การตรวจหาการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน Methyl CpG binding protein-2 (MECP2) ในผู้ป่วยไทยที่เป็นเรทซินโดรม ด้วยวิธี Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

ธันยภัทร วณิชชานนท์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)*
*วีรยุทธ ประพันธ์พจน์ พ.บ.***

Rett syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของการพัฒนาเซลล์ประสาทจัดอยู่ในกลุ่ม pervasive development disorder มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ X-linked dominant มักพบในเพศหญิง อุบัติการณ์ประมาณ 1:15,000 สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน Methyl CpG binding protein 2 (MECP2) การตรวจความผิดปกติด้วยการเพิ่มจำนวน DNA และอ่านลำดับเบส (PCR and sequencing) สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบเบสเดียว (point mutation) ได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถตรวจหาความผิดปกติชนิดที่มีการขาดหายหรือการเพิ่มจำนวนของ DNA ขนาดใหญ่ (gross rearrangement) ได้ด้วยข้อจำกัดทางเทคนิค

จากข้อจำกัดนี้การนำ multiplex ligation dependent probe amplication (MLPA) มาใช้ซึ่งเป็นวิธีที่มีการใช้ DNA ชิ้นเล็กๆ (probe) ที่มีการติดฉลากด้วยสี fluorescent ที่จำเพาะกับชิ้น DNA เป้าหมายของผู้ป่วยที่คาดว่ามีการขาดหายหรือการเพิ่มจำนวนขนาดใหญ่ จะช่วยเพิ่มโอกาสในการตรวจความผิดปกติของยีน MECP2

ผลการทดลองพบว่าจาก 28 ตัวอย่างของคนไข้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น rett syndrome แต่ไม่พบความผิดปกติของยีนนั้น เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี MLPA พบว่ามีการขาดหายของยีนขนาดใหญ่ 6 ตัวอย่างคิดเป็น 21% จากตัวอย่างทั้งหมด โดยบางชนิดของการขาดหายยังไม่เคยมีการรายงานในโลกมาก่อน ดังนั้นการนำวิธี MLPA มาใช้ตรวจหาความผิดปกติควบคู่ไปกับการใช้วิธี PCR sequencing จะเพิ่มความสามารถในการตรวจหาความผิดปกติอันจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยและครอบครัวได้

คำสำคัญ : Rett syndrome, MECP2 MLPA

** นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล*
***นายแพทย์เชี่ยวชาญ ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล*

The Gross Rearrangements of MeCP2 gene (Methyl CpG binding protein-2) in Thai Rett Syndrome patients detected by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

ThanyapatWanitchanon, M.Sc. (Medical Science)
VerayuthPraphanphoj, M.D,Ph.D.

Rett syndrome is a neurodevelopmental disorder, which is categorized as one of pervasive development disorders, is an X-linked dominant and mostly found in female which caused mainly by mutation in Methyl CpG binding protein 2 *(MECP2)*. Using Polymerase Chain Reaction followed by bi-directional sequencing can detect point mutation or small deletion or insertion; however, these approaches can not detect deletion or insertion that is larger than primer sets.Therefore, MultiplexLigation dependent Probe Amplication, which use uorescent-labeled oligonucleotides for multiplex PCR, is more suitable for detection of the gross rearrangement.

Out of 28 Rett syndrome samples,gross deletions were detected in 6 samples which is account for 21% in all samples. In addition, there are 2 known deletionsand 4 novel deletions. Therefore, applying MLPA following PCR and sequencing not only increase sensitivity for detection of mutations in *MECP2*, but also increase better quality of life for patients and their families.

