การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *PMP22* ในโรคพันธุกรรมความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายที่พบบ่อย: CMT1A and HNPP

Determination of *PMP22* Gene Copy Number in Two Common Inherited Peripheral Neuropathies: CMT1A and HNPP

สุนิสา สวัสดิไชย[1], **ธีระพงศ์ โพธิ์เอี่ยม**[2], **กาญจนา หลงสะ**[2], **วรรณา ทองนพคุณ**[1] **และ ชนินทร์ ลิ่มวงศ์**[1,3]*

Sunisa Sawasdichai[1], Theeraphong Pho-iam[2], Kanjana Rongsa[2], Wanna Thongnoppakhun[1] and Chanin Limwongse[1,3]*

[1]หน่วยอณูพันธุศาสตร์; [2]เครือข่ายโรคพันธุกรรมระบบประสาท หน่วยวิจัยและพัฒนาบริการสุขภาพ สถานส่งเสริมการวิจัย; [3]สาขาวิชาเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

[1]Division of Molecular Genetics; [2]Siriraj Neurogenetics Network, Division of Health Service Research and Development, Department of Research and Development; [3]Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700

**Corresponding author: chanin.lim@mahidol.ac.th*

บทคัดย่อ

โรค Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) และโรค hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP) เป็นโรคพันธุกรรมที่มีความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายซึ่งพบได้บ่อย มีสาเหตุจากการซ้ำซ้อนและขาดหายไปตามลำดับของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.5 Mb ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 17 ตำแหน่ง p11.2 ซึ่งคร่อมยีน *peripheral myelin protein 22 (PMP22)* อาการแสดงของโรคสะท้อนถึงการที่ปริมาณโปรตีน PMP22 ที่มากหรือน้อยเกินไปส่งผลต่อการสร้างและรักษาสภาพของเยื่อไมอีลินที่ห่อหุ้มเซลล์ประสาทของระบบประสาทรอบนอก การตรวจหาจำนวนชุดของยีน *PMP22* มีความสำคัญต่อการวินิจฉัยแยกโรคและการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ของทั้งสองโรคโดยประยุกต์ใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ในช่วงเริ่มต้นและมีการพัฒนาปรับเปลี่ยนวิธีการมาเป็น semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC ในช่วงหลัง จากการศึกษาจำนวนชุดของยีน *PMP22* ในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรค CMT1A หรือ HNPP ซึ่งไม่ได้เป็นญาติกันจำนวน 125 ราย พบเพียง 19 ราย (ร้อยละ 15.2) และ 4 ราย (ร้อยละ 3.2) ที่เป็น *PMP22* duplication และ *PMP22* deletion ตามลำดับซึ่งยืนยันได้ว่าผู้ป่วยเป็นโรค CMT1A และ HNPP อย่างแน่นอน งานวิจัยนี้พบว่าเทคนิคที่ใช้ทั้งคู่มีความไว ได้ผลคงเดิมและเชื่อถือได้ แต่วิธี semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC นั้นทำได้ง่าย รวดเร็วและค่าใช้จ่ายน้อยกว่า จึงมีประสิทธิภาพมากกว่าเหมาะสมที่จะใช้ในงานประจำ การตรวจพบความผิดปกติของยีนในอัตราที่ต่ำในการศึกษาครั้งนี้อาจบ่งบอกได้ว่าโรคในกลุ่ม Charcot-Marie-Tooth เกิดจากสาเหตุทางพันธุกรรมที่หลากหลาย อย่างไรก็ดี ข้อมูลจากการศึกษานี้ได้ตอกย้ำถึงความจำเป็นของการตรวจวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ที่ถูกต้องแม่นยำสำหรับโรคในกลุ่มนี้

ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP) are two common inherited peripheral neuropathies caused by duplication and deletion, respectively of 1.5 Mb region on chromosome 17p11.2 encompassing *peripheral myelin protein 22 (PMP22)* gene. The disease phenotypes reflect the effect of the over- and under-expressed PMP22 protein on the peripheral nervous system (PNS) myelin formation and maintenance. Determination of *PMP22* gene copy number is important for diagnostic purpose and genetic counseling. We describe here the genetic testing for both diseases by application of initially quantitative real-time PCR and finally semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC techniques. We studied the *PMP22* gene dosage in 90 unrelated patients with suspected CMT1A or HNPP. Only 19 (15.2%) and 4 (3.2%) patients carried the *PMP22* duplication and *PMP22* deletion, thus being definitely diagnosed as CMT1A and HNPP, respectively. We found that both molecular *techniques* were sensitive, reproducible and reliable, but semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC was simpler, faster and cheaper, thus more effective to be used in a routine laboratory. The low detection rate in our study may imply the highly genetic heterogeneity of the Charcot-Marie-Tooth disease. However, this finding stresses the necessity of an accurate molecular diagnosis for the diseases.

คำสำคัญ: ยีน *PMP22*, โรค CMT1A, โรค HNPP, จำนวนชุดของยีน, ดีเอ็ชพีแอลซี

Keywords: *PMP22*, CMT1A, HNPP, gene copy number, DHPLC

บทนำ

โรค Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease (หรือ hereditary motor and sensory neuropathy: HMSN) type 1A เป็นโรคพันธุกรรมที่มีความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายที่พบได้บ่อยที่สุด มีความชุกของโรคอยู่ที่ 1 ต่อ 2,500 คน (Skre *et al*., 1974) ผู้ป่วยมีอาการแขนขาอ่อนแรง สูญเสียความรู้สึก กล้ามเนื้อฝ่อลีบและมักมีเท้าพิการ ส่วนโรค hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP) (หรือ tomaculous neuropathy) พบได้ 1 ต่อ 10,000 คน (Barisic *et al*., 2008) ผู้ป่วยจะมีอาการชา ไร้ความรู้สึกและอ่อนแรงเนื่องจากสูญเสียเยื่อไมอิลีนของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS demyelination) โรค CMT1A และ HNPP มีสาเหตุจากการจัดเรียงตัวใหม่ในจีโนม (genomic rearrangement) ของยีน peripheral myelin protein 22 (*PMP22*) อันเนื่องมาจากมีการซ้ำซ้อน (duplication) และขาดหายไป (deletion) ตามลำดับ ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1.5 Mb ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 17p11.2–12 ซึ่งคร่อมยีน *PMP22* เป็นผลให้มีจำนวนชุดของยีน *PMP22* โดยรวมของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็น 1.5 เท่า (มี 3 ชุดเทียบกับ 2 ชุดในคนปกติ) และลดลงเหลือ 0.5 เท่า (เหลือ 1 เทียบกับ 2 ในคนปกติ) ตามลำดับ (Chance *et al*., 1993) อาการแสดงของสองโรคนี้จึงเป็นผลมาจากการแสดงออกที่มากหรือน้อยเกินไปของยีน *PMP22* เนื่องจากโปรตีน *PMP22* ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อไมอีลิน (myelination) ที่ห่อหุ้มเส้นประสาทของระบบประสาทรอบนอก (peripheral nervous system, PNS) และควบคุมการเจริญเติบโตและเจริญพัฒนาของเซลล์ (cell differentiation)

การจัดเรียงตัวใหม่ของยีน *PMP22* ที่เป็นสาเหตุของสองโรคนี้ส่วนใหญ่เกิดจากการแลกเปลี่ยนที่ไม่สมดุลกัน (unequal recombination) ของ chromatids ในช่วง meiosis ระหว่างลำดับเบสซ้ำคู่เหมือนที่ขนาบข้างยีน *PMP22* (homologous flanking repeated sequences) ซึ่งเรียกว่า proximal CMT1A-REP และ distal CMT1A-REP ทั้งคู่มีขนาด 24 กิโลเบส (Lopes *et al*., 1999) นอกจากสาเหตุนี้แล้ว ยังมีการกลายพันธุ์แบบ point mutations ของยีน *PMP22* ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งสองได้อีกด้วย แต่เป็นส่วนน้อยเพียงร้อยละ 2 (สำหรับโรค CMT1A) และ 20 (สำหรับโรค HNPP) เท่านั้น (Barisic *et al*., 2008)

