

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *SCN10A* ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ไทย ด้วยวิธี high resolution melting

Analysis of *SCN10A* Gene Mutation in Northeastern Thai Patients with Nephrolithiasis by High Resolution Melting Method

สิทธิเดช แสงนวล^{1,2}, นัญวรรณ รุ่งโรจน์^{2,3}, ชูชัย เนตรธวัชกุล², หนึ่งทัย สวัสดิ์², สุขชาย ศรีทิพย์วรรณ⁴,
ดวงพร เชื้อวัฒนา⁴ และ เพทชาย เย็นจิตโสมนัส²

Sittideth Sangnual^{1,2}, Nanyawan Rungroj^{2,3}, Choochai Nettuwakul², Nunghathai Sawasdee², Suchai Sritippayawan⁴, Duangporn Chuawattana⁴ and Pa-thai Yenchitsomanus²

¹หลักสูตรสาขาวิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน, ²หน่วยอนุเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย; ³หน่วยอนุพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย; ⁴สาขาวิชาวัณโรควิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

¹Graduate Program in Immunology, Department of Immunology; ²Division of Molecular Medicine, Department of Research and Development; ³Division of Molecular Genetics, Department of Research and Development; ⁴Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700

Corresponding author: pathai.yen@mahidol.ac.th; ptyench@gmail.com

บทคัดย่อ

ยีน *SCN10A* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน voltage-gated sodium channel 1.8 ($Na_v1.8$) ถูกเสนอว่าเป็นยีนที่อาจเป็นสาเหตุของโรคนิ่วไตของผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงนำเทคนิค polymerase chain reaction-high resolution melting (PCR-HRM) ซึ่งเป็นวิธีค้นหาความผันแปร (variation) ของยีนจากรูปแบบของ melting curve มาใช้เพื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *SCN10A* ในผู้ป่วยโรคนิ่วไตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวน 180 ราย ผลการศึกษาพบความผันแปรในยีน *SCN10A* จำนวน 28 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นความผันแปรชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนจำนวน 11 ตำแหน่ง ประกอบด้วยความผันแปรที่อยู่ในเอ็กซอน จำนวน 8 ตำแหน่ง (non-synonymous 6 ตำแหน่ง และ synonymous 2 ตำแหน่ง) และความผันแปรที่อยู่ในอินตรอน จำนวน 3 ตำแหน่ง ซึ่งความผันแปรที่ตรวจพบโดยวิธี PCR-HRM นี้ได้รับการตรวจยืนยันแล้วโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส การใช้โปรแกรม 5 โปรแกรม พยากรณ์ผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน และกระบวนการตัดต่อ mRNA ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า PCR-HRM เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และสามารถวิเคราะห์หลายตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน นำมาใช้วิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *SCN10A* ได้ประสบความสำเร็จ การกลายพันธุ์บางตำแหน่งที่ตรวจพบจากการศึกษานี้ อาจเป็นสาเหตุของโรคนิ่วไตของผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งควรมีการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว และการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน เพื่อพิสูจน์ยืนยันการเป็นสาเหตุของโรคต่อไป

ABSTRACT

SCN10A gene, encoding voltage-gated sodium channel 1.8 ($Na_v1.8$), has been suggested as a candidate gene for nephrolithiasis in Northeastern (NE) Thai patients. To analyze mutations of *SCN10A* gene, polymerase chain reaction-high resolution melting (PCR-HRM) analysis, a powerful method for detection of sequence variations by generating melting curve pattern, was performed in 180 NE patients with nephrolithiasis. A total of 28 variations with 11 novel variations of 8 exonic variations (6 non-synonymous and 2 synonymous) and 3 intronic variations were identified by PCR-HRM and were confirmed by DNA sequencing. All of novel variations have impact on structure and function of the $Na_v1.8$ protein and mRNA splicing process as predicted by 5 web-based programs. These results indicate PCR-HRM provides a simple, rapid, and cost-effective of medium-throughput method that is successfully used for scanning *SCN10A* gene mutations. Some of the identified mutations in this study may cause nephrolithiasis in NE Thai patients. In order to validate their potential pathogenic effects, therefore, segregation testing in the affected families and functional study should be further investigated.

