บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ได้ในระดับปกติและไม่ถูกสลาย เนื่องจากแถบที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับยีนแบบปกติ แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ลดลงประมาณ 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรค PH1 ของผู้ป่วยรายนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยมีความผิดปกติแบบดีลีชันในระดับโครโมโซม ซึ่งทำให้มีการหลุดหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 2 ส่วนปลายซึ่งเป็นบริเวณที่มียีน *AGXT* รวมอยู่ด้วย ประกอบกับเกิดมิวเทชันในยีน *AGXT* แบบ p.Pro11Arg บนโครโมโซมอีกแท่งหนึ่ง ทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT เหลือเพียง 15% เท่านั้น จึงเกิดการสะสมของผลึกแคลเซียมออกซาเลทปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดนิ่วในไตและเป็นโรค PH1 ส่วนตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ประมาณ 20% นั้นถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่นที่ผิดตำแหน่งแทนที่จะเป็นเพอร์อกซิโซมตามปกติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมหรือถูกส่งไปผิดตำแหน่งที่ไมโทคอนเดรียแทน ดังนั้นผู้ป่วยรายนี้ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์ในยีน *AGXT* แบบ c.32C>G ส่งให้ในระดับโปรตีนเกิดการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนแบบ p.Pro11Arg มีสาเหตุหลักของการเกิดโรค PH1 จากความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสลายไกลออกซิเลทเหลือเพียง 15% เท่านั้น ประกอบกับเอนไซม์ประมาณ 20% ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเนื่องจากถูกส่งไปผิดตำแหน่ง

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยได้สรุปยืนยันแน่ชัดว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ไม่ได้ถูกย่อยสลาย และมีปริมาณปกติ เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธี western blot ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าปรากฏแถบของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์และมีปริมาณความเข้มของแถบใกล้เคียงกับแถบของเอนไซม์ AGT ปกติ แสดงว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine ไม่มีผลต่อการจับกันของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) ทำให้ 2 หน่วยย่อยของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์สามารถจับกันได้ตามปกติ จึงไม่ถูกย่อยสลาย เพราะส่วนใหญ่การย่อยสลายเกิดจากการที่หน่วยย่อยแต่ละหน่วยไม่สามารถจับกันได้ ทำให้เกิดความไม่เสถียรและนำไปสู่การรวมตัวเป็นกลุ่มก้อน จึงถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Danpure *et al.*, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับ dimerization ของเอนไซม์ AGT ที่มีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกันแต่เปลี่ยนเป็น Leucine ซึ่งพบในแอลลีลรอง (Lumb, et al., 1999) พบว่า การเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนดังกล่าวไม่มีผลต่อ dimerization ของเอนไซม์ หน่วยย่อยของเอนไซม์ยังสามารถจับกันได้ตามปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ AGT ปกติที่พบในแอลลีลหลัก

สำหรับความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ซึ่งลดลงประมาณ 69% จากการตรวจสอบด้วยวิธี semiautomated spectrophotometric นั้นน่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนจาก Proline ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติ คือ ไม่มีขั้ว ไม่ชอบน้ำ เปลี่ยนเป็น Arginine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติตรงกันข้าม คือ มีขั้ว และมีประจุรวมเป็นบวก ส่งผลให้การจัดเรียงตัวของโปรตีน (conformation) เกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้สารตั้งต้นที่จะเข้าจับกับเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์เกิดได้ยากขึ้น เนื่องจากความไม่เหมาะสมกันระหว่างรูปร่างของเอนไซม์ AGT ที่เปลี่ยนไปกับสารตั้งต้น แต่ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายไกลออกซิเลทได้เลย ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่ยืนยันว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์นี้ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ แต่เหลือเพียง 31% เมื่อเทียบกันเอนไซม์ AGT ปกติในเวลาที่เท่ากัน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีความสามารถในการทำงานลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกันที่พบในแอลลีลรองจาก Proline เป็น Leucine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันคุณสมบัติเดียวกัน แต่มีผลทำให้ลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ได้ โดยทำให้กระบวนการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในการสลายไกลออกซาเลทเกิดได้น้อยลง (Lumb and Danpure, 2000)

ส่วนการตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ด้วยวิธี immuunofluorescence นั้น พบว่า เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ประมาณ 20% ไม่ได้ถูกส่งไปยังเพอร์อกซิโซม

