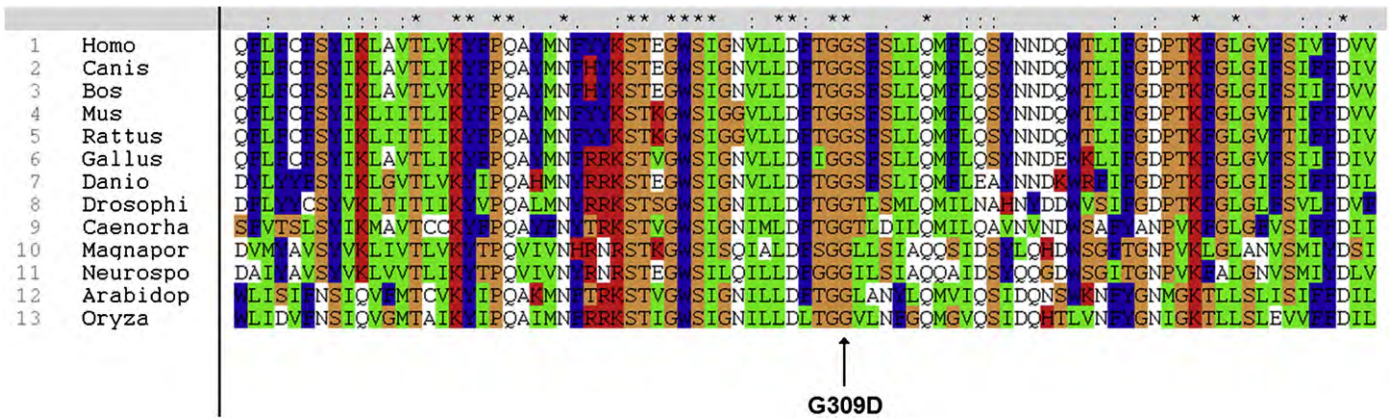


Fig. 2. ClustalX. Multiple sequence alignment of CTNS in different species. The position of amino acid (G309D) is 100% conserved across all sequences (arrow).

activity, perhaps as much as 50%. The p.N323K was also found in the heterozygous state in our patient 1 with nephropathic cystinosis. The other two previously reported mutations in our cases, c.18–21del and c.971–12G>A, have been reported in patients with classical nephropathic cystinosis (Attard et al., 1999; Town et al., 1998). Our findings support a correlation between CTNS mutations and clinical severity in cystinosis, and identify CTNS mutations that are, to date, novel to Thai families.

Acknowledgments

This study was supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program to PY (Grant no. PHD/0022/2550), the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund, the National Science and Technology Development Agency, the Thailand Research Fund, and the National Research University Project, Office of the Higher Education Commission (HR1163A).

References

- Attard, M., et al., 1999. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosis. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2507–2514.
- Gahl, W.A., Thoene, J., Schneider, J.A., 2001. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. In: Scriver CR, B.A., Sly, W.S., Valle, D., Vogelstein, B. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 5085–5108.
- Gahl, W.A., Thoene, J.G., Schneider, J.A., 2002. Cystinosis. *N. Engl. J. Med.* 347, 111–121.
- Kitnarong, N., Osuwannaratana, P., Kamchaisatian, W., Namtongthai, P., Metheetrarut, A., 2005. Ocular manifestations in adolescent cystinosis: case report in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 88, 521–526.
- McDowell, G.A., et al., 1995. Linkage of the gene for cystinosis to markers on the short arm of chromosome 17. The Cystinosis Collaborative Research Group. *Nat. Genet.* 10, 246–248.
- Nesterova, G., Gahl, W.A., 2008. Nephropathic cystinosis: late complications of a multi-systemic disease. *Pediatr. Nephrol.* 23, 863–878.
- Shotelersuk, V., et al., 1998. CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1352–1362.
- Thoene, J., et al., 1999. Mutations of CTNS causing intermediate cystinosis. *Mol. Genet. Metab.* 67, 283–293.
- Town, M., et al., 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* 18, 319–324.

