บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรค Primary hyperoxaluria type1 (PH1; OMIM 2599000) เป็นโรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนออโทโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน *AGXT* ซึ่งผลิตเอนไซม์ alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT; EC 2.6.1.44) ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท ให้เป็นไกลซีน ในเพอร์อกซิโซมของเซลล์ตับ (Danpure and Jennings, 1986) หากยีน *AGXT* มีความผิดปกติจะทำให้เอนไซม์ AGT ทำงานผิดปกติด้วย ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสลายไกลออกซิเลท เกิดการสะสมของไกลออกซิเลทขึ้น ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นออกซาเลทในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับ (Danpure and Rumsby, 2004) หลังจากนั้นออกซาเลทที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปที่ไตและสะสมในรูปผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไตและท่อทางเดินปัสสาวะ ส่งผลให้เกิดนิ่วในไต ต่อมาผู้ป่วยจะสูญเสียการทำงานของไตในที่สุด (Danpure and Jennings, 1986) ส่วนใหญ่โรค PH1 พบในเด็ก และผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย

ยีน *AGXT* แบ่งเป็น 2 แอลลีล คือ แอลลีลหลัก (major allele) และแอลลีลรอง (minor allele) โดยที่แอลลีลรองต่างจากแอลลีลหลัก 3 ตำแหน่ง คือ มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 ในเอ็กซอน 1 จาก cytosine เป็น thymine (c.32C>T) ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 11 เปลี่ยนจาก proline เป็น leucine (p.Pro11Leu) นอกจากนี้ยังมี c.1020A>G (p.Ile340Met) ในเอ็กซอน 10 และ 74 bp duplication ในอินทรอน 1 (Purdue, Takada and Danpure, 1990) อย่างไรก็ตามพอลิมอร์ฟิซึม แบบ p.Ile340Met และ 74 bp duplication ไม่มีผลต่อการแสดงออก ในขณะที่พอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Pro11Leu มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ AGT

เอนไซม์ AGT ประกอบด้วยการจับตัวกันของสายพอลิเพปไทด์ 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (homodimeric protein) แต่ละหน่วยมีกรดอะมิโน 392 ตัว และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (Takada *et al.*, 1990) แบ่งเป็น 3 โดเมน คือ โดเมนปลายด้านอะมิโน มีกรดอะมิโน 20 ตัว เป็นส่วนที่มีผลต่อการจับตัวกันของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) (Zhang *et al.*, 2003), โดเมนที่อยู่ตรงกลาง มีกรดอะมิโน 260 ตัว เป็นบริเวณ active site และบริเวณที่สัมผัสกันของ 2 หน่วยย่อย และท้ายสุดเป็นโดเมนปลายด้านคาร์บอกซี มีกรดอะมิโน 110 ตัว มี peroxisomal targeting sequence (PTS) อยู่ส่วนปลาย มีลำดับจำเพาะเป็นกรดอะมิโน 3 ตัว คือ (Lysine-Lysine-Leucine) เป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปยังเพอร์อกซิโซม (Motley *et al.*, 1995)

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ภายใต้การควบคุมของ ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ได้ตรวจพบผู้ป่วยชาวไทยรายหนึ่ง อายุ 10 ปี เริ่มมีผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไต อีกทั้งพี่สาวของผู้ป่วยรายนี้เสียชีวิตด้วยอาการนิ่วในไต ตอนอายุ 7 ปี จึงวินิจฉัยว่า ผู้ป่วยรายนี้มีแนวโน้มเป็นโรค PH1 จากนั้นได้ตรวจสอบหาสาเหตุความผิดปกติในยีน *AGXT* พบว่า นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 มีการเปลี่ยนจาก cytosine เป็น guanine (c.32C>G) ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 11 เปลี่ยนจาก proline (Pro) เป็น argenine (Arg) (p.Pro11Arg) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (novel mutation) และเกิดขึ้นในตำแหน่งสำคัญที่บ่งชี้ว่ายีนนี้เป็นแบบแอลลีลหลักหรือแอลลีลรอง

การศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบการทำงานของยีน *AGXT* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งส่งผลต่อความผิดปกติในส่วนโดเมนปลายด้านอะมิโนที่มีส่วนสำคัญต่อการจับกันของ 2 หน่วยย่อย และเป็นการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่มีผลต่อ MTS โดยตรง ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจทำให้เอนไซม์ AGT มีการทำงานลดลง หรือถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือเปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมายจากเพอร์อกซิโซม เป็นไมโทคอนเดรียมากขึ้น

