การวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน *AGXT* แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1

Functional Analysis of a Novel *AGXT* Mutation, c.32C>G (p.Pro11Arg), in a Thai Family with PH1

เนลวัฒก์ กิ่งสุวรรณพงษ์ (Nelawat Kingsuwannapong)* นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักด์ (Vorasuk Shotelersuk)**
ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ (Rachaneekorn Tammachote)***

บทคัดย่อ

โรค Primary hyperoxaluria type1 (PH1) เป็นโรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนออโทโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน *AGXT* ซึ่งผลิตเอนไซม์ alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT) ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท โดยพบมากในเพอร์อกซิโซมของเซลล์ตับ โรค PH1 เกิดจากการหลั่งออกซาเลทและสะสมในรูปผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไต ต่อมาผู้ป่วยจะสูญเสียการทำงานของไตและเสียชีวิตในที่สุด ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้ตรวจพบผู้ป่วยชาวไทยรายหนึ่งเป็นโรค PH1 ซึ่งมีสาเหตุความผิดปกติแบบดีลีชัน และมีมิวเทชันในยีน *AGXT* โดยพบว่า นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 32 มีการเปลี่ยนจาก cytosine เป็น guanine (c.32C>G) ส่งผลให้กรดอะมิโนลำดับที่ 11 เปลี่ยนจาก proline เป็น argenine (p.Pro11Arg) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ในการวิจัยนี้ได้วิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน *AGXT* แบบ Pro11Arg โดยเพิ่มปริมาณยีน *AGXT* ในส่วนที่ผลิตโปรตีนนี้จากเซลล์ HepG-2 และ transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 โดยผลจากการทำ western blot แสดงให้เห็นว่า ยีนกลายพันธุ์สามารถผลิตโปรตีนได้ตามปกติ สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric บ่งชี้ว่า เอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีนกลายพันธุ์มีความสามารถในการทำงานลดลงประมาณ 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ผลิตจากยีนปกติ ส่วนการตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ โดยวิธี immunofluorescence นั้น ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด

ABSTRACT

Primary hyperoxaluria type1 (PH1) is a lethal autosomal recessive disorder of glyoxylate metabolism caused by deficiency of the liver-specific peroxisomal enzyme alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT). PH1 is presented by excretion of oxalate and accumulation of insoluble calcium oxalate in the kidney and eventually leads to renal failure and death. The Center of Excellence for Medical Genetic, Chulalongkorn University identified a Thai patient with PH1 caused by a deletion and a missense mutation in the *AGXT* gene, c.32C>G (p.Pro11Arg),

*มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
**ศาสตราจารย์ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
***อาจารย์ สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

which is a novel mutation. In this study, we analyze the effects of this novel *AGXT* mutation. We have cloned the entire coding region of *AGXT* from Hep-G2 cells and transfected into COS7 cells. Western blot analysis of AGT results indicated that the Pro11Arg mutation did not affect the level of protein expression. The AGT catalytic activity, measured by semiautomated spectrophotometric assay, indicates that the mutant AGT activity decreased about 69%, compared to that of the wild type. Immunofluorescence microscope to analyze the sub-cellular localization of the mutant AGT is inconclusive.

คำสำคัญ : มิวเทชันใหม่ ยีน *AGXT* โรค PH1

Key Words : novel mutation, *AGXT*, PH1

บทนำ

โรค Primary hyperoxaluria type1 (PH1; MIM 259900) เป็นโรคทางพันธุกรรมถูกควบคุมด้วยยีนด้อยบนออโทโซม โดยเกิดจากความผิดปกติของยีน *AGXT* ซึ่งผลิตเอนไซม์ alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT; EC 2.6.1.44) ทำหน้าที่สลายไกลออกซิเลท ให้เป็นไกลซีน ในเพอร็อกซิโซม (Danpure and Jennings, 1986) หากยีน *AGXT* มีความผิดปกติจะทำให้เอนไซม์ AGT ทำงานผิดปกติด้วย ส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสลายไกลออกซิเลท เกิดการสะสมของไกลออกซิเลท ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นออกซาเลท (Danpure and Rumsby, 2004) แล้วเกิดการสะสมในรูปผลึกของแคลเซียมออกซาเลทในไตและท่อทางเดินปัสสาวะ ส่งผลให้เกิดนิ่วในไต ต่อมาผู้ป่วยจะสูญเสียการทำงานของไตในที่สุด ส่วนใหญ่โรค PH1 พบในเด็กและผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรคจะเสียชีวิตตั้งแต่อายุยังน้อย