เทคนิคหลายอย่างถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาจำนวนชุดของยีน *PMP22* เช่น quantitative real-time PCR (Thiel *et al*., 2003), capillary electrophoresis (CE) (Hung *et al*., 2007), และ denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) (Lin *et al*., 2006) ซึ่งนิยมใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหาจำนวนชุดของยีนสำหรับโรคพันธุกรรม ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC ขึ้นในการตรวจหาจำนวนชุดของยีน *PMP22* เพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรค CMT1A และ HNPP โดยอาศัยวิธี quantitative real-time PCR ที่ใช้ในช่วงแรกเป็นเทคนิคอ้างอิง ซึ่งพบว่าวิธี PCR/DHPLC นี้มีประสิทธิภาพมากกว่าในแง่ของความสะดวก รวดเร็ว และประหยัด โดยที่ได้ผลถูกต้อง ชัดเจน และแปลผลง่าย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกว่าอาจเป็นโรค CMT1A หรือ HNPP ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือดจำนวน 125 ราย นำตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมาสกัด DNA แล้ววัดความเข้มข้นให้ได้ DNA ตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเท่ากันทุกตัวอย่าง

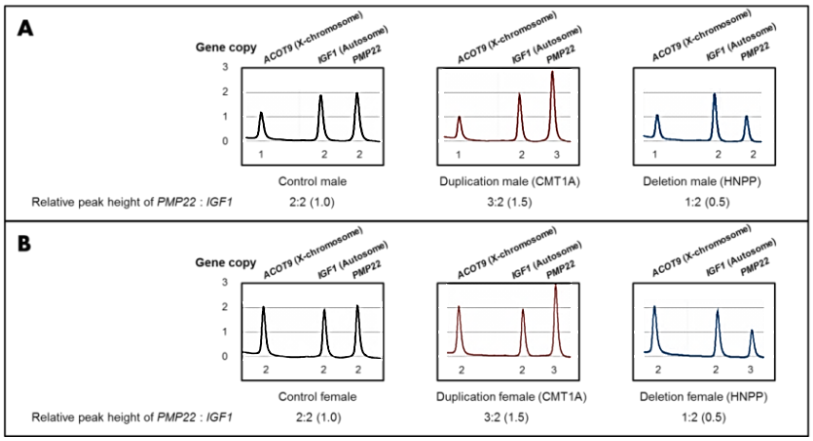
วิธี quantitative real-time PCR ใช้น้ำยา LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I กับเครื่อง LightCycler™ PCR แต่ละตัวอย่างแยกทำเป็น 2 ปฏิกิริยา โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ exon 3 ของยีน *PMP22* และใช้ยีน *human beta globin (HBB)* เป็นยีนอ้างอิง (internal control) การแปลผลใช้ค่า cycle threshold (Ct) ที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนของยีน *PMP22* ในผู้ป่วยต่อคนปกติ จากสูตร Relative gene copy number = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Thiel *et al*., 2003)

ส่วนเทคนิค semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC ใช้ primer 3 คู่ในปฏิกิริยาเดียว เป็น primer ที่จำเพาะต่อ exon 3 ของยีน *PMP22*, ต่อยีน *IGF1* (ใช้แทน autosome, อยู่บนโครโมโซม 12) และยีน *ACOT9* (ใช้อ้างอิงเพศของผู้ป่วย, อยู่บน X-chromosome) ซึ่งสอง primer หลังใช้เป็น internal control ทำ PCR ทั้งหมด 24

