การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของ *KCND3* และ Linkage Analysis ของ *KCNA4* และ *KCNA5* ในโรคไหลตายที่มีลักษณะของบรูกาดาซินโดรม

นางสาวเทียมจิต ไชยชนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5824-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATION SCREENING OF *KCND3* AND LINKAGE ANALYSIS OF *KCNA4* AND *KCNA5* IN SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME WITH BRUGADA SYNDROME PHENOTYPE

Miss Thiamjit Chaichana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Program of Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5824-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของ *KCND3* และ Linkage Analysis ของ *KCNA4* และ *KCNA5* ในโรคไหลตายที่มีลักษณะของบรูกาดาซินโดรม
โดย	นางสาวเทียมจิต ไชยชนะ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

เทียมจิต ไชยชนะ : การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของ *KCND3* และ Linkage Analysis ของ *KCNA4* และ *KCNA5* ในโรคไหลตายที่มีลักษณะของบรูกาดาซินโดรม (MUTATION SCREENING OF *KCND3* AND LINKAGE ANALYSIS OF *KCNA4* AND *KCNA5* IN SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME WITH BRUGADA SYNDROME PHENOTYPE) อ.ที่ปรึกษา : อาจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 66 หน้า. ISBN 974-17-5824-3.

โรคไหลตาย หรือ Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant ผู้ป่วยไหลตายมีคลื่นไฟฟ้าหัวใจแบบ right bundle branch block และ ST-segment elevation ใน lead V_1-V_3 ที่นำไปสู่การเกิด ventricular fibrillation ซึ่งลักษณะคลื่นไฟฟ้าหัวใจดังกล่าวคล้ายคลึงกับผู้ป่วยกลุ่มอาการบรูกาดา โดย 25% ของผู้ป่วยบรูกาดามีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *SCN5A* ซึ่งเป็นยีนของช่องโซเดียมของกล้ามเนื้อหัวใจ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า ST-segment elevation เกิดจาก transmural gradient ของกล้ามเนื้อหัวใจที่เป็นผลมาจาก I_{to} ที่เกิดจากกระแสที่ผ่านช่องโปตัสเซียมของกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคได้ จึงทำการศึกษายีนของช่องโปตัสเซียมของกล้ามเนื้อหัวใจที่เกี่ยวข้องกับ I_{to} โดยการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *KCND3* โดยวิธี direct sequencing ทั้ง 7 exon ในผู้รอดชีวิตจากไหลตาย 2 ราย จากครอบครัวไหลตายที่ทำการศึกษา linkage analysis แล้วไม่สามารถ exclude linkage ได้ ผลปรากฏว่าไม่พบการกลายพันธุ์ใน exon ที่ 2 ถึง 7 ในผู้รอดชีวิตทั้ง 2 ราย และทำการศึกษา linkage analysis ของยีน *KCNA4* และ*KCNA5* โดยวิธี microsatellite ในครอบครัวไหลตาย 3 ครอบครัว ปรากฏว่าไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโครโมโซมในตำแหน่งใกล้ยีน *KCNA5* แต่พบว่าอาจมีการถ่ายทอดโครโมโซมในตำแหน่งใกล้ยีน *KCNA4* ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวจึงควรจะมีการศึกษายีน *KCNA4* ต่อไปว่าเป็นสาเหตุของโรคไหลตายหรือไม่ต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 52264 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS: SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME (SUDS) / BRUGADA SYNDROME / VENTRICULAR FIBRILLATION / TRANSIENT OUTWARD CURRENT

THIAMJIT CHAICHANA: MUTATION SCREENING OF *KCND3* AND LINKAGE ANALYSIS OF *KCNA4* AND *KCNA5* IN SUDDEN UNEXPLAINED DEATH SYNDROME WITH BRUGADA SYNDROME PHENOTYPE. THESIS ADVISOR: SOMKIAT SANGWATANAROJ, M.D., THESIS COADVISOR: DR.VORASUK SHOTELERSUK, M.D., 66 pp. ISBN 974-17-5824-3.

Lai-tai or Sudden Unexplained Death Syndrome (SUDS) is a genetic disorder with the mode of transmission of autosomal dominant. SUDS survivors share the same ECG pattern as Brugada syndrome (Right bundle branch block and ST-segment elevation in leads V_1-V_3) that lead to ventricular fibrillation. About the twenty-five percentage of Brugada syndromes are caused by cardiac sodium channel gene (*SCN5A*) mutation. It has been suggested that potassium transient outward current (I_{to}) may responsible for the ST-segment elevation. In mutation screening, shows no mutation on exons 2 to 7 of *KCND3* gene in 2 SUDS survivors, which can not exclude linkage in linkage study. To determine whether cardiac potassium channel gene was the caused of the disorder, we performed linkage studies on 3 SUDS families with the Brugada phenotype in *KCNA4* and *KCNA5* gene by four polymorphic markers and found genetic linkage in *KCNA4* but not link in *KCNA5* gene. Future genetic studies in *KCNA4* and other cardiac potassium channel genes might elucidate the molecular basis of SUDS.

Field of study Medical Science

Academic year 2003

Student's signature Thiamjit Chaichana

Advisor's signature .....