แม้ว่าโรคนี้จะไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่ถ้าได้รับการวินิจฉัยและดูแลรักษาอย่างถูกวิธี ก็จะทำให้ผู้ป่วยสามารถใช้ชีวิตได้ตามปกติและมีชีวิตยาวนานขึ้น ดังนั้นการวิเคราะห์การทำงานของการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในยีน *AGXT* ชนิด p.Pro11Arg ของผู้ป่วยรายนี้จะทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ AGT ซึ่งผลิตจากยีน *AGXT* ที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง Pro11Arg จะทำให้ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการกลายพันธุ์ชนิดนี้ในโรค PH1 ของครอบครัวนี้ รวมทั้งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการทำงานของยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ ทำให้แพทย์สามารถนำไปประยุกต์ในการให้การวินิจฉัย ดูแลรักษา และให้คำปรึกษาแก่ผู้ป่วยและครอบครัวได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน *AGXT* แบบ p.Pro11Arg ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1

ขอบเขตของการวิจัย

สังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg แล้ว transfect เข้าสู่เซลล์ Hep-G2 เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์ AGT หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติ แบ่งเป็นตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT โดยวิธี western blot ตรวจสอบความสามารถ

ในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric (Rumsby, Weir and Samuell, 1997) และตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์ โดยวิธี immunofluorescence (Masyuk *et al.*, 2003)

ข้อจำกัดในการวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ซึ่งพบในผู้ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่และเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานเฉพาะในเซลล์ตับเท่านั้น จึงไม่สามารถนำเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมาสกัดเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ได้ ผู้วิจัยจึงต้องทำการสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์ลักษณะนี้ p.Pro11Arg ในห้องปฏิบัติการ โดยการทำ mutagenesis จากต้นแบบซึ่งเป็น cDNA ของยีน *AGXT* ปกติที่ได้มาจาก Human hepatocellular liver carcinoma cell lines (Hep-G2 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ตับของมนุษย์

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Primary hyperoxaluria type1 หรือ PH1 คือ โรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนออโทโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน *AGXT* ส่งผลให้เกิดนิ่วในไต ส่วนใหญ่โรคนี้พบในเด็ก และผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย
- *AGXT* คือ ยีนซึ่งผลิตเอนไซม์ AGT
- Alanine:glyoxylate aminotransferase หรือ AGT คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท ให้เป็นไกลซีน ในเพอร์อกซิโซม
- c.32C>G คือ การเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) โดยนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 มีการเปลี่ยนชนิดของเบสจาก cytosine (C) เป็น guanine (G)
- p.Pro11Arg คือ การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน โดยภายในสายพอลีเพปไทด์มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 11 จาก proline (Pro) เป็น argenine (Arg)
- Novel mutation คือ การกลายพันธุ์ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนในวงวิชาการ
- Semiautomated spectrophotometric คือ วิธีวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ซึ่งเปลี่ยนไกลออกซิเลท เป็นไพรูเวท โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทั้งก่อนใส่และหลังใส่เอนไซม์ LDH ของ NADH ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ LDH ซึ่งเปลี่ยนไพรูเวท เป็นแลคเตท เมื่อเอนไซม์ LDH ทำงาน NADH จะถูกเปลี่ยนเป็น NAD^+ ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่ลดลง ดังนั้นถ้าเอนไซม์ AGT ทำงานได้มากจะเกิดไพรูเวทมากตามไปด้วย ส่งผลให้เอนไซม์ LDH ทำงานมาก

และ NADH มีปริมาณลดลง จึงทำให้ค่าก่อนใส่และหลังใส่แตกต่างกันมาก ส่วนถ้าค่าก่อนใส่และหลังใส่แตกต่างน้อย แสดงว่าเอนไซม์ AGT ทำงานได้น้อย

- Immunofluorescence คือ วิธีการตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายของเอนไซม์ภายเซลล์ โดยใช้ secondary antibody ที่ติดสารเรืองแสง ไปจับกับ primary antibody ซึ่งจับอยู่กับเอนไซม์เป้าหมาย .แล้วตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์เป้าหมายภายในเซลล์จากการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Macro Confocal

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติ ซึ่งผลิตจากยีน *AGXT* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg
2. สามารถนำผลการวิจัยไปร่วมใช้ในการวินิจฉัยโรค ดูแลรักษา และให้คำปรึกษาแก่ผู้ป่วยและครอบครัวได้

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้ แบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1.การสังเคราะห์ยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพื่อผลิตเอนไซม์ AGT

1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ Hep-G2, EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (EBV cells) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และ African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells (COS 7 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ไตของลิงชนิดหนึ่งที่พบในหรีปแอฟริกา

1.2 สกัด RNA จากเซลล์ Hep-G2 เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *AGXT* ปกติและทำ reverse transcription