Keywords : Rett syndrome, MECP2 MLPA

บทนำ

Rett syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรมจัดอยู่ในกลุ่ม pervasive developmental disorder จากการศึกษาทางระบบประสาทจัดRett syndrome อยู่ใน neurodevelopmental disorder มีลักษณะการถ่ายทอดแบบ X-linked dominant มีอุบัติการณ์อยู่ที่ 1:8,000-1:15,000 มักพบในเด็กผู้หญิง ส่วนเด็กผู้ชายพบได้ค่อนข้างน้อยและมักจะเสียชีวิตด้วย neonatal encephalopathy ลักษณะของโรคจะพบว่าเด็กจะมีพัฒนาการทางร่างกายและสติปัญญาปกติเหมือนเด็กทั่วไป แต่ต่อมาจะพบว่าเด็กมีความเปลี่ยนแปลงโดยในช่วง 6 ถึง 18 เดือนโดยมีพัฒนาการที่หยุดนิ่งและถดถอย acquired microcephaly สูญเสียความสามารถในการใช้มือ มีการเคลื่อนไหวมือที่ซ้ำๆ อาจเลียมือ กล้ามเนื้ออ่อนแรง เดินผิดปกติ ไม่พูด มีลักษณะคล้ายเด็กออทิสติก มีอาการลมชัก ยีนที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของ Rett syndrome[1] คือยีน *MECP2* โดยประกอบด้วย 4 exons และมี 2 transcripts หน้าที่ของโปรตีนเกี่ยวข้องกับการควบคุมยีนอื่นผ่าน epigenetic mechanism ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *MECP2* นั้นเป็นสาเหตุหลักของ Rett syndrome โดยพบถึง 80% ในผู้หญิงที่เป็น classic Rett syndrome

การตรวจหากลายพันธุ์ของยีน *MECP2* ในผู้ป่วย Rett syndrome โดยใช้วิธี PCR และ bi-directional sequencing นั้นสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ point mutation และ small deletion/insertion ได้อย่างไรก็ตามในผู้ป่วย Rett syndrome กว่า 30% นั้นการใช้วิธี PCR, bidirectional sequencing อาจไม่สามารถตรวจการกลายพันธุ์แบบ gross rearrangement[2] ได้เนื่องจากขอบเขตของการกลายพันธุ์นั้นอาจมีขนาดใหญ่กว่าขอบเขตที่สามารถตรวจได้ซึ่งอาจพบในกรณีที่มี gross deletion ส่วนในกรณี gross duplication นั้นถ้าไม่ตรวจด้วยวิธีการที่วัด copy number ก็ไม่สามารถตรวจได้เช่นกัน

จากข้อจำกัดของการตรวจด้วยวิธีการดังกล่าวจึงเป็นที่มาของการนำ MLPA[3] มาตรวจเพิ่มเติม เนื่องจากวิธีการนี้ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อตรวจสอบ gross rearrangement โดยเฉพาะ วิธีการนี้มีพื้นฐานจากการใช้โพรบจำนวน 2 โพรบไป hybridize ที่บริเวณที่ต้องการตรวจหา rearrangement แล้วทำการเชื่อมต่อทั้ง 2 โพรบเข้าด้วยกันตามด้วยการเพิ่มจำนวนโพรบคู่นั้นด้วยวิธี PCR แล้วนำมาวัดขนาดของชิ้น PCR product รวมทั้งวิเคราะห์ copy number โดยดูจากระดับของ uorescent intensity ด้วยวิธี capillary electrophoresis ซึ่งจะมีความไวและความถูกต้องสูง

ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล ได้ให้บริการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *MECP2* ในผู้ป่วย Rett syndrome โดยใช้วิธี PCR และ bi-directional sequencing และได้เล็งเห็นว่าวิธีการ MLPA ซึ่งเป็นวิธีการที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าเหมาะสมกับการตรวจ gross rearrangement และถูกนำไปใช้ในงานบริการอย่างแพร่หลายในต่างประเทศจะช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจหาความผิดปกติของยีน MECP2 ซึ่งจะนำไปสู่การวินิจฉัยที่ถูกต้องและเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยและครอบครัวมากขึ้น จึงได้ดำเนินการนำร่องในการตรวจวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอย่างจำนวนหนึ่งด้วยวิธีการดังกล่าว เพื่อตรวจหา gross rearrangement และเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายผลไปสู่การบริการในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อจัดตั้งวิธีการตรวจ MLPA (set up)
2. เพื่อตรวจหา gross rearrangement ของยีน MECP2 ในตัวอย่างของผู้ป่วย Rett syndrome ที่ผ่านการตรวจลำดับเบสด้วยวิธีการ sequencing แต่ไม่พบความผิดปกติ