A novel p.E276K *IDUA* mutation decreasing α -L-iduronidase activity causes mucopolysaccharidosis type I

Korrakot Prommajan,^{1,2} Surasawadee Ausavarat,^{1,2} Chalurmpon Srichomthong,^{1,2} Vilavun Puangsricharern,³ Kanya Suphapeetiporn,^{1,2} Vorasuk Shotelersuk^{1,2}

¹Center of Excellence for Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; ²Molecular Genetics Diagnostic Center, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross, Bangkok, Thailand;

³Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Purpose: To characterize the pathogenic mutations causing mucopolysaccharidosis type I (MPS I) in two Thai patients: one with Hurler syndrome (MPS IH), the most severe form, and the other with Scheie syndrome (MPS IS), the mildest. Both presented with distinctive phenotype including corneal clouding.

Methods: The entire coding regions of the α -L-iduronidase (*IDUA*) gene were amplified by PCR and sequenced. Functional characterization of the mutant *IDUA* was determined by transient transfection of the construct into COS-7 cells.

Results: Mutation analyses revealed that the MPS IH patient was homozygous for a previously reported mutation, c.252insC, while the MPS IS patient was found to harbor a novel c.826G>A (p.E276K) mutation. The novel p.E276K mutation was not detected in 100 unaffected ethnic-matched control chromosomes. In addition, the glutamic acid residue at codon 276 was located at a well conserved residue. Transient transfection of the p.E276K construct revealed a significant reduction of *IDUA* activity compared to that of the wild-type *IDUA* suggesting it as a disease-causing mutation.

Conclusions: This study reports a novel mutation, expanding the mutational spectrum for MPS I.

Mucopolysaccharidoses (MPs) are a group of inherited lysosomal storage disorders resulting from a deficiency of enzymes that catalyze the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). MPS I is considered as the prototypic lysosomal storage disease of the MPS group which is caused by a deficiency of lysosomal α -L-iduronidase (*IDUA*, EC 3.2.1.76). As a result of defects inside the lysosomes, partially degraded GAGs, heparan, and dermatan sulfate accumulate in these organelles leading to progressive cellular dysfunction and characteristic features of the disorder. MPS I has been classified into three clinical phenotypes, with different levels of severity: a severe form (Hurler syndrome; MPS IH; OMIM 607014), an intermediate form (Hurler-Scheie syndrome; MPS IH/S; OMIM 607015), and a mild form (Scheie syndrome; MPS IS; OMIM 607016) [1,2].

MPS I can be diagnosed biochemically by the presence of urinary dermatan sulfate and heparan sulfate and the significant reduction or absence of *IDUA* activity in patients' leukocytes or skin fibroblasts [1]. The *IDUA* gene contains 14 exons encoding a 653-amino acid precursor protein [3,4]. At least 110 different disease-causing mutations in *IDUA* have been described with the majority being missense/nonsense mutations. The splice-junction alterations and nucleotide

insertions/deletions have also been reported ([Human Gene Mutation Database](#), accessed September, 2010). The p.W402X and p.Q70X mutations are most commonly found in Caucasians and are accountable for as much as 70% of the disease alleles in some European countries [5-7].

There has been only one report on Thai patients with molecularly confirmed Hurler syndrome [8]. Here, we described two unrelated Thai patients with MPS I and identified one recurrent and one novel mutations in *IDUA*. The functional consequence of the novel missense mutation was also further elucidated.

METHODS

Subjects: Two unrelated Thai patients with clinically diagnosed MPS I were reported. Patient 1, a product of a consanguineous marriage, with clinical features consistent with MPS IH was diagnosed at one year of age. The clinical findings included coarse facial features, corneal clouding, hepatosplenomegaly, and skeletal deformities. He was noted to have delayed development and passed away at age two from severe respiratory infection. Patient 2 was adopted and was diagnosed with MPS IS at the age of 29 years. The clinical features included coarse facial features, corneal clouding and claw hand deformity. The α -L-iduronidase activity in leukocytes from patient 2 was measured and revealed a significant reduction in enzyme activity (0.61 nmol/h/mg protein). The mean of α -L-iduronidase activity in leukocytes obtained from eight unaffected adult Thai controls was

Correspondence to: Kanya Suphapeetiporn, M.D., Ph.D., Head of Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Sor Kor Building 11th floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand; Phone: 662-256-4989; FAX: 662-256-4911; email: kanya.su@chula.ac.th

TABLE 1. PRIMERS AND PCR CONDITIONS FOR *IDUA* MUTATION ANALYSIS.

