

การพัฒนาการตรวจยีน BRAF ในผู้ป่วย Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome นายธัญภัทร วณิชชานนท์, ศรันย์พร สัจจะบันดาลใจ, นายแพทย์วีรยุทธ ประพันธ์พจน์

Abstract

ผู้ป่วยหญิงที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์สถาบันราชานุกูลว่าเป็น Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome และต้องการตรวจหาสาเหตุทางพันธุกรรมโดยการตรวจด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์จึงได้รับมืออบหมายให้ออกแบบวิธีการเพื่อตรวจหาความผิดปกติด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และ bidirectional sequencing ผลการตรวจด้วย bioinformatics tools สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงเบส G เป็น A ที่ตำแหน่ง 1406 (c.1406G>A) ในยีน BRAF และส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง 469 จาก glycine เป็น glutamic acid (p.G469E) และมีการรายงานในวารสารว่าเป็นสาเหตุของ CFC syndrome นอกจากนี้ยังมีการตรวจยีน BRAF ในพ่อและแม่อย่างไรก็ตามไม่พบความผิดปกติของยีนจึงสันนิษฐานว่าการกลายพันธุ์ที่พบในลูกนั้นเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ (de novo) นอกจากนี้พ่อและแม่ไม่ได้เป็นพาหะของโรค

Keywords; Cardio-Facio-Cutaneous syndrome, BRAF, Polymerase Chain Reaction, Sanger sequencing, bioinformatics

Introduction

Cardio-Facio-Cutaneous syndrome เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่องทางสติปัญญาและมีความผิดปกติแต่กำเนิดหลายแบบ มักพบความผิดปกติของหัวใจแต่กำเนิด มีลักษณะใบหน้า ผิวน้ำแข็ง เส้นผมที่ผิดปกติ มีปัญหาในการทาน กล้ามเนื้ออ่อนแรง มีอาการชัก สาเหตุทางพันธุกรรมมักเกี่ยวข้องกับยีนที่อยู่ใน RAS/MAPK pathway เช่นยีน BRAF, MEK1 และ MEK2 ที่ควบคุมการเติบโต การเปลี่ยนแปลง การเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาในระยะ embryo นอกจากนี้การวินิจฉัยอาจมีความใกล้เคียงกับ Noonan syndrome และ Costello syndrome เนื่องจากมีสาเหตุของกลายพันธุ์ในยีนที่อยู่ใน pathway เดียวกัน

เดิมที่มีการบริการตรวจยีน BRAF, MEK1 และ MEK2 ในต่างประเทศเช่นสหรัฐอเมริกา ยุโรปและญี่ปุ่นแต่เนื่องจากค่าตรวจมีราคาสูงเมื่อเทียบกับการออกแบบการตรวจเองในประเทศ ทางศูนย์วิจัยพันธุศาสตร์การแพทย์จึงดำเนินการออกแบบวิธีการตรวจควบคู่กับการทบทวนการรายงานในวารสารซึ่งแนะนำว่าควรตรวจยีน BRAF ก่อนเนื่องจากเป็นยีนที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุด (68.5%) อย่างไรก็ตามในกรณีที่ไม่พบสาเหตุให้ตรวจยีนอื่นๆเช่น MEK1 และ MEK2¹

Objectives

1. เพื่อออกแบบวิธีการที่สามารถตรวจพบสาเหตุของ Cardio-Facio-Cutaneous syndrome ได้
2. สามารถรองรับการตรวจยีน BRAF ในผู้ป่วย Cardio-Facio-Cutaneous syndrome

Material and method

1. ตัวอย่าง DNA ได้รับการเจาะจากห้องเจาะเลือด กลุ่มงานเทคนิคบริการ โดยเจาะทั้งสิ้น 3 ตัวอย่างประกอบด้วย ผู้ป่วยหญิงรวมทั้งพ่อและแม่
2. ชุดไพรเมอร์ (DNA ชิ้นเล็กๆขนาด 18-24 mer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณที่ต้องการตรวจด้วยวิธี PCR) ที่ใช้ในการตรวจได้รับการออกแบบโดยคัดเลือกยีนเป้าหมายจากการรายงานในวารสาร และดำเนินการสรุปตำแหน่งที่มีความสำคัญทางคลินิก ที่มีรายงาน จากนั้นออกแบบ

และควบคุมคุณภาพ ด้วยการใช้ซอฟต์แวร์ทางไบโออินฟอร์มาติก หลายๆโปรแกรม (Primer3, Biomart, UCSC genome browser) ทำให้ได้ชุดไพรเมอร์ที่มีคุณภาพ 6 ชุดที่มีความจำเพาะต่อ ยีน BRAF ใน exon ที่ 11, 12, 13, 14, 15 และ 16 ตามตารางที่ 1