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ได้มาจากการให้บริการที่ศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ตั้งแต่ปีพ.ศ.2545-2555 รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่างแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Rett syndrome จำนวนทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง เป็นเพศหญิงและเพศชาย 21 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับ ส่วนอีกกลุ่มคือกลุ่มคนปกติโดยมีจำนวนทั้งสิ้น 22 ตัวอย่าง เป็นเพศหญิงและเพศชาย 17 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ โดยทุกตัวอย่างได้รับการตรวจความผิดปกติด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ตามด้วยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของเบสด้วยวิธี bidirectional sequencing

การตรวจหาการขาดหายหรือการเพิ่มจำนวนของชิ้น DNA

ผู้วิจัยนำวิธี Multiplex Ligation dependent probe amplication (MLPA) โดยใช้ชุด P015-*MECP2* มาดำเนินการตรวจหาการขาดหายหรือเพิ่มจำนวนของชิ้น DNA ขนาดใหญ่ตามคู่มือการใช้ของใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งมีขั้นตอนคือเพิ่มจำนวน DNA หลายๆ ตำแหน่งด้วยวิธี multiplex PCR ที่มีการติดสี fluorescent จากนั้นนำตัวอย่าง PCR product ที่ได้ไปตรวจหาความเข้มของสีในแต่ละชิ้น DNA ด้วยวิธี capillary electrophoresis

การวิเคราะห์ผล

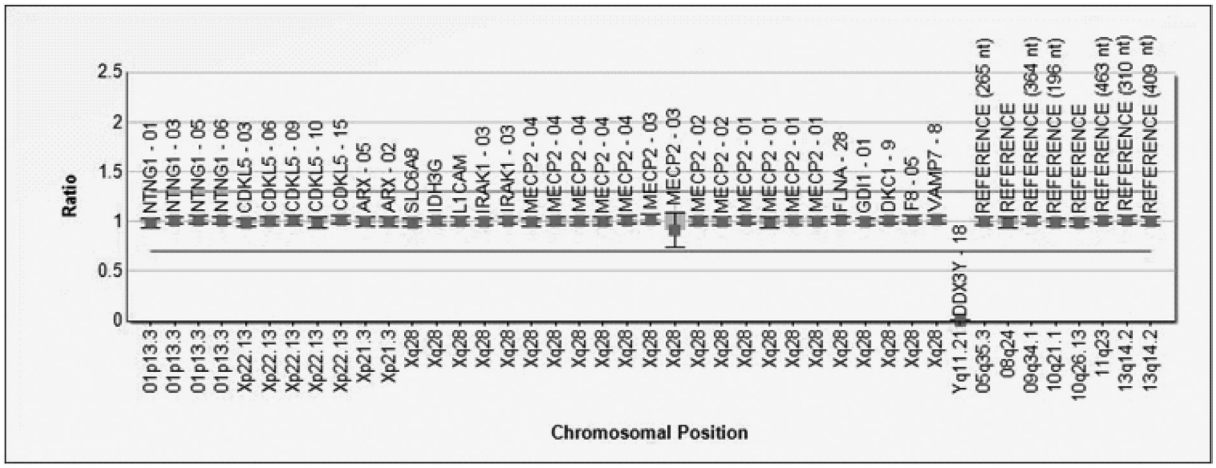
ผลที่ได้จากการทำ MLPA จะนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Coffalyser ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ทางบริษัทผู้ผลิตน้ำยาออก MLPA แบบมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลโดยเฉพาะ โดยในที่นี้ผู้วิจัยใช้หลักการวิเคราะห์แบบ block method