Exon	Primer name	Primer sequences for PCR (5' to 3')	Product size (bp)	Melting temperature (°C)
1	IDUA-Ex1F	F-ACCCAACCCCTCCCAC	398	58
	IDUA-Ex1R	R-AGCTTCAGAGACCGGAG		
2	IDUA-Ex2F	F-GAACGTGTGTGTCAGCCG	304	62
	IDUA-Ex2R	R-GCTCGGAAGACCCCTTGT		
3-4	IDUA-Ex3/4F	F-TTCCAGCCTGGAGCATGGAG	516	62
	IDUA-Ex3/4R	R-GTTGCACCCCTATGACGCAG		
5-6	IDUA-Ex5/6F	F-TCACCTTGACCCCTCCCTCC	576	62
	IDUA-Ex5/6R	R-GCTGACCCTGGTGGTGTCTGA		
7	IDUA-Ex7F	F-TGCGGCTGGACTACATCTC	448	62
	IDUA-Ex7R	R-GCAGCATCAGAACCTGCTACT		
8	IDUA-Ex8F	F-CCACCTTCCTCCCGAGAC	386	62
	IDUA-Ex8R	R-GGAGCGCACTTCCTCCAG		
9-10	IDUA-Ex9F	F-TCCTTCACCAAGGGGAGG	701	58
	IDUA-Ex10R	R-TCCTCAGGGTTCTCCAGG		
11-12	IDUA-Ex11/12F	F-GTGTGGGTGGGAGGTGGA	466	62
	IDUA-Ex11/12R	R-CTTCACCCATGCGGTAC		
13-14	IDUA-Ex13/14F	F-CTGCCTGCTCCCACCTTTGHA	530	62
	IDUA-Ex13/14R	R-CCCATGCTGCCCTCCCATCA		

23.10±8.80 nmol/h/mg protein. Unfortunately, leukocytes from patient 1 were unavailable for analysis.

Mutation analysis of the *IDUA* gene: After informed consent, genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from patients and available parents according to standard protocols. The entire coding regions of *IDUA* were assessed by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. Most of the oligonucleotide primers were used as previously described [9] and presented in Table 1. Exons 3–6, 13–14, and their intron-exon boundaries were amplified using newly designed primers (Table 1). The PCR products were treated with ExoSAP-IT (USP Corporation, Cleveland, OH), according to the manufacturer's recommendations, and sent for direct sequencing at the Macrogen, Inc. (Seoul, Korea). The sequences were analyzed using Sequencher (version 4.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

For a novel missense mutation, c.826G>A (p.E276K), PCR-RFLP analysis with the MboII restriction enzyme was used to confirm its presence in the patient and to screen in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes. The forward and reverse primers for amplification of *IDUA* exon 7 were used to generate a 448-bp PCR product. The mutant PCR product creates another MboII site, which allowed detection of the mutation by agarose gel electrophoresis. As the proband was adopted, the parental DNA was not available for analysis.

Protein sequence comparison: *IDUA* orthologs were first identified through a BLAST search of the non-redundant database using *Homo sapiens* *IDUA*, accession NP_000194.2 as the reference sequence. All known and

complete *IDUA* sequences were included from the vertebrate lineage. These files in FASTA format were then analyzed by ClustalX program.version 2.0.12. The human *IDUA* was aligned with rat (*Rattus norvegicus*; NP_001165555.1), mouse (*Mus musculus*; NP_032351.1), cow (*Bos taurus*; XP_877410.2), chicken (*Gallus gallus*; NP_001026604.1), frog (*Xenopus laevis*; NP_001087031.1), and zebrafish (*Danio rerio*; XP_001923689.1). The program classified amino acids by the variation in polarity, assessing both amino acid class conservation and evolutionary conservation at any given site.

Construction of plasmids and site-directed mutagenesis: The expression vector wild-type pEFNeo-*IDUA* was kindly provided by Hopwood's laboratory. The mutant *IDUA* constructs of c.1206G>A (p.W402X) and c.826G>A (p.E276K) were generated by in vitro site-directed mutagenesis (QuickChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene, La Jolla, CA) on the pEFNeo-*IDUA* using oligonucleotide primers. The p.W402X was a previously described mutation in MPS IH and was used as a mutant control. All mutant *IDUA* constructs were verified by direct sequencing.

