

Abstract

Human genomic alterations causing disease phenotypes in Thai population are proposed to be different from those found in other populations. Our group is thus employing genetic/genomic and molecular biology approaches to study certain complex diseases relevant to Thais. These diseases include kidney stone, distal renal tubular (dRTA), diabetes mellitus (DM) and dengue virus infection.

Kidney stone disease in the Northeastern Thai population shows familial aggregation with relative risk (λ_R) of 3.18 among family members, supporting the role of genetic factor in its pathogenesis. Genetic variations of *prothrombin (F2)* encoding a urinary stone inhibitor, prothrombin fragment 1, were first shown to be associated with kidney stone risk in the female patients. Genome-wide association and genome-wide linkage studies using DNA microarray are being conducted to identify the causative genes for kidney stone disease.

Mutations of the human *SLC4A1* gene encoding erythroid and kidney anion exchanger 1 (eAE1 and kAE1) result in erythrocyte abnormalities or distal renal tubular acidosis (dRTA). *SLC4A1* mutations and hemoglobinopathies (e.g. thalassemia or hemoglobin E) were observed in Thai population, presenting a combined effect of red cell morphological changes and hemolytic anemia aggravating by acidosis. Novel *SLC4A1* mutations were discovered in Thai and other populations. The wild-type and mutant kAE1 proteins were expressed and co-expressed in cultured epithelial cells to examine their interaction, trafficking, and cellular localization. Impaired trafficking and intracellular retention of the mutant kAE1 may lead to decrease functional kAE1 at the basolateral membrane of the kidney α -intercalated cells in the distal nephron resulting in dRTA.

The causes of diabetes mellitus (DM) are heterogeneous; abnormality at different biological pathways can lead to hyperglycemia. Six known genes responsible for maturity-onset diabetes of the young (MODY), including *HNF-4alpha*, *GCK*, *HNF-1alpha*, *IPF-1*, *HNF-1beta*, and *NeuroD1/beta2*, were analyzed in Thai patients with MODY and early-onset type 2 diabetes. Mutations of these six known MODY genes account for a small proportion of classic MODY (19%) and early-onset type 2 diabetes (10%) in Thais. A novel frameshift mutation of *HNF-1alpha* was identified in a Thai family with MODY. The functional defect of this mutant on the transactivation of its target-gene promoters is likely to account for the β -cell dysfunction associated with the pathogenesis of MODY.

Dengue virus-infected liver cells undergo apoptosis but the underlying molecular mechanism remains unclear. We found that dengue virus capsid protein (DENV C) physically interacts with the human death domain-associated protein Daxx, a Fas-associated protein. The two proteins were predominantly co-localized in the cellular nuclei. Fas-mediated apoptotic activity in liver cells constitutively expressing DENV C was induced by anti-Fas antibody, indicating that the interaction of DENV C and Daxx involves in apoptosis of dengue virus-infected liver cells. Upon treatment with anti-Fas antibody, the liver cells expressing the wild-type DENV C showed significantly more apoptosis compared with the cells expressing mutant DENV C that could not enter the nucleus.

The glycosylated envelope protein of dengue virus, DENV E, is processed in the endoplasmic reticulum of host cells and therefore reliant on host processing functions. Our group found that domain III of DENV E interacts with human immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP). The association of DENV E with two other chaperones, calnexin and calreticulin was also observed. Knocking-down expression of BiP, calnexin, or calreticulin by siRNA significantly decreased the production of infectious dengue virions, indicating that the interaction of these three chaperones with DENV E plays an important role in virion production.

Dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) is a key glycoprotein involved in the production of infectious virus and the pathogenesis of dengue diseases. However, very little is known how NS1 interacts with host cellular proteins and functions in dengue virus-infected cells. Human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C1/C2 was identified as NS1-interacting host cellular proteins in dengue virus-infected cells. Their interaction may have implications in virus replication and/or cellular responses favorable to survival of the virus in host cells.