การตรวจหาตำแหน่งลำดับเบสที่มีการขาดหาย

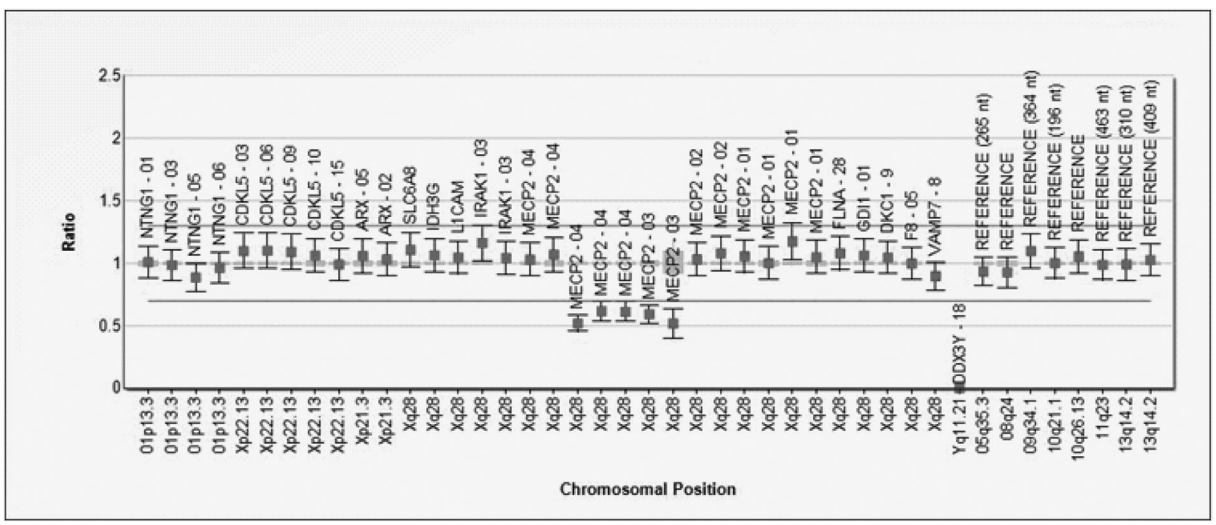
ใช้วิธี PCR และ bidirectional sequencing โดยออกแบบชุดไพรเมอร์ใหม่โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปจาก Biotools kit (Chang Bioscience) เพื่อตรวจหาบริเวณที่มีการขาดหายและเพื่อใช้ในการตรวจสอบว่าความผิดปกติที่พบเคยมีการรายงานในวารสารมาก่อนหรือไม่

ผลการศึกษา

ผลการตรวจด้วยวิธี MLPA พบว่าในตัวอย่างของคนปกตินั้นไม่พบการหายหรือการเพิ่มจำนวนของยีน MECP2 ดังรูปที่ 1 ซึ่งแต่ละโพรบอยู่ในช่วงปกติ ยกเว้นโพรบที่จำเพาะต่อ Y ที่อยู่นอกช่วงปกติ เนื่องจากเป็นโพรบที่จำเพาะต่อเพศชายแต่ตัวอย่างเป็นเพศหญิงจึงให้ ratio เป็นศูนย์ส่วนผลการตรวจในตัวอย่าง Rett syndrome พบการขาดหายขนาดใหญ่จำนวน 6 ตัวอย่างซึ่งทุกตัวอย่างเป็นตัวอย่างเพศหญิงดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 2 ซึ่งพบการขาดหายของ DNA ในยีน *MECP2* ตั้งแต่ exon ที่ 3 ถึงบางส่วนของ exon ที่ 4 ซึ่งทุกตัวอย่างที่พบการขาดหายของยีน *MECP2* จะได้รับการวิเคราะห์ต่อเพื่อให้ทราบถึงขนาด ตำแหน่งที่แน่นอนของการขาดหาย นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบกับฐานข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน *MECP2* ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งสรุปไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ MLPA ตัวอย่างผู้หญิงปกติ แกน X คือ ตำแหน่งของชิ้น DNA ในโครโมโซม แกน Y คือprobe ratio



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์ MLPA ตัวอย่างผู้หญิงที่เป็น rett syndrome แกน X คือ ตำแหน่งของชิ้น DNA ในโครโมโซม แกน Y คือ probe ratio

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจพบการขาดหายในยีน MECP2

ผู้ป่วย	เพศ	การวินิจฉัย	ชนิดของการกลายพันธุ์
คนที่1	หญิง	Classic Rett syndrome	c1164_1207del44 (p.P389X)
คนที่2	หญิง	Classic Rett syndrome	c1269-1444del175 (p.L424fs)
คนที่3	หญิง	Classic Rett syndrome	c1064_1342del278 (p.S355fs)
คนที่4	หญิง	Classic Rett syndrome	c.(1152_1201)del 44 (p.R396X)
คนที่5	หญิง	Classic Rett syndrome	มีการขาดหายของ exon 3 ถึง exon 4
คนที่6	หญิง	Classic Rett syndrome	มีการขาดหายของ exon 3 ถึง exon 4