ตามปกติ แต่ส่งไปผิดตำแหน่ง เนื่องจากการวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS2 พบว่าสีแดงซึ่งย้อมติดเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ไม่ซ้อนทับกับสีเขียวซึ่งย้อมติดเอนไซม์ catalase ที่พบเฉพาะในเพอร์อกซิโซม โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 จุด จากจุดที่สุ่มตรวจสอบทั้งหมด 20 จุดในแต่ละภาพ รวมทั้งหมด 5 ภาพ สำหรับออร์แกเนลล์ที่ส่งไปผิดตำแหน่งเป้าหมายนั้น คาดว่าน่าจะเป็นไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีรายงานการศึกษาผลของเอนไซม์ AGT ที่มีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับการกลายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้ โดยเปลี่ยนจาก Proline เป็น Leucine สามารถพบได้ในแอลลีลรอง (Purdue *et al.*, 1990) พบว่า เอนไซม์ AGT ประมาณ 5% จะถูกส่งไปผิดตำแหน่งโดยถูกส่งไปยังไมโทคอนเดรียแทนที่จะเป็นเพอร์อกซิโซมตามปกติ ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 เป็น Leucine นั้นทำให้เกิด mitochondrial targeting sequence (MTS) อย่างอ่อนขึ้น ซึ่งเป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปสู่ไมโทคอนเดรีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่า MTS จะมีการจัดรูปร่างตรงส่วนบริเวณด้านปลายหมู่อะมิโนให้อยู่ในรูปเกลียวแบบแอลฟา ซึ่งมีประจุรวมเป็นบวก (Heijne, 1986) โดย MTS สามารถจับกับตัวรับ (import receptor) TOM20 ที่ฝังตัวอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ทำให้เอนไซม์ AGT ที่มีสัญญาณ MTS อยู่จะถูกส่งเข้าไปในไมโทคอนเดรียได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ AGT ปกติที่ผลิตจากแอลลีลหลักจะมีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 10 และ 11 เป็น Proline ทั้งคู่ ซึ่งถือว่าการมี Proline อยู่ชิดติดกัน 2 ตัวเป็นตัวขัดขวางการจัดรูปร่างเป็นเกลียวแบบแอลฟา ทำให้สัญญาณ MTS จึงไม่เกิดขึ้น (Lumb *et al.*, 1999) ดังนั้นการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในงานวิจัยนี้ จึงส่งผลทำลายตัวขัดขวางการเกิดสัญญาณ MTS ดังกล่าว ทำให้สัญญาณ MTS จึงสามารถเกิดขึ้นได้ อีกทั้ง Arginine เป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันซึ่งมีคุณสมบัติคือ มีขั้ว และมีประจุรวมเป็นประจุบวก ยิ่งส่งผลให้เกิดสัญญาณ MTS ที่แรงขึ้นกว่าการเปลี่ยนเป็น Leucine เนื่องจาก Leucine เป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว จึงเป็นเพียงการทำลายตัวขัดขวางการเกิดสัญญาณ MTS เท่านั้น ทำให้การกลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg มีการส่งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ไปผิดตำแหน่งมากถึง 20% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT แบบ p.Pro11Leu ที่ได้จากแอลลีลรองซึ่งเกิดการส่งผิดตำแหน่งเป้าหมายเพียง 5% อย่างไรก็ตามเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg ส่วนใหญ่ประมาณ 80% ยังคงถูกส่งไปยังเพอร์อกซิโซมตามปกติ ทั้งนี้เป็นเพราะทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซียังมี peroxisomal targeting sequence (PTS) อยู่ตรงส่วนปลาย ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนจำเพาะ 3 ตัว คือ KKL (Lysine-Lysine-Leucine) เป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปยังเพอร์อกซิโซม ส่วนที่คาดการณ์ว่าอาจติดอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมนั้น เป็นเพราะภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ตำแหน่งเป้าหมายของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์

ของเซลล์ที่ 2 ในภาพที่ 26 ของบทที่ 4 พบว่า มีจุดสีแดงกระจายเป็นกลุ่มอยู่ติดกับนิวเคลียสและไม่มีสีเขียว (ตำแหน่งของเพอร็อกซิโซม) ซ้อนทับ จึงคาดว่าบริเวณนั้นน่าจะเป็นเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม โดยปกติพอลิเพปไทด์ที่ผลิตขึ้นในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแล้วมีการม้วนตัวผิดปกติ จะติดค้างอยู่ภายในออร์แกเนลล์ไม่สามารถส่งต่อไปยังตำแหน่งเป้าหมายได้ตามปกติ จึงต้องมีกระบวนการ surveillance system ซึ่งมี chaperone เข้ามาตรวจสอบและกำจัดพอลิเพปไทด์เหล่านั้นให้หมดไป โดยส่งไปย่อยสลายในไลโซโซม