คำสำคัญ: นิ่วไต, ยีน *SCN10A*, พีซีอาร์-เอชอาร์เอ็ม, การกลายพันธุ์

Keywords: nephrolithiasis, kidney stone disease, *SCN10A*, PCR-HRM, mutation

INTRODUCTION

Nephrolithiasis or kidney stone, a morbidity and occasional mortality clinical disorder, is a common worldwide public health problem. In Thailand, the highest prevalence was observed in the Northeastern (NE) area. The etiology of nephrolithiasis is generally multifactorial, both genetic and environmental factors play role in disease. To date, genetic contribution to nephrolithiasis has been recognized and a number of the causative genes have been reported but they are varying among populations. Our previous studies have suggested a genetic contribution to the risk of nephrolithiasis in NE Thai population and found that genetic variation in prothrombin (*F2*) gene is associated with nephrolithiasis in female patients (Sritippayawan *et al.*, 2009; Rungroj *et al.*, 2011; Rungroj *et al.*, 2012). Subsequently, genome-wide linkage analysis and exome sequencing were performed to investigate gene(s) involving in nephrolithiasis in multiple families. The results revealed that mutation of *SCN10A* gene, encoding the voltage-gated sodium channel 1.8 ($Na_v1.8$), is a possible cause of nephrolithiasis in one extended family (unpublished data). The *SCN10A* is a very large gene comprising 27 exons which code for a 1,956 amino acid of $Na_v1.8$ protein. The $Na_v1.8$ has a central role in pain signaling, thermal-induced inflammation and cold stimulation (Akopian *et al.*, 1996) and *SCN10A* gene mutations has been reported to be a cause of altered pain sensitivity and painful neuropathy (Faber *et al.*, 2012). However, it has not been reported to be involved in nephrolithiasis.

Since a mutation of *SCN10A* gene is initially observed as a cause of nephrolithiasis in only one family and complete validation of *SCN10A* gene has not been determined, it is possible that *SCN10A* mutation may be a cause of nephrolithiasis in other families. Therefore, in this study high resolution melting (HRM) analysis, a simple method that widely uses for detection of sequence variations by examining melting curves of amplicons (Zhou *et al.*, 2005; Nettuwakul *et al.*, 2010), was performed to investigate mutations of *SCN10A* gene in NE Thai patients with nephrolithiasis. Novel mutations identified in this study may a cause of disease leading to the better understanding in the pathogenesis of nephrolithiasis in the NE Thai patients.

MATERIALS AND METHODS

Genomic DNA of 180 patients with nephrolithiasis were examined for mutations of *SCN10A* by PCR-HRM. Thirty-six primers pairs were designed for amplifying the 36 fragments that cover 27 exons and intron-exon boundaries of *SCN10A*. PCR-HRM analysis was performed in a single run on a LightCycler 480 II machine (Roche Diagnostics, Germany) with addition of Resolight dye (Roche Diagnostics, Germany) in PCR reaction. The PCR condition included an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 20 sec, 57-61 °C for 20 sec (depends on each fragments), and 72 °C for 20 sec. Before the HRM step, the product was heated to 96 °C for 1 min and then cooled to 40 °C. Melting curves were obtained by increasing the temperature to 96 °C with 25 acquisitions of continuous florescence detection. The melting curves were normalized, temperature-shifted and converted to difference plots by Gene Scanning 1.5.0 (Roche Diagnostics, Germany). The detected variations were confirmed by DNA sequencing and were predicted for their possible impact on structure and function of protein and mRNA splicing process using web-based programs (Mutation Taster, VarioWatch, PolyPhen2, SIFT, and ESEfinder).

RESULTS AND DISCUSSION

PCR-HRM analysis of 36 fragments of the *SCN10A* gene showed that there were different melting curve patterns in the analysis of 23 fragments and a total of 28 variations were identified. The examples of melting curves, different plots, and nucleotide sequences of identified variations are shown in Figure 1. Seventeen variations are known SNPs that have not been reported to be involved in nephrolithiasis. Eleven variations are novel that can be classified into two groups based on their location in the gene, including eight exonic variations (six non-synonymous and two synonymous) and three intronic variations. All of these novel variations were predicted to have impact on structure and function of the Na_v1.8 protein and mRNA splicing process (data not shown).