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าทุกตัวอย่างที่ตรวจพบเป็นเพศหญิงที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น classic Rett syndrome โดยการขาดหายของยีนที่ตรวจพบนั้นมีขนาดต่างกัน 44 เบสจนถึง 278 เบสโดยการขาดหายมักเกิดขึ้นใน exon ที่ 3 และ exon ที่ 4 ของยีน MECP2 ถึงแม้ว่าการขาดหายที่พบในตัวอย่างที่ 1 และ 4 จะเคยมีรายงานในวารสารแล้วแต่ถึงว่าการกลายพันธุ์ในตัวอย่างที่ 1, 3, 5 และ 6 นั้นยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนจึงเป็นชนิดที่พบครั้งแรกโดยทีมผู้วิจัย

วิจารณ์

การนำวิธี MLPA มาใช้สามารถตรวจหาการขาดหายของ DNA ในยีน *MECP2* ที่ไม่สามารถตรวจหาด้วยการใช้วิธี PCR และ bidirectional sequencing โดยสามารถบอกขอบเขตของการขาดหายว่าเกิดขึ้นในส่วนใดของยีน นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบว่ามีการขาดหายในยีนอื่นๆ ที่อยู่บริเวณใกล้เคียง อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบไม่พบการขาดหายของยีนอื่นๆ ดังนั้นการขาดหายของยีน *MECP2* ในผู้ป่วย Rett syndrome จึงน่าจะเป็นชนิดที่พบได้บ่อยกว่าการขาดหายในยีนอื่นซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้

นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าการขาดหายของยีนที่พบนั้นพบเฉพาะในผู้ป่วยเพศหญิงเนื่องจากการขาดหายของยีนที่อยู่บนโครโมโซม X นั้นมักก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในเพศชาย ส่วนเพศหญิงนั้นความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับสถานะของ methylation ในโครโมโซม X จากกระบวนการ X chromosome inactivation (XCI) ดังนั้นจึงพบว่าความผิดปกติของยีน *MECP2* ในเพศชายมักเกิดจากการกลายพันธุ์ชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงหนึ่งเบส (point mutation)[4, 5, 6, 7, 8]

การตรวจด้วยวิธี PCR และ bidirectional sequencing ตามด้วยวิธี MLPA ใน 28 ตัวอย่าง rett syndrome มี 22 ตัวอย่างที่ไม่พบความผิดปกติซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุอื่นเช่น อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ชนิดที่อยู่ในส่วน intron หรือการกลายพันธุ์ในยีนอื่นเช่น Cyclin dependent kinase-like 5 *(CDKL5)*[9, 10] และ Forkhead box G1 *(FOXG1)*[11, 12]

การตรวจด้วยวิธี MLPA จะช่วยให้การตรวจหาความผิดปกติในยีน *MECP2* มีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากสามารถตรวจพบการขาดหายได้ถึง 6 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งสิ้น 28 ตัวอย่างซึ่งคิดเป็น 21% จากตัวอย่าง Rett syndrome ทั้งหมด การ

ตรวจพบการขาดหายขนาดใหญ่นี้มีการรายงานในต่างประเทศ 2 ชนิดคือ c.1164_1207del44 (p.P389X) ที่พบในเด็กผู้หญิงอังกฤษ[13] และ c.1158_1201del 44 (p.P389X) ที่พบในเด็กผู้ชายและพบในแม่ที่เป็นพาหะ[14] ถึงแม้ว่าขอบเขตการขาดหายต่างกันแต่ส่งผลให้การสร้างกรดอะมิโนมีความผิดปกติเหมือนกัน ส่วนอีก 4 ตัวอย่างนั้นเป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