Co-advisor's signature Vorasuk Shotelersuk

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำสั่งสอนอย่างดียิ่งจากอาจารย์นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษา จึงกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และตรวจทานแก้ไข

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่กรุณาให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการวิทยานิพนธ์และให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องห้องปฏิบัติการในการวิจัย เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ อีกทั้งคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ที่กรุณาให้เกียรติมาเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต คุณวิชัย พรธนเกษม คุณนริศร คงรัตนโชค และคุณนุสรา หัวไผ่ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆในการทำการวิจัย และทุกๆ กำลังใจที่มีให้เสมอมา

และกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นกำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนและส่งเสริมจนประสบความสำเร็จ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูปภาพ..... ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

3. วิธีดำเนินการวิจัย..... 23

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 34

5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 41

รายการอ้างอิง..... 47

ภาคผนวก 53

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 66

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ต่างๆของช่องทางโปตัสเซียมของกล้ามเนื้อหัวใจ.....	16
2	แสดงค่า lod score ของ marker D1S2696 ในครอบครัวต่างๆ 4 ครอบครัว.....	21
3	แสดงค่า lod score ของ marker D1S2746 ในครอบครัวต่างๆ 4 ครอบครัว.....	22
4	แสดง polymorphic markers ที่ใช้ในการทำ linkage study.....	28
5	แสดงส่วนผสมในการติดฉลากด้วยสารรังสี.....	28
6	แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR.....	29
7	แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR.....	29
8	แสดงส่วนผสมในการเตรียม 6% denaturing polyacrylamide gel.....	30
9	primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *KCND3*.....	31
10	แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเตรียม DNA สำหรับการตรวจกรองการกลายพันธ์ยีน *KCND3*.....	32
11	แสดงอุณหภูมิที่ใช้ของปฏิกิริยา PCR ในการเตรียม DNA สำหรับการตรวจกรองการกลายพันธ์ยีน *KCND3*.....	32
12	แสดงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาของ DNA sequencing.....	33
13	แสดงค่า lod score ของตำแหน่ง marker ใกล้ยีน *KCNA4* ในครอบครัว BNG...	37
14	แสดงค่า lod score ของตำแหน่ง marker ใกล้ยีน *KCNA4* ในครอบครัว IQ2I....	37
15	แสดงค่า lod score ของยีน *KCNA4* ในครอบครัว IQ2I.....	38
16	แสดงค่า lod score ของตำแหน่ง marker ใกล้ยีน *KCNA4* ในครอบครัว KEK....	38
17	แสดงค่า lod score ของตำแหน่ง marker ใกล้ยีน *KCNA4* ในครอบครัว BNG โดยไม่รวม BNG130, 131 132 133 134 135 และ 136	38
18	แสดงค่า lod score ของตำแหน่ง marker D11S1312, D11S1324 และ D11S411 ในครอบครัว BNG IQ2I และ KEK.....	39
19	แสดงค่า lod score ของยีน *KCNA5*	39
20	แสดงค่า lod score ของยีน *KCNA5* ในครอบครัว KEK	40

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดง α-subunit ของช่องโซเดียมและการกลายพันธุ์ที่บริเวณต่างๆ.....	10
2	แสดงถึงศักย์ไฟฟ้าทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจในระยะต่างๆ.....	11
3	แสดงการทำงานของประตูความต่างศักย์โซเดียม.....	12
4	แสดงการทำงานของประตูความต่างศักย์โปตัสเซียม.....	13
5	แสดงการเกิด ST-segment elevation.....	14
6	แสดงโครงสร้างของช่องโปตัสเซียมของกล้ามเนื้อหัวใจ.....	15
7	แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับระยะต่างของศักย์ไฟฟ้าทำงาน.....	15
8	แสดงโครงสร้างของยีน *KCND3*.....	15
9	แสดงพงศาวลีในครอบครัว A.....	18
10	แสดงพงศาวลีในครอบครัว B.....	19
11	แสดงพงศาวลีในครอบครัว C.....	20
12	แสดงผลการหาลำดับเบสของ LAP 24 ในบริเวณของ exon 1 ส่วนที่ 4.....	34
13	แสดงผลการหาลำดับเบสในคนปกติ บริเวณของ exon 1 ส่วนที่ 4.....	35
14	แสดงระยะที่ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ต่างๆ ของครอบครัว KEK.....	42
15	แสดงระยะที่ exclude linkageและไม่สามารถ exclude linkageในของตำแหน่ง marker ต่างๆของครอบครัว IQ2I	43
16	แสดงระยะที่ไม่สามารถ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ต่างๆ ในครอบครัว BNG.....	44
17	แสดงระยะที่ exclude linkage ของตำแหน่ง marker ในครอบครัว BNG IQ2I และ KEK.....	45

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

cM	=	centimorgan
ECG	=	echocardiogram
I_{to}	=	transient outward current
Kb	=	kilobase
M	=	molar
Mb	=	megabase
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mV	=	millivolte
μCi	=	microcurie
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
ng	=	nanogram
PCR	=	polymerase chain reaction
RBBB	=	right bundle branch block
SUDS	=	sudden unexplained death syndrome
U	=	unit
VF	=	ventricular fibrillation
VT	=	ventricular tachycardia