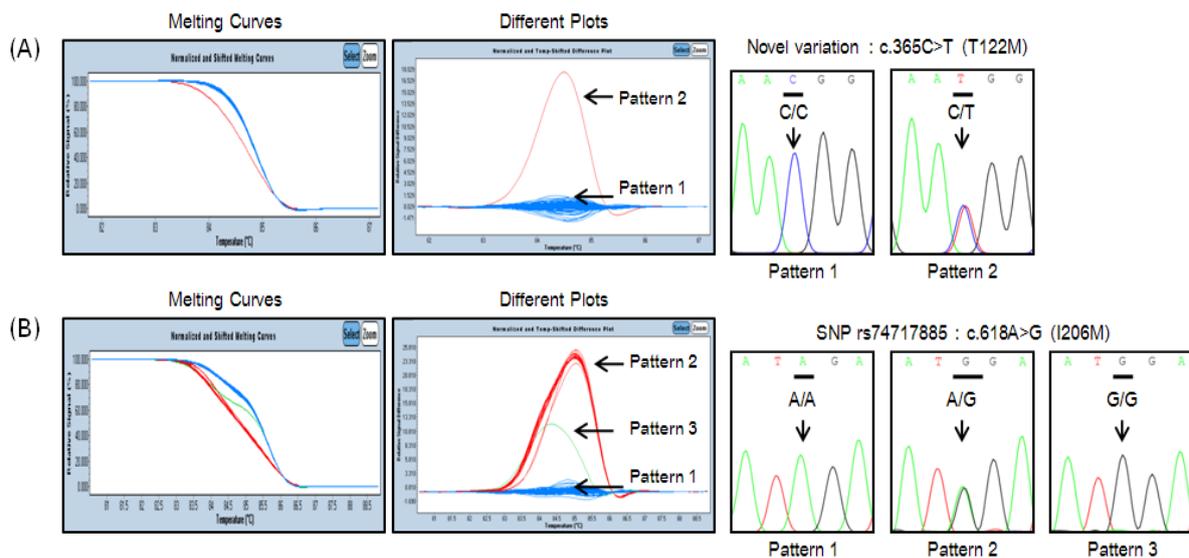


Figure 1 Melting curves, different plots, and nucleotide sequence analyses of *SCN10A* gene variations in (A) exon 2 and (B) exon 5

Our results demonstrated that HRM analysis was able to detect the variations of *SCN10A* gene in 23 PCR fragments from their melting curve patterns that had been confirmed by DNA sequencing. However, some studied PCR fragments were not shown any different melting curve pattern, suggesting there is no variation or the variation may not be detected by HRM method. Nevertheless, this technique is a useful screening method to detect gene mutation as it has been reported to have high sensitivity (95%) and specificity (99%) (Reed and Wittwer, 2004).

CONCLUSION

PCR-HRM is a simple, rapid, and cost-effective method that is efficiently used for scanning *SCN10A* gene mutations. Some of the mutations identified in this study may cause nephrolithiasis in NE Thai patients. However, segregation analysis within affected families and functional study should be further investigated in order to validate their potential pathogenic effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Mahidol University and Thailand Research Fund (TRF). NR and PY are supported by Chalermpkrakiat Grant, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. PY is a TRF-Senior Research Scholar.

REFERENCES

- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*. 1996;379(6562):257-62.
- Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Cheng X, Han C, Ahn HS, Persson AK, Hoeijmakers JG, Gerrits MM, Pierro T, Lombardi R, Kapetis D, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Gain-of-function Na_v1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(47):19444-9.
- Nettuwakul C, Sawasdee N, Yenchitsomanus PT. Rapid detection of solute carrier family 4, member 1 (*SLC4A1*) mutations and polymorphisms by high-resolution melting analysis. *Clin Biochem*. 2010;43(4-5):497-504.
- Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*. 2004;50(10):1748-54.
- Rungroj N, Sritippayawan S, Thongnoppakhun W, Paemanee A, Sawasdee N, Nettuwakul C, Sudtachat N, Ungsupravate D, Prahirunkit P, Chuawattana D, Akkarapatumwong V, Borvornpadungkitti S, Susaengrat W, Vasuvattakul S, Malasit P, Yenchitsomanus PT. Prothrombin haplotype associated with kidney stone disease in Northeastern Thai patients. *Urology*. 2011;77(1):249.e17-23.
- Rungroj N, Sudtachat N, Nettuwakul C, Sawasdee N, Praditsap O, Jungtrakoon P, Sritippayawan S, Chuawattana D, Borvornpadungkitti S, Predanon C, Susaengrat W, Yenchitsomanus PT. Association between human prothrombin variant (T165M) and kidney stone disease. *PLoS One*. 2012;7(9):e45533.
- Sritippayawan S, Borvornpadungkitti S, Paemanee A, Predanon C, Susaengrat W, Chuawattana D, Sawasdee N, Nakjang S, Nettuwakul C, Rungroj N, Vasuvattakul S, Malasit P, Yenchitsomanus PT. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urol Res*. 2009;37(3):141-6.
- Zhou L, Wang L, Palais R, Pryor R, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin Chem*. 2005;51(10):1770-7.