ยีน *AGXT* ประกอบด้วย 11 เอ็กซอน มีขนาด 10 กิโลเบส อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 ตำแหน่ง 2q37.3 (Purdue *et al*., 1991) ยีน *AGXT* แบ่งเป็น 2 อัลลีล คือ อัลลีลหลัก (major allele) และอัลลีลรอง (minor allele) โดยที่อัลลีลรองต่างจากอัลลีลหลัก 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) อย่างไรก็ตาม พอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Ile340Met และ 74 bp duplication ไม่มีผลต่อการแสดงออก ในขณะที่พอลิมอร์ฟิซึมแบบ p.Pro11Leu มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ AGT ดังนี้ (Lumb and Danpure, 2000)

1.ลดความเสถียรของเอนไซม์ AGT ทำให้การจับตัวกันของ 2 หน่วยย่อยลดลง

2.ลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

3.ทำให้เอนไซม์ AGT ประมาณ 5% เปลี่ยนตำแหน่งจากเพอร็อกซิโซม เปลี่ยนเป็นไมโทคอนเดรีย

เอนไซม์ AGT ประกอบด้วยการจับตัวกันของสายโพลีเปปไทด์ 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (homodimeric protein) แต่ละหน่วยมีกรดอะมิโน 392 ตัว และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (Takada *et al*., 1990) แบ่งเป็น 3 โดเมนคือ

1.โดเมนปลายด้านอะมิโน มีกรดอะมิโน 20 ตัว เป็นส่วนที่มีผลต่อการจับตัวกันของ 2 หน่วยย่อย (dimerization) โดยที่การจับตัวกันนี้มีความสำคัญมากต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

(Zhang *et al*., 2003) หากโดเมนส่วนนี้มีความผิดปกติก็จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผิดปกติ

2.โดเมนที่อยู่ตรงกลาง มีกรดอะมิโน 260 ตัว เป็นบริเวณ active site และบริเวณที่สัมผัสกันของ 2 หน่วยย่อย

3.โดเมนปลายด้านคาร์บอกซี มีกรดอะมิโน 110 ตัว มี peroxisomal targeting sequence (PTS) อยู่ส่วนปลาย มีลำดับจำเพาะเป็นกรดอะมิโน 3 ตัว คือ KKL (Lysine-Lysine-Leucine) เป็นสัญญาณสำคัญที่นำเอนไซม์ AGT ไปยังเพอร็อกซิโซม (Motley *et al*., 1995)

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

โดยการศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบการทำงานของยีน *AGXT* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ Pro11Arg ซึ่งส่งผลต่อความผิดปกติในส่วนโดเมนปลายด้านอะมิโน โดยอาจทำให้เอนไซม์ AGT มีการทำงานลดลงหรือถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทำให้โปรตีนมีความเสถียรลดลง หรือเปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมายจากเพอร็อกซิโซม เป็นไมโทคอนเดรีย

การวิเคราะห์การทำงานของการกลายพันธุ์ที่พบใหม่นี้ จะทำให้ทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่ผิดปกติ ซึ่งผลิตจากยีน *AGXT* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) และทำให้ทราบสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค PH1 ในครอบครัวนี้ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการทำงานของยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์การทำงานของมิวเทชันใหม่ในยีน *AGXT* แบบ c.32C>G (p.Pro11Arg) ในครอบครัวชาวไทยที่เป็นโรค PH1