Transient transfection and enzyme assay: COS-7 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂. COS-7 cells were transfected with the wild-type or mutant constructs using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested after 48 h and assayed for *IDUA* activity.

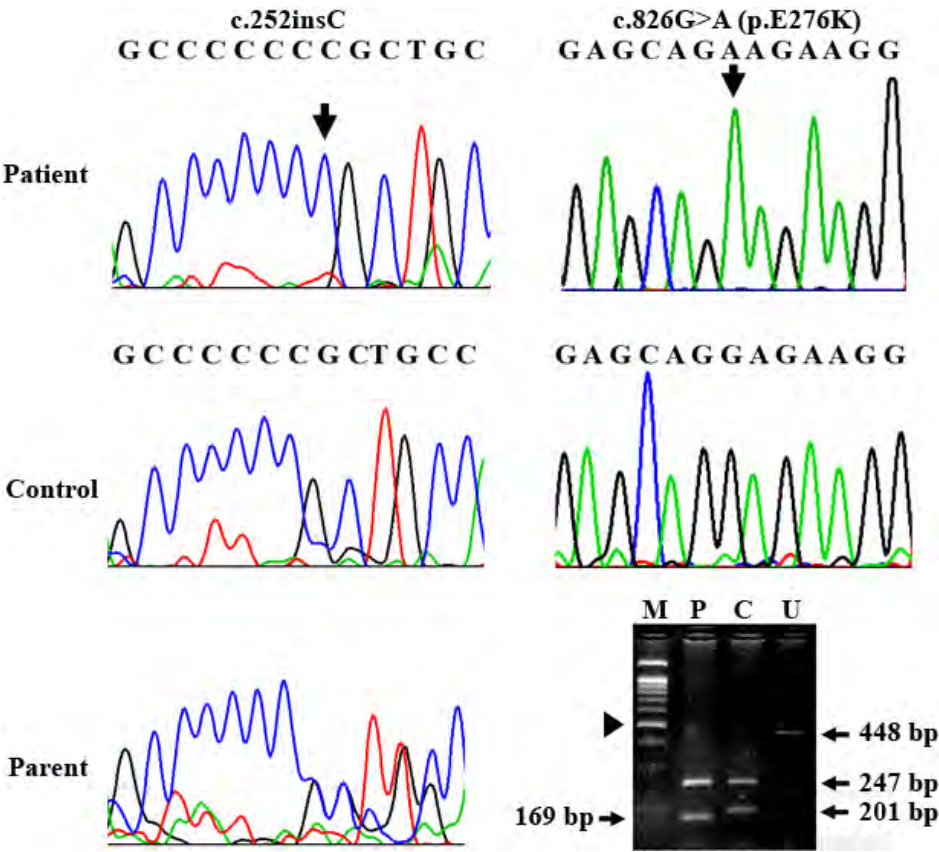


Figure 1. Mutation analysis. The left and right panels relate to c.252insC and c. 826G>A (p.E276K) mutations, respectively. Upper, middle and left lower panels are electropherograms of patients, unaffected controls, and one of the parents, respectively. Each identified mutation is indicated by an arrow. Right lower panel showing RFLP analysis for the c.826G>A mutation in patient 2. MboII digested the wild-type allele of a control into 247 and 201-bp products. The c.826G>A creates another cleavage site for MboII resulting in 169 and 32-bp bands. Note that the 32-bp band is not visualized. (M=100-bp marker, P=patient, C=control, U=uncut amplified product). The 500-bp band is indicated by an arrowhead.

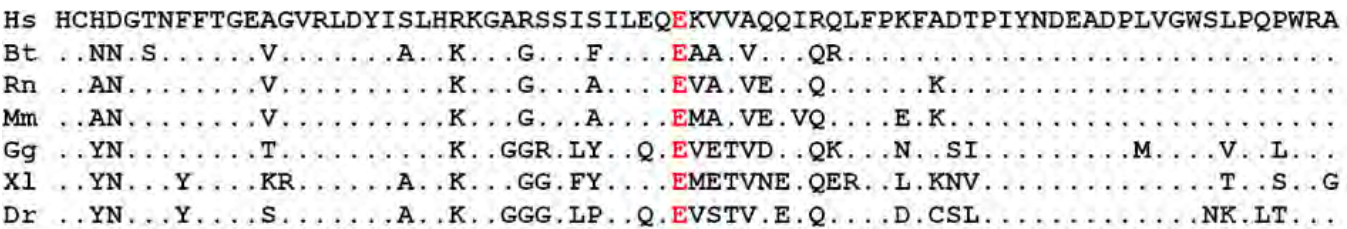


Figure 2. Protein sequence alignment of IDUA from different species. The site of the amino acid variant found in this study is indicated in bold red in all conserved species. Sites that are 100% conserved across all sequences are indicated by dots (.). Hs, *Homo sapiens*; Bt, *Bos taurus*; Rn, *Rattus norvegicus*; Mm, *Mus musculus*; Gg, *Gallus gallus*; Xl, *Xenopus laevis*; Dr, *Danio rerio*.

Experiments were performed twice with triplicate per experiment.

An assay for IDUA activity was performed using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide (Glycosynth, Cheshire, UK) as previously described [10]. The protein concentration of the cell lysates was determined by the Bradford assay.

RESULTS

PCR-sequencing revealed a homozygous c.252insC mutation in patient 1 (Figure 1, left upper panel). Sequence analysis of the parental genomic DNA confirmed that both parents were heterozygous for the c.252insC. This mutation has been previously described to be associated with a severe phenotype in different populations including Thai [6,8].

A novel homozygous c.826G>A mutation in exon 7 was identified in patient 2. This was expected to result in a glutamic acid to lysine substitution (p.E276K) at codon 276 (Figure 1, right upper panel). No other variants were observed.

Restriction enzyme digestion of the PCR products with MboII was used to confirm the presence of the c.826G>A mutation in the patient 2 and its absence in 100 ethnic-matched unaffected control chromosomes. Alignment of the IDUA protein sequences revealed that the glutamic acid residue at codon 276 was located at a well conserved residue (Figure 2).

The functional effect of the novel p.E276K and the previously identified p.W402X mutations on IDUA activity were analyzed by transient transfection of each IDUA construct into COS-7 cells. Comparing to the enzyme activity

TABLE 2. α -L-IDURONIDASE ACTIVITY IN TRANSIENTLY TRANSFECTED COS-7 CELLS WITH EITHER WILD-TYPE OR MUTANT IDUA CONSTRUCTS.

Constructs	α -L-iduronidase activity (nmol/h/mg cell protein) mean $\pm$ SD	Phenotype
None	27.17 $\pm$ 4.89	-
pEFNeo	32.52 $\pm$ 10.58	-
pEFNeo/IDUA	435.04 $\pm$ 56.23	-
pEFNeo/p.W402X	21.10 $\pm$ 12.57	Hurler
pEFNeo/p.E276K	31.88 $\pm$ 6.05	Scheie

of the wild-type IDUA (435.04 $\pm$ 56.23 nmol/h/mg protein), the p.E276K and the p.W402X had reduced activity to background levels (31.88 $\pm$ 6.05 nmol/h/mg protein and 21.10 $\pm$ 12.57 nmol/h/mg protein, respectively, Table 2).

DISCUSSION

We identified two unrelated Thai patients with MPS I. Patient 1 was found to be homozygous for the c.252insC mutation. It has been previously described to be responsible for a severe phenotype. The novel missense mutation, c.826G>A (p.E276K), was identified in patient 2 with MPS IS and caused a significant reduction of IDUA activity.

There was only one report describing two patients with MPS IH in the Thai population. Four different mutations including the c.252insC were detected. Combined this previous report with our findings, the c.252insC mutation is responsible for 40% (2 out of 5 alleles), making it a possible common mutant allele in Thai patients with MPS IH. Continued studies for mutations in patients with MPS I will be required for a definite conclusion. If this is proved to be the case, it will benefit a molecular diagnosis for this population.

Our patient with MPS IS was found to carry the novel c.826G>A (p.E276K) mutation. Due to the unavailability of her parent's DNA, a possibility that the other allele is deleted making her hemizygous for the c.826G>A remains. As no other variants were observed, the patient could be either homozygous or hemizygous for this particular mutation.