รอบเพื่อให้ปฏิกิริยายังคงอยู่ในระยะ log-linear phase (exponential phase) แล้ววิเคราะห์แยกขนาด PCR product ด้วย DHPLC โดยใช้ sizing mode ที่อุณหภูมิ 50°C การแปลผลดูที่ความสูงของ DHPLC chromatogram โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง peak ของยีน *PMP22* ต่อยีน *IGF1* โดยมีความสูง peak ของยีน *ACOT9* กำกับไว้ตรงตามเพศของตัวอย่างตรวจ (เพศชายมี 1 ชุด,เพศหญิงมี 2 ชุด) ในคนปกติจะมีอัตราส่วนของยีน *PMP22* ต่อ *IGF1* เท่ากับ 1 ส่วนในผู้ป่วย CMT1A และ HNPP จะมีอัตราส่วนเป็น 1.5 (duplication) และ 0.5 (deletion) ตามลำดับ ในขั้นตอนพัฒนาวิธีนี้ ได้ใช้ตัวอย่างมาตรฐานที่ทราบผลแล้วจากวิธี quantitative real-time PCR มาใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (positive control)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจวิเคราะห์ rearrangement ของยีน *PMP22* โดยใช้ semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC แสดงตัวอย่างตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ duplication และ deletion ของยีน *PMP22* ในผู้ป่วยโรค CMT1A และ HNPP ด้วยวิธี semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC ในทั้งเพศชายและหญิง กรณีที่เป็นปกติ (normal control) peak ของยีน *PMP22* และ *IGF1* มีความสูงเท่ากัน (2:2 หรือ 1.0 เท่า) ส่วนในคนที่เป็นโรค CMT1A (*PMP22* duplication) อัตราส่วนที่ได้จะเป็น 3:2 (1.5 เท่า) ขณะที่ผู้ป่วยโรค HNPP (*PMP22* deletion) มีอัตราส่วนเป็น 1:2 (0.5 เท่า) ส่วนความสูง peak ของยีน *ACOT9* ใช้อ้างอิงเพศของตัวอย่างตรวจ ในเพศชายจะมี 1 ชุด,เพศหญิงมี 2 ชุด (A) DHPLC chromatogram ในการตรวจหาจำนวนชุดของยีน *PMP22* ในเพศชาย (B) DHPLC chromatogram ในการตรวจหาจำนวนชุดของยีน *PMP22* ในเพศหญิง

เทคนิค semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษายีน *PMP22* นี้นับเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อย มีความถูกต้อง การทำ multiplex PCR ทำให้ประหยัดและสามารถคงอัตราส่วนจำนวนชุดของยีนไม่ให้เปลี่ยนแปลงจากการทำ PCR แต่ละครั้ง การเลือกใช้ DHPLC วิเคราะห์ผลแทนที่จะใช้ capillary electrophoresis ทำให้ลดค่าใช้จ่ายและสะดวกกว่า เพราะไม่ต้องใช้ primer ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์และไม่ต้องทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ก่อน

การตรวจหาจำนวนชุดของยีน *PMP22* โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ได้ใช้ตรวจในผู้ป่วย 52 รายแรก และตรวจพบ *PMP22* duplication และ *PMP22* deletion จำนวน 5 รายและ 2 ราย ตามลำดับ จากนั้นได้พัฒนาเทคนิค semi-quantitative multiplex PCR/DHPLC ขึ้นมาแทนโดยยังคงใช้ amplicon เดิมของยีน *PMP22* ร่วมกับยีนอ้างอิงชุดใหม่ เทคนิคหลังนี้ได้ใช้ตรวจในผู้ป่วยอีก 73 ราย ซึ่งตรวจพบ *PMP22* duplication 14 ราย และ *PMP22* deletion 2 ราย ดังนั้น ผลการตรวจในผู้ป่วยรวมทั้งหมด 125 ราย พบ *PMP22* duplication (CMT1A) 19 ราย (ร้อยละ 15.2) และ *PMP22* deletion (HNPP) 4 ราย (ร้อยละ 3.2) จะเห็นได้ว่าอัตราการตรวจพบทั้งสองโรคค่อนข้างต่ำมากเมื่อเทียบกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่า *PMP22* duplication และ deletion เป็นสาเหตุของโรค CMT1A และ HNPP สูงถึงร้อยละ 98 และ 80 ตามลำดับ (Barisic *et al*., 2008)