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การสร้างยีน *AGXT* แบบปกติ และยีน *AGXT* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ Pro11Arg

สกัด RNA จากเซลล์ HepG-2 (เซลล์จากตับมนุษย์) โดยใช้ QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) และทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *AGXT-Bam*HI-F และ *AGXT-Eco*RI-R (ตารางที่ 1) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *AGXT* แบบปกติในส่วนที่ผลิตโปรตีน (coding region) ซึ่งมีขนาด 1,231 bp แล้วนำยีน *AGXT* ที่ปกติ (PCR product) มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector (Promega) จากนั้นทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ต้องการ (site-directed mutagenesis) โดยใช้ไพรเมอร์ *AGXT*-P11R-F และ *AGXT*-P11R-R (ตารางที่ 1) เพื่อสร้างยีน *AGXT* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ Pro11Arg โดยใช้ QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

การผลิตเอนไซม์ AGT

นำยีน *AGXT* ที่ปกติ และยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบPro11Arg ตัดต่อเข้ากับ expression vector; pcDNA3.1/V5-*His*B (Invitrogen) จากนั้นนำพลาสมิดทั้ง 2 ชนิด transfect เข้าสู่เซลล์ COS7 โดยใช้ Lipofectamine 2000 Transfection Kit (Invitrogen) เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน โดยผลิตเอนไซม์ AGT

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ และ PCR conditions สำหรับ RT-PCR และ Mutagenesis

ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' to 3')	อุณหภูมิในขั้น Annealing (^{0}C)
*AGXT-Bam*HI-F	CCAGGATCCCGAGCGGCAGGTT	60
*AGXT-Eco*RI-R	CTGAATTCCAGTGGGCAGGTCTCAGCTT	
AGXT-P11R-F	GCTGCTGGTGACCCCCCGCAAGGCCCTGCTCAAGC	55
AGXT-P11R-R	GCTTGAGCAGGGCCTTGCGGGGGGTCACCAGCAGC	

การเตรียมเอนไซม์ AGT สำหรับวิเคราะห์การทำงาน

หลังจาก transfect 48 ชั่วโมง เก็บเซลล์ใน RIPA buffer + 1x Protease Inhibitor (PI) สำหรับวิเคราะห์โดยวิธี western blot ส่วนการวิเคราะห์เพื่อวัดความสามารถในการทำงาน เก็บเซลล์ใน AGT buffer (100 µM Pyridoxal phosphate, 240 mM Sucrose และ 100 mM Potassium phosphate buffer; pH 8.0) จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตก (sonication) โดยแช่ในน้ำแข็ง ด้วยเครื่อง Ultrasonic processors รุ่น UP100H (Dr.Hielscher GmbH) 3 รอบๆละ 10 วินาที โดยพักระหว่างรอบ 1 นาที สุดท้ายวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด ด้วยวิธี BCA Protein โดยใช้ BCA Protein Assay Kit (Pierce)

การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AGT

การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ โดยวิธี western blot เทียบกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่าเป็นคอนโทรล ซึ่งใช้ Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell and Mini-PROTEAN3 Cell (Bio-Rad) สำหรับการทำ SDS-PAGE ใช้ 12% polyacrylamide gel, 120 โวลต์, 3 ชั่วโมง 15 นาที และใช้โปรตีนรวมที่ได้จากการ sonicate 2.5 µg จากนั้น transfer โปรตีนจากเจลสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ 100 โวลต์, 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4^{0}C สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์ AGT ใช้แอนติบอดี คือ mouse anti-V5 monoclonal antibody (Invitrogen) = 1:5,000 และ goat anti-mouse IgG2a (Abcam) = 1:5,000

การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT โดยวิธี semiautomated spectrophotometric (Rumsby, Weir and Samuell, 1997) สารเคมีที่ใช้ในงานส่วนนี้ทั้งหมดซื้อจากบริษัท Sigma Chemical วิธีนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก (การทำงานของเอนไซม์ AGT) โดยเติมสารตั้งต้นต่างๆ (150 mM L-alanine, 10 mM Sodium glyoxylate, 150 µM Pyridoxal phosphate, 100 mM Potassium phosphate buffer pH 8.0 และโปรตีนรวมที่ได้จากการ sonicate 100 µg สุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 300 µl) บ่มที่ 37^{0}C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อเอนไซม์AGT ทำงาน จะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นไพรูเวท ส่วนขั้นที่ 2 (การตรวจวัดปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้น) โดยใช้เอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) และNADH เป็น cofactor เปลี่ยนไพรูเวท เป็นแลคเตท และ NADH เป็น NAD^+ ซึ่ง NADH เท่านั้นที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ดังนั้นจึงต้องวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังใส่เอนไซม์ LDH ประมาณ 5 นาที (A2) ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น CE9500 (Super aquarius) โดยถ้ามีปริมาณไพรูเวทมาก ค่า A2 จะลดต่ำลงมากเมื่อเทียบกับค่า A1

การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT โดยวิธี immunofluorescence (Masyuk *et al*., 2003) เป็นการใช้แอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสง (secondary antibody) ไปจับกับแอนติบอดีที่จับกับ V5 ซึ่งเชื่อมติดกับเอนไซม์ AGT ที่ได้จากการโคลน และเอนไซม์เฉพาะในเพอร็อกซิโซม; catalase (primary antibody) แล้วตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์ภายในเซลล์จากการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal โดยใช้แอนติบอดี ดังนี้ mouse anti-V5 monoclonal (Invitrogen) = 1:500, Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG2a (Invitrogen) = 1:1,000, Rabbit anti-catalase polyclonal (Abcam) = 1:250 และ Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) = 1:250

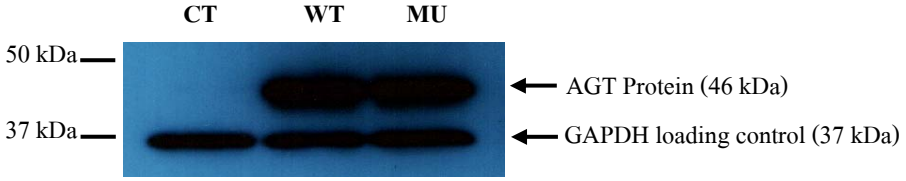
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT

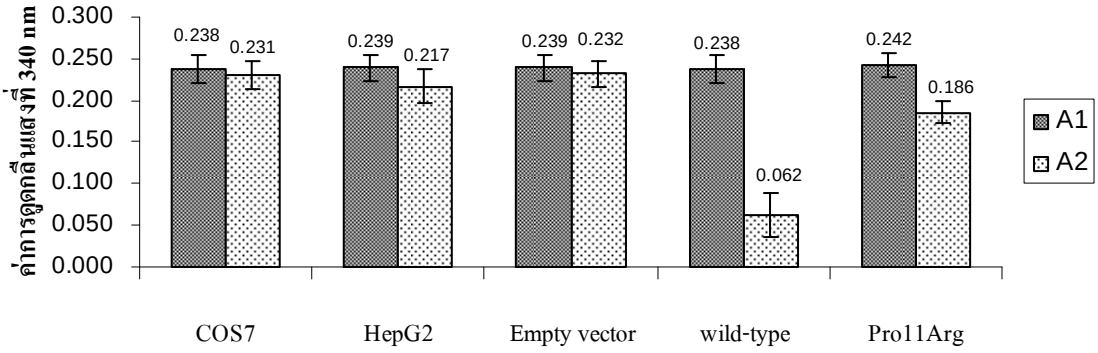
ผลจากการทำ western blot แสดงให้เห็นว่า ยีน *AGXT* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ P11R (Pro11Arg *AGXT*) ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ซึ่งมีขนาด 46 kDa ได้ตามปกติ เมื่อเทียบกับยีน *AGXT* แบบปกติ (wild type *AGXT*) (ภาพที่ 1) ส่วนเซลล์ COS7 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า (empty vector) ไม่มีการผลิตเอนไซม์ AGT

การตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

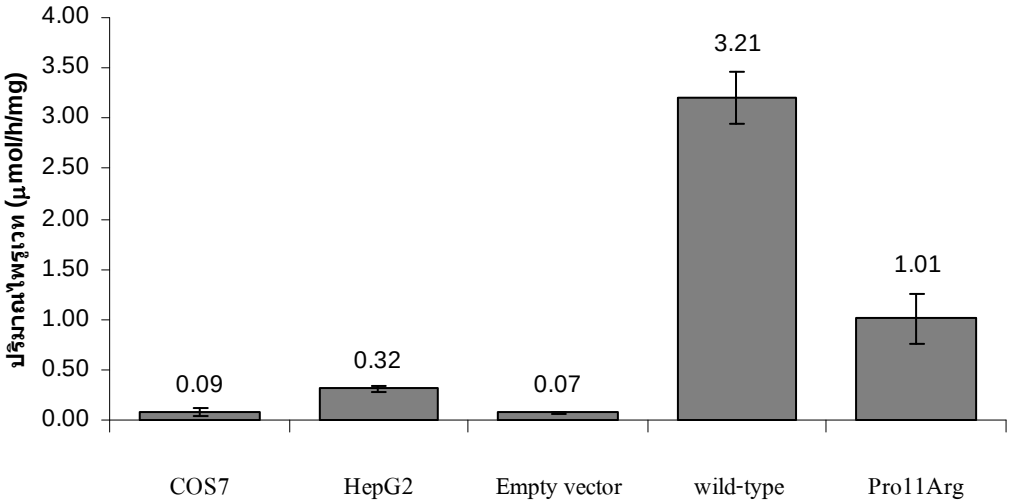
จากภาพที่ 2 จะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) ของทุกชนิดตัวอย่างมีความใกล้เคียงกัน แต่หลังจากใส่เอนไซม์ LDH พบว่า ค่าการดูดกลืนแสง (A2) ลดลงแตกต่างกัน โดยเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบปกติ (wild type *AGXT*) มีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 มากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบ Pro11Arg (Pro11Arg *AGXT*) ตามด้วยเซลล์ HepG-2 เปล่า (HepG-2) แม้ว่าจะเป็นเซลล์ตับ แต่ระดับการแสดงออกของยีน (การผลิตเอนไซม์ AGT) ก็ยังน้อยกว่าเซลล์ 2 ชนิดแรกที่เป็น over expression ส่วนเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยพลาสมิดเปล่า (empty vector) และเซลล์ COS7 เปล่า (COS7) มีความแตกต่างระหว่างค่า A1 กับค่า A2 น้อยมาก ซึ่งแทบจะไม่แตกต่างกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะเพราะโดยปกติเอนไซม์ AGT จะแสดงออกเฉพาะในเซลล์ตับ แต่เซลล์ COS7 เป็นเซลล์ไต ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ western blot ที่ไม่พบเอนไซม์ AGT ในเซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยพลาสมิดเปล่า (empty vector) สำหรับภาพที่ 3 แสดงให้เห็นถึงปริมาณไพรูเวทที่ตรวจพบในแต่ละชนิดตัวอย่าง โดยถ้ามีปริมาณไพรูเวทมาก แสดงว่าเอนไซม์ AGT มีความสามารถในการทำงานได้ดีมากด้วย ซึ่งพบว่า เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน



ภาพที่ 1 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ AGT ด้วยวิธี western blot
โดย CT คือ empty vector, WT คือ wild type *AGXT* และ MU คือ Pro11Arg *AGXT*



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงก่อนใส่เอนไซม์ LDH (A1) และหลังใส่เอนไซม์ LDH (A2)

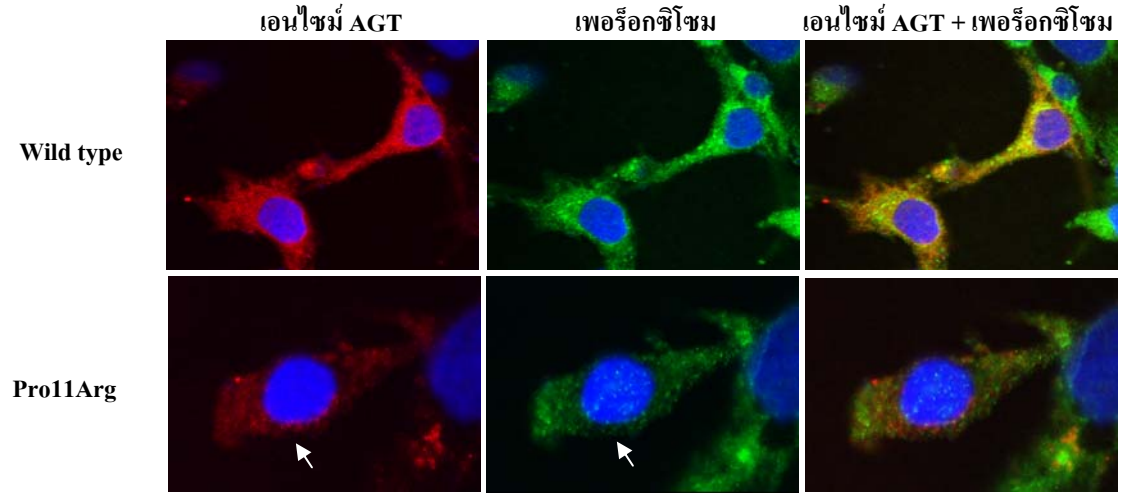


ภาพที่ 3 กราฟแสดงปริมาณไพรูเวทที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT

AGXT แบบปกติ (wild type *AGXT*) มีปริมาณไพรูเวทเฉลี่ย 3.21±0.26 µmol/h/mg ในขณะที่เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบ Pro11Arg (Pro11Arg *AGXT*) มีปริมาณไพรูเวทเฉลี่ย 1.01±0.25 µmol/h/mg ซึ่งน้อยกว่าประมาณ 3 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT แบบปกติ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg มีความสามารถในการทำงานลดลงประมาณ 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตจากยีนแบบปกติ

การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT

จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunofluorescence พบว่า ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ (ภาพที่ 4; แถวล่าง) มีรูปแบบการย้อมติดสีของเอนไซม์ AGT (สีแดง) ไม่เหมือนกับรูปแบบของเพอร์อกซิโซม (สีเขียว) ซึ่งถูกทำให้เห็นด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน catalase ซึ่งเป็น marker ของเพอร์อกซิโซม เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากเอนไซม์ AGT ที่ปกติ (ภาพที่ 4; แถวบน) ซึ่งรูปแบบจะคล้ายคลึงกัน ทาบทับกันสนิท



ภาพที่ 4 การตรวจสอบตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT โดยวิธี immunofluorescence (60X)
แถวบน คือ เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบปกติ (wild type)
แถวล่าง คือ เซลล์ COS7 ที่ถูก transfect ด้วยยีน *AGXT* แบบ Pro11Arg (Pro11Arg)
โดยที่ สีแดง คือ เอนไซม์ AGT, สีเขียว คือ เพอร็อกซิโซม, และ สีน้ำเงิน คือ นิวเคลียส

แต่ขณะที่ในเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ มีบริเวณบางส่วน (ลูกศรชี้) ที่สีแดงไม่ทับซ้อนกับสีเขียว แสดงว่า เอนไซม์ AGT บางส่วนไม่ได้ถูกส่งไปที่เพอร็อกซิโซม อย่างไรก็ตามงานวิจัยในส่วนนี้ยังอยู่ระหว่างดำเนินการ ซึ่งต้องทำการตรวจสอบให้แน่ชัดยิ่งขึ้น โดยเฉพาะบริเวณที่เอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ถูกส่งไปยังออร์แกเนลล์อื่น ต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อออร์แกเนลล์นั้นๆในการตรวจสอบต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ยีน *AGXT* ที่กลายพันธุ์แบบ Pro11Arg ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ AGT ได้ในระดับปกติและไม่ถูกสลาย เนื่องจากแถบที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อเทียบกับยีนแบบปกติ แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ลดลง ประมาณ 69% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ AGT ที่ปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรค PH1 ของผู้ป่วยรายนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยมีความผิดปกติแบบดีลีชันและมีมิวเทชันในยีน *AGXT* แบบ Pro11Arg ทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ AGT เหลือเพียง 15% เท่านั้น จึงเกิดการสะสมของผลึกแคลเซียมออกซาเลทปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดนิ่วในไตและเป็นโรค PH1 ส่วนตำแหน่งเป้าหมายภายในเซลล์ของเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์นั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด

ข้อเสนอแนะ

ในการทำ immunofluorescence นั้น ควรใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรียพิ่มเติม เพื่อตรวจสอบตำแหน่งเอนไซม์ AGT ที่กลายพันธุ์ให้แน่ชัดยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.ปิยะรัตน์ โตสุโขวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับสูตรคำนวณในการทำงานของเอนไซม์

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นพ.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ confocal

ขอขอบพระคุณอาจารย์, เจ้าหน้าที่ และนิสิตป.โท-เอกทุกคนในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ที่ให้คำปรึกษา และความเอื้อเฟื้อในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุน 90 ปี (กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ทุนการศึกษาโครงการ สควค. ระดับปริญญาโท (สสวท.)

เอกสารอ้างอิง

Danpure, C. J. and Jennings, P. R. 1986. Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *FEBS Lett.* 201:20-24.

Danpure, C. J. and Rumsby, G. 2004. Molecular aetiology of primary hyperoxaluria and its implications for clinical management. *Expert Rev Mol Med.* 6:1-16.

Lumb, M. J. and Danpure, C. J. 2000. Functional synergism between the most common polymorphism in human alanine:glyoxylate aminotransferase and four of the most common disease-causing mutations. *J Biol Chem.* 275:36415-36422.

Masyuk T. V., Huang B. Q., Ward C. J., Masyuk A. I., Yuan D., Splinter P. L., Punyashthiti R., Ritman E. L., Torres V. E., Harris P. C., and LaRusso N. F. 2003. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 125:1303–1310.

Motley, A., Lumb, M. J., Oatey, P. B., Jennings, P. R., De Zoysa, P. A., Wanders, R. J., Tabak, H. F. and Danpure, C. J. 1995. Mammalian alanine/glyoxylate aminotransferase 1 is imported into peroxisomes via the PTS1 translocation pathway. Increased degeneracy and context specificity of the mammalian PTS1 motif and implications for the peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of AGT in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.* 131:95-109.

Purdue, P. E., Takada, Y. and Danpure, C. J. 1990. Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine/glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.* 111:2341-2351.

Purdue, P. E., Lumb, M. J., Fox, M., Griffo, G., Hamon-Benais, C., Povey, S. and Danpure, C. J. 1991. Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine:glyoxylate aminotransferase. *Genomics.* 10:34-42.

Rumsby, G., Weir, T., Samuell, C. T. 1997. A semiautomated alanine : glyoxylate aminotransferase assay for the tissue diagnosis of primary hyperoxaluria type 1. *Ann Clin Biochem.* 34: 400-404.

Takada, Y., Kaneko, N., Esumi, H., Purdue, P. E. and Danpure, C. J. 1990. Human peroxisomal L-alanine: glyoxylate aminotransferase. Evolutionary loss of a mitochondrial targeting signal by point mutation of the initiation codon. *Biochem J.* 268:517-520.

Zhang, X., Roe, S. M., Hou, Y., Bartlam, M., Rao, Z., Pearl, L. H. and Danpure, C. J. 2003. Crystal structure of alanine:glyoxylate aminotransferase and the relationship between genotype and enzymatic phenotype in primary hyperoxaluria type 1. *J Mol Biol.* 331:643-652.