ดังนั้นการตรวจหาความผิดปกติของยีน *MECP2* ในผู้ป่วย Rett syndrome ควรเริ่มต้นจากการทำ PCR และ bidirectional sequencing เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงหนึ่งเบสซึ่งเป็นชนิดที่พบได้มากกว่า 70% ของผู้ป่วย Rett syndrome ในกรณีไม่พบความผิดปกติให้ตรวจต่อด้วยวิธี MLPA ที่สามารถตรวจหาความผิดปกติในยีน *MECP2* แบบที่มีการขาดหายหรือเพิ่มจำนวนขนาดใหญ่ จึงควรใช้ทั้งวิธี PCR และ bidirectional sequencing และ MLPA ควบคู่กันไป

ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันราชานุกูล สามารถนำวิธี MLPA มาใช้ในงานบริการซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาความผิดปกติของยีน *MECP2* และเพิ่มความจำเพาะต่อการตรวจหาความผิดปกติด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาในบุตรคนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันราชานุกูล กรมสุขภาพจิต

เอกสารอ้างอิง

1. Amir RE, Van dV, I, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. NatGenet1999; 23:185-8.
2. Schollen E, Smeets E, Deem E, Fryns JP, Matthijs G. Gross rearrangements in the *MECP2* gene in three patients with Rett syndrome: implications for routine diagnosis of Rett syndrome. Hum Mutat2003; 22:116-20.
3. Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlstrom J. Multiplex ligation-dependent probe amplication (MLPA) detects large deletions in the *MECP2* gene of Swedish Rett syndrome patients. Genet Test 2003; 7:329-32.
4. Schanen NC, Kurczynski TW, Brunelle D, Woodcock MM, Dure LS IV, Percy AK. Neonatal encephalopathy in two boys in families with recurrent Rett syndrome. J Child Neurol.1998; 13: 229-31.
5. Villard L, Kpebe A, Cardoso C, Chelly PJ, Tardieu PM, Fontes M. Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular ndings. Neurology.2000; 55: 1188-93.
6. Zeev BB, Yaron Y, Schanen NC, Wolf H, Brandt N, Ginot N, Shomrat R, Orr-Urtreger A. Rett syndrome: clinical manifestations in males with *MECP2* mutations. J Child Neurol.2002; 17: 20-4.
7. Schwartzman JS, Bernardino A, Nishimura A, Gomes RR, Zatz M. Rett syndrome in a boy with a 47,XXY karyotype conrmed by a rare mutation in the *MECP2* gene. Neuropediatrics.2001; 32: 162-4.
8. Topcu M, Akyerli C, Sayi A, Toruner GA, Kocoglu SR, Cimbis M, Ozcelik T. Somatic mosaicism for a *MECP2* mutation associated with classic Rett syndrome in a boy. Eur J Hum Genet.2002; 10: 77-81.
9. Li MR, Pan H, Bao XH, Zhu XW, Cao GN, Zhang YZ et al. Methyl-CpG- binding protein 2 gene and *CDKL5* gene mutations in patients with Rett syndrome: analysis of 177 chinese pediatric patients. Zhonghua Yi XueZaZhi. 2009: 89(4):224-9
10. White R, Ho G, Schmidt S, Scheffer IE, Fischer A, Yendle SC et al. Cyclin-dependent kinase-like 5 mutation screening in Rett syndrome and related disorders. Twin Res Hum Genet. 2010: 13(2): 168-78.
11. Hadzsiev K, Polgar N, Bene J, Komlosi K, Karteszi J, Hollody K et al. Analysis of Hungarian patients with Rett syndrome phenotype for *MECP2*, *CDKL5* and *FOXG1* gene mutations. J Hum Genet. 2011: 56(3): 183-7.
12. Roche-Martinez A, Gerotina E, Armstrong-Moron J, Sans-Capdevila O, Pineda M. *FOXG1*, a new gene responsible for the congenital form of Rett syndrome. Rev Neurol. 2011: 52(10): 597-602
13. David J. Bunyan and David O. Robinson.Multiple De Novo mutations in the *MECP2* gene. Genetic Testing. September 2008, 12(3): 373-375.
14. Dayer AG, Bottani A, Bouchardy I, Fluss J, Antonarakis SE, Haenggeli CA et al. *MECP2* mutant allele in a boy with Rett syndrome and his unaffected heterozygous mother. Brain Dev. 2007 Jan;29(1):47-50.