โรค CMT1A พบร้อยละ 60-90 ของผู้ป่วยโรค CMT type 1 และพบเป็นร้อยละ 40-50 ของผู้ป่วยโรค CMT ทั้งหมด (Barisic *et al*., 2008) ทั้งนี้ยังมีกลุ่มโรคที่มีอาการแสดงคล้ายคลึงกับ CMT1A อยู่อีกเป็นจำนวนมาก และมีความชัดเจนว่าเกิดจากสาเหตุทางพันธุกรรมที่หลากหลาย อาทิ ในกลุ่ม autosomal dominant demyelinating ที่เหมือนกันกับ CMT1A (CMT1), กลุ่ม AD axonal (CMT2), กลุ่ม autosomal recessive (CMT4) และ X-linked (CMTX) เป็นต้น ปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ในยีนที่เป็นสาเหตุของโรคกลุ่มนี้แล้วมากกว่า 30 ยีน โดยมียีนที่เกี่ยวข้องอยู่มากกว่า 44 ยีน เช่น *MPZ, SIMPLE, EGR2* และ *NEFL* เป็นต้น (Saporta *et al*., 2011) จึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจ *PMP22* duplication ในงานวิจัยนี้ ส่วนหนึ่งอาจเป็นโรค CMT แบบอื่นๆ อย่างไรก็ดี ผลการตรวจจำนวนชุดของยีน *PMP22* ที่ถูกต้องยังจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการวางแผนครอบครัวและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วย ถึงแม้จะยังไม่มีการรักษาที่ได้ผลดีในตอนนี้ แต่การทราบสาเหตุทางพันธุกรรมมีความจำเป็นต่อการทดสอบวิธีการรักษาของแพทย์ในปัจจุบัน

สรุปผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์จำนวนชุดของยีน *PMP22* แบบ duplication และ deletion ในผู้ป่วย CMT1A และ HNPP ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค semi-quantitative multiplex *PCR/DHPLC* ทดแทนวิธี quantitative real-time PCR นั้นทำให้ได้วิธีตรวจที่มีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย เชื่อถือได้ดีและแปลผลง่าย ใช้ตรวจยืนยันและประกอบผลการวินิจฉัยทางคลินิกของแพทย์ได้เป็นอย่างดี เป็นประโยชน์ต่อการดูแลรักษาและการวางแผนครอบครัวของผู้ป่วยให้เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Barisic N, Claeys KG, Sirotkovic-Skerlev M, Löfgren A, Nelis E, De Jonghe P, Timmerman V. Charcot-Marie-Tooth Disease: A Clinico-genetic Confrontation. Ann Hum Genet. 2008 May;72(Pt 3):416-41.

Chance PF, Pleasure D. Charcot-Marie-Tooth syndrome. Arch Neurol. 1993 Nov;50(11):1180-4.

Hung CC, Chien SC, Lin CY, Chang CH, Chang YF, Jong YJ, Hsieh ST, Hsieh WS, Liu MS, Lin WL, Lee CN, Su YN. Use of multiplex PCR and CE for gene dosage quantification and its biomedical applications for SMN, PMP22, and alpha-globin genes. Electrophoresis. 2007 Aug;28(16):2826-34.

Lin CY, Su YN, Lee CN, Hung CC, Cheng WF, Lin WL, Chen CA, Hsieh ST. A rapid and reliable detection system for the analysis of PMP22 gene dosage by MP/DHPLC assay. J Hum Genet. 2006;51(3):227-35.

Lopes J, Tardieu S, Silander K, Blair I, Vandenberghe A, Palau F, Ruberg M, Brice A, LeGuern E. Homologous DNA exchanges in humans can be explained by the yeast double-strand break repair model: a study of 17p11.2 rearrangements associated with CMT1A and HNPP. Hum Mol Genet. 1999 Nov;8(12):2285-92.

Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. Clin Genet 1974;6:98–118.

Thiel CT, Kraus C, Rauch A, Ekici AB, Rautenstrauss B, Reis A. A new quantitative PCR multiplex assay for rapid analysis of chromosome 17p11.2-12 duplications and deletions leading to HMSN/HNPP. Eur J Hum Genet. 2003 Feb;11(2):170-8.