Several lines of evidence support the pathogenicity of this novel mutation. First, it is not found in 100 ethnic-matched control chromosomes. Second, the glutamic acid at codon 276 is located at a well conserved residue (Figure 2). And most importantly, when transiently transfected COS-7 cells with the p.E276K construct, IDUA enzyme activity was reduced to background levels. We also tested for the effect of the p.W402X, one of the most common mutations found in Caucasian individuals with MPS I, and revealed a significant reduction of IDUA activity similar to previous reports [9]. Our studies therefore suggested the p.E276K as a disease-causing mutation.

Prediction of a patient's clinical phenotype through genetic analysis of IDUA has been complicated by the high number of disease-causing mutations and polymorphic

variants present in the IDUA gene. It has been hypothesized that a combination of mutations, polymorphisms, genetic background, and environmental factors contribute to the clinical phenotypic spectrum [9,11,12]. Even though studies of genotype-phenotype correlations for MPS I patients are sometimes inconclusive, the nonsense mutations if present on both IDUA alleles have been shown to cause a severe form of MPS I. The c.252insC causing frameshift identified in our patient with MPS IH has been previously reported in two patients, one from the Netherlands and the other from Thailand [6,8]. Both were compound heterozygotes for the c.252insC and other nonsense mutations. Our finding of another MPS IH patient associated with the homozygous c.252insC mutation further supports the deleterious effect of this particular mutation on the enzyme activity.

In summary, we reported two unrelated Thai patients with MPS I with different clinical severity who were found to carry different mutations. Combined with a previous study in Thai patients, the c.252insC mutation identified in our patient with MPS IH, could be a common mutation causing Hurler syndrome in the Thai population. We also detected a novel missense mutation of the IDUA gene, c.826G>A (p.E276K) causing Scheie syndrome.

Transient transfection studies and assay for IDUA activity confirmed its pathogenic role. This study expands the mutational spectrum of MPS I.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients and their families for participating in this study, and Professor Hopwood, Lysosomal Diseases Research Unit, SA Pathology at Women's and Children's Hospital, North Adelaide, Australia for providing the pEFNeo-IDUA. This work was supported by Chulalongkorn University, the Thailand Research Fund, the National Science and Technology Development Agency and the National Research University Project of CHE and the Ratchadapiseksomphot Endowment Fund (HR1163A).

REFERENCES

- Hopwood JJ, Morris CP. The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med* 1990; 7:381-404. [PMID: 2128891]
- Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The*

- Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3421-52.
3. Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, Nelson PV, Clements PR, Morris CP, Hopwood JJ. Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9695-9. [PMID: 1946389]
4. Scott HS, Guo XH, Hopwood JJ, Morris CP. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics* 1992; 13:1311-3. [PMID: 1505961]
5. Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Zuther C, Morris CP, Schwinger E, Hopwood JJ, Scott HS, Gal A. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. *Hum Mol Genet* 1994; 3:861-6. [PMID: 7951228]
6. Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 13 novel mutations of the alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mutat* 1995; 6:91-4. [PMID: 7550242]
7. Gort L, Chabas A, Coll MJ. Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type I patients: high prevalence of the W402X mutation. *Mutations in brief no. 121*. Online. *Hum Mutat* 1998; 11:332-3. [PMID: 10215409]
8. Ketudat Cairns JR, Keeratichamroen S, Sukcharoen S, Champattanachai V, Ngiwsara L, Lirdprapamongkol K, Liammongkolkul S, Srisomsap C, Surarit R, Wasant P, Svasti J. The molecular basis of mucopolysaccharidosis type I in two Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36:1308-12. [PMID: 16438163]
9. Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, Adams V, Vellodi A, Young EP, Winchester BG. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet* 2001; 109:503-11. [PMID: 11735025]
10. Stirling JL, Robinson D, Fensom AH, Benson PF, Baker JE. Fluorimetric assay for prenatal detection of Hurler and Scheie homozygotes or heterozygotes. *Lancet* 1978; 1:147. [PMID: 87574]
11. Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Thompson PR, Brooks DA, Hopwood JJ, Morris CP. Identification of mutations in the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *Am J Hum Genet* 1993; 53:973-86. [PMID: 8213840]
12. Yogalingam G, Guo XH, Muller VJ, Brooks DA, Clements PR, Kakkis ED, Hopwood JJ. Identification and molecular characterization of alpha-L-iduronidase mutations present in mucopolysaccharidosis type I patients undergoing enzyme replacement therapy. *Hum Mutat* 2004; 24:199-207. [PMID: 15300847]