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 ศุภปีติพร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

ความผิดปกติของแก้วตาเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียการมองเห็นซึ่งเป็นความทุพพลภาพที่กระทบต่อประชาชนอย่างสำคัญ ความผิดปกติของแก้วตาหลายชนิดสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ ความผิดปกติอาจจะพบเฉพาะที่แก้วตา หรือพบร่วมกับอวัยวะหลายระบบ และบางชนิดได้รับการค้นพบถึงสาเหตุซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน โรค congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2) เป็นโรคพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความผิดปกติของแก้วตาตั้งแต่แรกเกิดหรือวัยเด็กเล็ก การกลายพันธุ์ในยีน sodium bicarbonate transporter-like solute carrier family 4 member 11 (*SLC4A11*) พบในผู้ที่เป็นโรค CHED2 นอกจากนี้ ความผิดปกติของแก้วตาพบในกลุ่มโรคพันธุกรรมบางโรคที่มีการสะสมสารในเซลล์ต่างๆของร่างกาย โรคมิวโคโพลีแซคคาไรโดซิส ชนิดที่ 1 (mucopolysacchridosis type I, MPS I) เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมในลักษณะด้อยที่มีการสะสมสารในไลโซโซม เกิดจากการขาดหรือการพร่องของเอนไซม์ alpha-L-iduronidase (IDUA) นำไปสู่การสะสมของสารไกลโคสะมิโนไกลแคน เฮพาแรน ซัลเฟต และเดอร์มาแตน 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) การกลายพันธุ์อีกชนิดเกิดจากการขาดหายไปของนิวคลิโอไทด์จำนวน 68 kb ซึ่งครอบคลุมถึงส่วนของยีน *SLC4A11* ทั้งหมด ซึ่งพบว่าถ่ายทอดมาจากบิดา การศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่บรรยายการขาดหายไปของสารพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยโรค CHED2 การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาการขาดหายไปดังกล่าวในผู้ป่วยโรค CHED2 ที่ได้มีการรายงานมาก่อนแต่ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อใช้วิธี PCR-sequencing มีความจำเป็น นอกจากนี้ ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยไทยที่เป็นกลุ่มอาการ Hurrler (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 การกลายพันธุ์ชนิดนี้อาจจะเป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในประชากรไทย การทดสอบผลของการกลายพันธุ์ชนิด p.E276K ในเซลล์ COS-7 พบมีการลดลงของการทำงานของเอนไซม์ IDUA อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งสนับสนุนว่าเป็นการกลายพันธุ์นี้เป็นสาเหตุของโรค การศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน *CTNS* ในผู้ป่วยโรค cystinosis จำนวน 6 คนจากทั้งหมด 4 ครอบครัว ด้วยวิธี PCR sequencing พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 อัลลีลซึ่งร่วมทั้งการกลายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิดคือ p.G309D และ p.Q284X การศึกษานี้ได้ค้นพบการกลายพันธุ์ใหม่เพิ่มเติมจากเดิมและได้ขยายการศึกษาในประชากรไทยที่เป็น cystinosis

การศึกษาวิจัยนี้ได้เพิ่มชนิดของการกลายพันธุ์และเน้นถึงบทบาทที่สำคัญของการทดสอบทางพันธุกรรมในการให้การวินิจฉัยได้อย่างแน่นอน การให้การรักษาในระยะแรกเริ่ม และการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม

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