งานวิจัยนี้นับว่ามีประโยชน์ต่อผู้ป่วยรายนี้ ซึ่งทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค PH1 ว่าเกิดจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ลดลงเป็นอย่างมาก ทำให้แพทย์สามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการรักษารวมทั้งเข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดโรคมากขึ้น เพื่อจัดยาหรือวิตามินที่จะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ AGT ให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ครอบครัวของผู้ป่วยเองยังสามารถใช้ประโยชน์จากงานวิจัยนี้ในการวางแผนสำหรับการมีบุตรคนต่อไป ควรมีการวินิจฉัยทารกในครรภ์ เพื่อตรวจสอบว่ามีความผิดปกติในยีน *AGXT* หรือไม่ รวมทั้งตรวจสอบในระดับโครโมโซมว่าเกิดการขาดหายไปในโครโมโซมคู่ที่ 2 หรือไม่ เพื่อป้องกันไม่ให้บุตรคนต่อไปเป็นโรค PH1 เช่นเดียวกับพี่สาวทั้งสองคน สำหรับในแวดวงวิชาการนับว่าเป็นการเพิ่มเติมองค์ความรู้เกี่ยวกับโรค PH1 ให้มากขึ้น ทำให้ทราบบทบาทและการทำงานที่ผิดปกติไปของยีน *AGXT* ซึ่งเกิดจากเปลี่ยนชนิดของเบสเพียงตำแหน่งเดียวในลำดับที่ 32 จากไซโทซีน เป็นกวานีน ส่งผลให้ในระดับโปรตีนมีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่พบในแอลลีลรอง แต่เปลี่ยนเป็น Leucine แทน พบว่าแม้จะเป็นตำแหน่งเดียวกัน แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนคนละชนิดกัน กลับส่งผลให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ AGT ผิดปกติไปแตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

การทำ transfection ซึ่งเป็นการถ่ายพลาสมิดเข้าไปภายในเซลล์ COS7 เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกโดยผลิตเอนไซม์ AGT สำหรับนำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunofluorescence นั้น สามารถปรับลดปริมาณพลาสมิดให้น้อยลงได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้สีแดงที่ได้จากการย้อมติดเอนไซม์ AGT ไม่ติดเข้มจนเกินไป เนื่องจากยีนมีการแสดงออกแบบ over expression อยู่แล้ว แต่อย่างไรก็ตามปริมาณพลาสมิดที่ถ่ายเข้าไปภายในเซลล์ COS7 ทั้งยีนปกติและยีนที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg ต้องมีปริมาณเท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นได้ว่ามาจากความบกพร่องของยีนที่กลายพันธุ์จริง ไม่ได้เป็นผลจากปริมาณการแสดงออกของยีนที่ไม่เท่ากันตั้งแต่เริ่มต้น

ควรศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ที่กลายพันธุ์แบบ p.Pro11Arg เพิ่มเติมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เหมือนกับงานวิจัยของ Zhang *et al.*, 2003 สำหรับตรวจสอบผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการจำลองสถานการณ์โดยเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 11 จาก Proline เป็น Arginine เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับการอธิบายความสามารถในการทำงานที่ลดลง รวมทั้งสัญญาณการส่งเอนไซม์ในปลายด้านอะมิโนที่เปลี่ยนไป จึงทำให้ถูกส่งไปผิดตำแหน่ง

ในการทำ immunofluorescence นั้นควรใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมเพิ่มเติม เพื่อตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ซึ่งถูกส่งไปผิดตำแหน่งแทนที่จะเป็นเพอร์อกซิโซมให้แน่ชัดยิ่งขึ้น

การตรวจสอบภาพที่ได้จากการทำ immunofluorescence สามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์สีที่ได้จากการย้อมว่ามีการทับซ้อนกันมากน้อยเพียงใด เพื่อให้การวิเคราะห์ผลมีความสะดวก รวดเร็วยิ่งขึ้น แต่การใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์นี้มีต้นทุนค่าใช้จ่ายทางด้านลิขสิทธิ์โปรแกรมค่อนข้างสูง