In conclusion, our group is employing genetic/genomic and molecular biology approaches to investigate into genetic factors and molecular mechanisms of four certain diseases (kidney stone, dRTA, DM, and dengue-virus infection) relevant to Thai population and made significant discoveries and progresses in the studies of these diseases. However, further investigations of these diseases are required to gain complete understanding and to develop appropriate methods for prevention, control, and intervention.

Keyword: kidney stone, distal renal tubular (dRTA), diabetes mellitus (DM), dengue virus infection, genetics, genomics, molecular biology

บทคัดย่อ

ความผันแปรของจีโนมมนุษย์ที่ทำให้เกิดโรคในประชากรไทย ได้รับการสันนิษฐานว่าแตกต่างจากประชากรอื่นๆ คณะผู้วิจัยจึงใช้วิธีทางพันธุศาสตร์จีโนมิกส์และอนุชีววิทยา เพื่อศึกษาโรคที่ซับซ้อนและสำคัญบางโรคในคนไทย ได้แก่ โรคนี้้วนไต โรคไตผิดปกติในการขับกรด โรคเบาหวาน และโรคติดเชื้อไวรัสเด็งกี

โรคนี้้วนไตในคนภาคอีสาน พบในคนที่อยู่ในครอบครัวเดียวกัน โดยมีความเสี่ยงของการเกิดโรคในพี่น้องสูงกว่าประชากร 3.18 เท่า สนับสนุนว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีผลต่อพยาธิกำเนิดของโรค คณะผู้วิจัยได้ค้นพบเป็นครั้งแรกว่า ความผันแปรของยีนโปรทรอมบิน (*F2*) ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนยับยั้งการเกิดนี้้วนไตสภาวะ คือ prothrombin fragment 1 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดนี้้วนไตของคนไทยเพศหญิงในภาคอีสาน งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ คือ การค้นหาอื่นที่ทำให้เกิดโรคนี้้วนไตโดยวิธีศึกษาจีโนม ทั้งแบบหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับโรคในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มเปรียบเทียบ และแบบตรวจการถ่ายทอดของยีนในสมาชิกครอบครัว โดยการใช้ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์

มิวเตชันของยีน *SLC4A1* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน anion exchanger 1 ของเม็ดเลือดแดงและของไต (eAE1 และ kAE1) ทำให้เกิดความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและโรคไตผิดปกติในการขับกรด (dRTA) คณะผู้วิจัยได้พบมิวเตชันของยีน *SLC4A1* ร่วมกับความผิดปกติของการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน (ได้แก่ ธาลัสซีเมีย หรือฮีโมโกลบินอี) ในคนไทย ทำให้มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและการแตกของเม็ดเลือดแดง ซึ่งรุนแรงขึ้นเมื่อร่างกายมีภาวะเป็นกรด และพบมิวเตชันของยีน *SLC4A1* ชนิดใหม่ในประชากรไทยและประชากรอื่น จึงทำการสังเคราะห์โปรตีนจากยีนปกติและที่เกิดมิวเตชัน ในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ การเคลื่อนย้าย และตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ ความผิดปกติในการเคลื่อนย้ายและการค้างภายในเซลล์ของโปรตีน (kAE1) จากยีนที่เกิดมิวเตชัน อาจจะทำให้โปรตีนที่เยื่อหุ้มของเซลล์ลดลง ซึ่งทำหน้าที่ขับกรดที่ท่อฝอยของเนฟรอนในไต ซึ่งจะส่งผลให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรด

สาเหตุของโรคเบาหวานมีความหลากหลาย อาจเกิดจากความผิดปกติในวิถีทางชีวภาพต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ยีนที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่พบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (MODY) 6 ยีน ได้แก่ *HNF-4alpha*, *GCK*, *HNF-1alpha*, *IPF-1*, *HNF-1beta* และ *NeuroD1/beta2* ในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคเบาหวานชนิด MODY และในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่สองที่มีอายุน้อย ได้ถูกวิเคราะห์ คณะผู้วิจัยพบว่ามิวเตชันของ 6 ยีนนี้ เป็นสาเหตุส่วนน้อยของ MODY (19%) และโรคเบาหวานชนิดที่สองที่มีอายุน้อย (10%) ในผู้ป่วยไทย มิวเตชันชนิดใหม่ของยีน *HNF-1alpha* ได้ถูกค้นพบในครอบครัวไทยซึ่งเป็นโรคเบาหวานชนิด MODY ความผิดปกติในหน้าที่ของโปรตีนจากยีนที่เกิดมิวเตชัน ในการควบคุมการทำงานของยีนเป้าหมาย อาจจะทำให้เกิดความผิดปกติของเบต้า-เซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวานชนิด MODY

การติดเชื้อเด็งกีไวรัสของเซลล์ตับทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis แต่กลไกที่เกิดขึ้นในระดับอนุยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน คณะผู้วิจัยได้ค้นพบว่าโปรตีน capsid ของไวรัสเด็งกีจับกับโปรตีน Daxx

ของคนที่ ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม Fas-associated protein ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ โปรตีนทั้งสองปรากฏร่วมกันในนิวเคลียส เมื่อทำให้เซลล์สร้างโปรตีน capsid ของไวรัสเด็งกีและเหนี่ยวนำด้วย anti-Fas antibody จะทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ แสดงว่าปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน capsid ของไวรัสเด็งกีและโปรตีน Daxx เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่ติดเชื้อเด็งกีไวรัส เมื่อมีการกระตุ้นด้วย anti-Fas antibody เซลล์ที่สังเคราะห์โปรตีน capsid ของไวรัสเด็งกีที่ปกติ จะเกิดการตายแบบ apoptosis มากกว่าเซลล์ที่สังเคราะห์โปรตีนซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงให้ไม่สามารถเข้านิวเคลียสได้

โปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกี จะผ่านกระบวนการที่เกิดขึ้นใน endoplasmic reticulum ของโฮสต์เซลล์ จึงขึ้นกับกระบวนการทำงานของโฮสต์เซลล์ คณะผู้วิจัยพบว่าโดเมนที่สาม (domain III) ของโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกี จับกับโปรตีน BiP ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีเกี่ยวข้องกับโปรตีน calnexin และ calreticulin การทำให้โปรตีน BiP, calnexin และ calreticulin สังเคราะห์ลดลงด้วย siRNA จะทำให้มีการสร้างไวรัสเด็งกีลดลง แสดงว่าปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสามชนิดกับโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเด็งกีมีบทบาทสำคัญในการสร้างไวรัส

โปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกี เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไวรัสและพยาธิกำเนิดของโรคไข้เลือดออก แต่ยังไม่รู้ก่อนข้างน้อยว่าโปรตีน NS1 จะมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนภายในเซลล์ของโฮสต์และทำงานอย่างไร คณะผู้วิจัยได้พบว่าโปรตีน hnRNP C1/C2 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี การมีปฏิสัมพันธ์กันของโปรตีนทั้งสองอาจจะเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของไวรัส และ/หรือการตอบสนองต่อเซลล์เพื่อช่วยให้ไวรัสอยู่รอดในโฮสต์เซลล์

โดยสรุป คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธีทางพันธุศาสตร์/จีโนมิกส์และอนุชีววิทยาเพื่อศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมและกลไกในระดับอนุของโรค 4 ชนิด (ได้แก่ โรคนี้ในไต้หวัน โรคไข้เลือดออกในการระบาด โรคเบาหวาน และโรคไข้เลือดออก) ซึ่งมีความสำคัญในคนไทย โดยทำให้เกิดการค้นพบและความก้าวหน้าหลายอย่างในการศึกษาโรคเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาโรคเหล่านี้ต่อไป เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่สมบูรณ์และเพื่อที่จะพัฒนาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุม ป้องกันและรักษาโรคเหล่านี้

คำหลัก: โรคนี้ในไต้หวัน, โรคไข้เลือดออกในการระบาด, โรคเบาหวาน, โรคติดเชื้อไวรัสเด็งกี, พันธุศาสตร์, จีโนมิกส์, อนุชีววิทยา