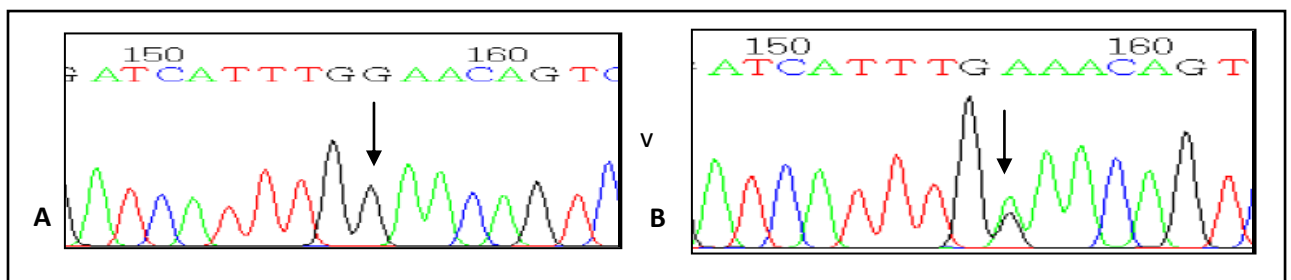
ตารางที่ 1 ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาความผิดปกติในยีน BRAF

No.	Name	Seq (5'-3')	Length (mer)
1	BRAFe11F	TTCCAAAAGGTCTATATTTAAAC	23
2	BRAFe11R	CTGAAATATCTGAATTCTGGAC	22
3	BRAFe12F	TCCCTCTCAGGCATAAGG	18
4	BRAFe12R	GTAATAAAATGGTAGGAGTCC	21
5	BRAFe13F	GATATTTTGAATACTAGTACAGG	24
6	BRAFe13R	TGAGTAAATCTGTAAAGCTAATAG	24
7	BRAFe14F	TAAGCAACCTCTAGTTGCC	19
8	BRAFe14R	TATGTTCTGAAGGCTGCAC	19
9	BRAFe15F	AATAGGCTTGACTGGAGTG	19
10	BRAFe15R	TCGAGAAACCAAAGCAGG	19
11	BRAFe16F	CTAACACATTTCAAGCCCC	19
12	BRAFe16R	AGTTGAGACCTTCAATGAC	19

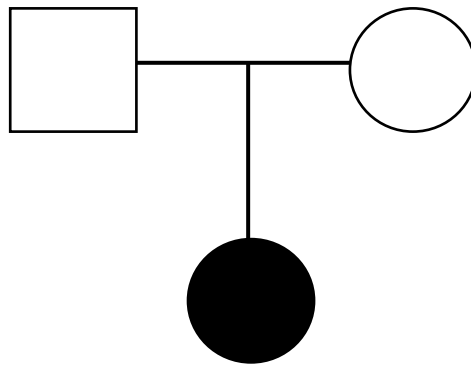
- การตรวจลำดับเบส ส่งตรวจต่อที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้และนำผลดิบมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Sequencher และ CCDS

Result

ผลการตรวจด้วยชุดไพรเมอร์ทั้งหกชุดพบการเปลี่ยนแปลงของเบสตามรูป 1B ในผู้ป่วยหญิงที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น CFC syndrome แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเบสในคนปกติตามรูป 1A นอกจากนี้ผลการตรวจในพ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่พบการกลายพันธุ์ (รูปที่2)



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจใน exon ที่ 11 ของคนปกติ (A) และผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น CFC syndrome



c.1406G>A

รูปที่ 2 แสดง pedigree ของครอบครัวที่มีผู้ป่วย CFC syndrome

Discussion

ผลการตรวจด้วย bioinformatics tools สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงเบส G เป็น A ที่ตำแหน่ง 1406 (c.1406G>A) ใน exon ที่ 11 ของยีน *BRAF* และส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง 469 จาก glycine เป็น glutamic acid (p.G469E) และมีการรายงานในวารสาร และฐานข้อมูล Cosmic ว่าเป็นสาเหตุของ CFC syndrome นอกจากนี้ยังมีการตรวจยีน *BRAF* ในพ่อและแม่อย่างไรก็ตามไม่พบความผิดปกติของยีนจึงสันนิษฐานว่าการกลายพันธุ์ที่พบในลูกนั้นอาจเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ (de novo) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในต่างประเทศ² นอกจากนี้พ่อและแม่ไม่ได้เป็นพาหะของโรค

การตรวจยีนที่เป็นสาเหตุของ CFC syndrome นั้นกรณีที่ไม่พบความผิดปกติในยีน *BRAF*, *MEK1*, *MEK2* อาจเป็นเพราะว่ามียีนอื่นที่เป็นสาเหตุ (30 %) ดังนั้นจึงควรใช้เทคโนโลยีอื่นที่สามารถตรวจหาความผิดปกติในเชิงลึกเช่น Array CGH และ Next Gen Sequencing (NGS)

References

1. Suzanne BC, Judith EA. Management of genetic syndromes. 3rd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2010.
2. Roberts A, Allanson J, Jadico SK, et al., (2006) The Cardio-Facio-Cutaneous (CFC) syndrome: A review. J Med Genet 43:833-842.