1.3 เพิ่มปริมาณยีน *AGXT* ปกติในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) โดยใช้ cDNA จากเซลล์แต่ละชนิดเป็นต้นแบบ

1.4 ทำ transformation

1.5 ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ต้องการ (site-directed mutagenesis) เพื่อสร้างยีน *AGXT* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg)

1.6 ตัดต่อยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เข้ากับ expression vector (pcDNA3.1/*V*5-*His*B)

1.7 ทำ lipotransfection เข้าสู่เซลล์ Hep-G2 แล้วเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 แบบ โดยผลิตทั้งเอนไซม์ AGT ปกติและเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg

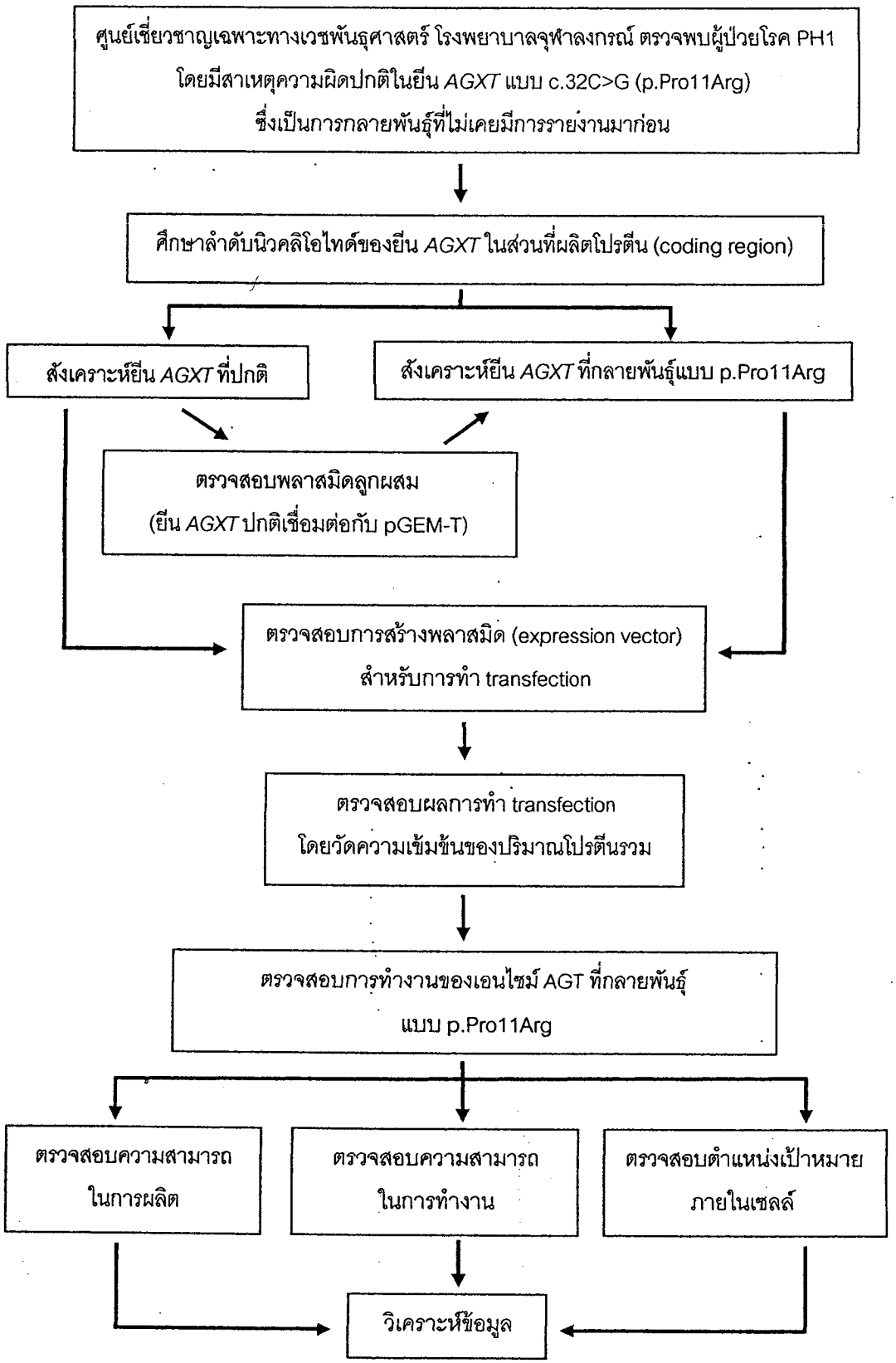
2. การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติ

2.1 ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT โดยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่าเป็นกลุ่มควบคุม

2.2 ตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric

2.3 ตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ภายในเซลล์ โดยวิธี immunofluorescence

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย



ภาพที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการวิจัย