บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการเปลี่ยนเบสในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1*

จากการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสโดยวิธี sequencing analysis ในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1* พบการเปลี่ยนเบสทั้งหมด 11 ตำแหน่ง แบ่งเป็นการเปลี่ยนเบสในยีน *MSX1* 8 ตำแหน่ง และยีน *PVRL1* 3 ตำแหน่งดังนี้

<u>ยีน *MSX1*</u>

ยีน *MSX1* พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง พบใน exon 1 สี่ตำแหน่ง intron 1 หนึ่งตำแหน่ง exon 2 สองตำแหน่ง และ 3'UTR หนึ่งตำแหน่ง

- exon 1

- เบสตำแหน่งที่ 90 เปลี่ยนเบสจาก cytosine เป็นเบส alanine (90C>A) พบในผู้ป่วย 2 ราย โดยพบทั้ง 2 อัลลีล (homozygous) แสดงว่าอัลลีล 90C>A ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 4 อัลลีลใน 200 อัลลีล (2%)

- เบสตำแหน่งที่ 101 เปลี่ยนเบสจาก cytosine เป็น guanine (101C>G) พบในผู้ป่วย 8 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีลในผู้ป่วย 4 ราย (heterozygous) และพบทั้ง 2 อัลลีลในผู้ป่วย 4 ราย แสดงว่าอัลลีล 110C>G ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 12 อัลลีลใน 200 อัลลีล (6%)

- เบสตำแหน่งที่ 330 เปลี่ยนเบสจาก cytosine เป็น thymidine (330C>T) พบในผู้ป่วย 30 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีลในผู้ป่วย 15 ราย และพบทั้ง 2 อัลลีลในผู้ป่วย 15 ราย แสดงว่าอัลลีล 330C>T ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 45 อัลลีลใน 200 อัลลีล (22.5%)

- เบสตำแหน่งที่ 440 เปลี่ยนเบสจาก cytosine เป็น adenine (440C>A) พบในผู้ป่วย 3 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีลในผู้ป่วยทั้ง 3 ราย แสดงว่าอัลลีล 440C>A ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 3 อัลลีลใน 200 อัลลีล (1.5%)

- intron 1

- เบสตำแหน่งที่ 452-14 thymidine ขาดหายไป 1 ตัว (452-14delT) พบในผู้ป่วย 8 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีลในผู้ป่วยทั้ง 8 ราย แสดงว่าอัลลีล 452-14delT ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 8 อัลลีลใน 200 อัลลีล (4%)

- exon 2

- เบสตำแหน่งที่ 799 เปลี่ยนเบสจาก guanine เป็น thymidine (799G>T) พบในผู้ป่วย 1 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีล แสดงว่าอัลลีล 799G>T ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 1 อัลลีลใน 200 อัลลีล (0.5%)

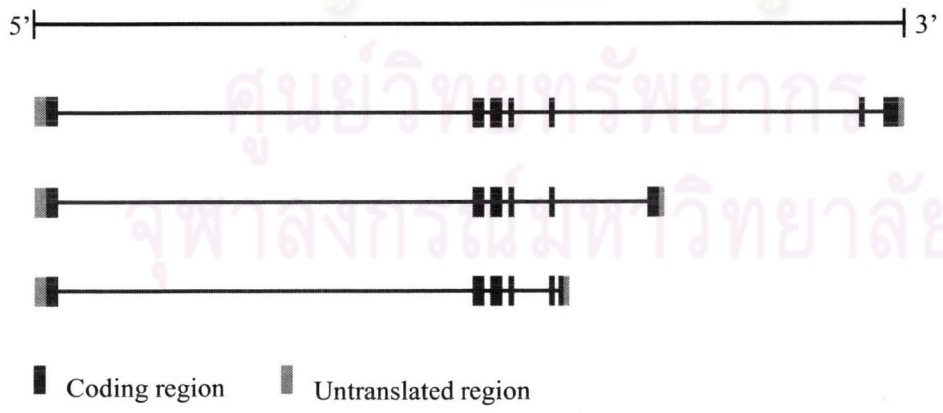
- เบสตำแหน่งที่ 832 เปลี่ยนเบสจาก cytosine เป็น thymidine (832C>T) พบในผู้ป่วย 1 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีล แสดงว่าอัลลีล 832C>T ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 1 อัลลีลใน 200 อัลลีล (0.5%)

- 3'untranslated region (3'UTR)

- เบสตำแหน่งที่ 894+6 เปลี่ยนเบสจาก cytosine เป็น thymidine (894+6C>T) พบในผู้ป่วย 1 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีล แสดงว่าอัลลีล 894+6C>T ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 1 อัลลีลใน 200 อัลลีล (0.5%)

ยีน *PVRL1*

ยีน *PVRL1* เป็นยีนที่มี alternative splicing ทำให้มีรูปแบบของ mRNA ที่แตกต่างกัน 3 แบบ ซึ่งให้โปรตีนที่แตกต่างกัน 3 ไอโซฟอร์ม (isoform) ได้แก่ แอลฟา เบตา และแกมมา ในการศึกษานี้ตรวจหาการกลายพันธุ์เฉพาะในไอโซฟอร์มแอลฟา เนื่องจากเป็นไอโซฟอร์มเดียวที่มีกรดอะมิโน E/A-X-Y-V ที่ทำหน้าที่จับกับ PDZ domain ของ afadin โดยทั้ง 3 ไอโซฟอร์มมี exon 1-5 เหมือนกัน ส่วนหลังจากนั้นในแต่ละไอโซฟอร์มมี alternative splicing แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างของยีน *PVRL1* และไอโซฟอร์มทั้ง 3 แบบของโปรตีน nectin 1

การเปลี่ยนเบสในยีน *PVRL1* พบทั้งหมด 3 ตำแหน่ง พบใน intron 4 หนึ่งตำแหน่ง และอีกสองตำแหน่งพบใน exon 6

- intron 4

- เบสตำแหน่งที่ 854+15 เปลี่ยนเบสจาก guanine เป็น thymidine (854+15G>T) พบในผู้ป่วย 3 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีล แสดงว่าอัลลีล 854+15G>T ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 3 อัลลีลใน 200 อัลลีล (1.5%)

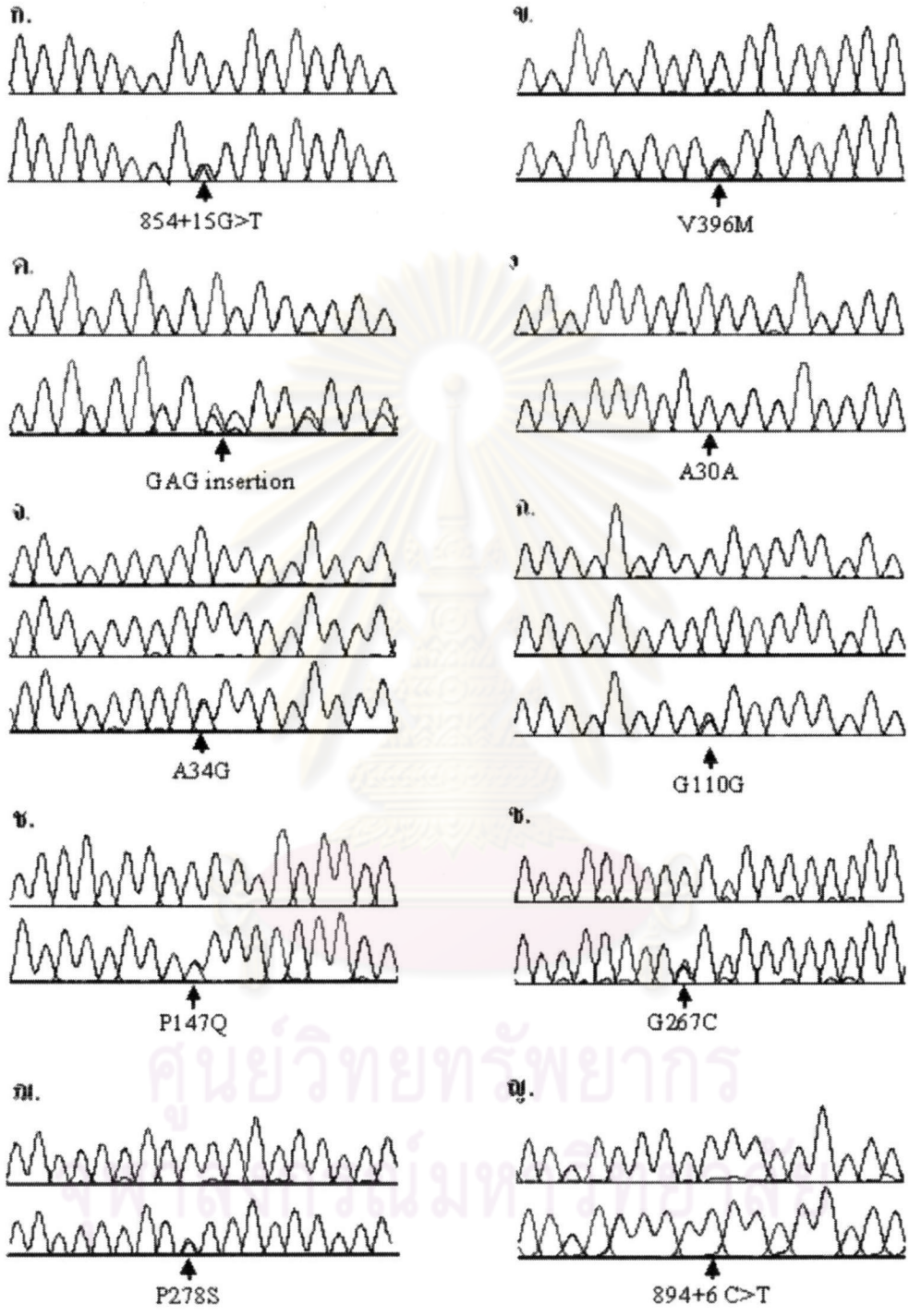
- exon 6

- เบสตำแหน่งที่ 1186 เปลี่ยนเบสจาก guanine เป็น adenine (1186G>A) พบในผู้ป่วย 1 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีล แสดงว่าอัลลีล 1186G>A ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 1 อัลลีลใน 200 อัลลีล (0.5%)

- เบสตำแหน่งที่ 1335 มีเบส guanine, adenine และ guanine เพิ่ม 3 เบสเรียงตามลำดับ (1335insGAG) พบในผู้ป่วย 5 ราย โดยพบเพียง 1 อัลลีลในผู้ป่วยทั้งหมด แสดงว่าอัลลีล 1335insGAG ในผู้ป่วยไทยมีความถี่ 5 อัลลีลใน 200 อัลลีล (2.5%)

ผลการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1* ที่รายงานมานี้แสดง โครมาโทแกรมการเปลี่ยนของลำดับเบสในรูปที่ 6 และสรุปผลดังตารางที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบลำดับเบสปกติกับลำดับเบสที่พบการกลายพันธุ์ในยีน *PVRL1* (รูป ก. - ค.) และยีน *MSX1* (รูป ง. - ญ.)

ตารางที่ 9 ข้อมูลการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *MSX1* และยีน *PVRL*

Nucleotide Position	Nucleotide change	Heterozygous (patient)	Homozygous (patient)	Allele frequency (%)
MSX1				
Exon 1				
90	C>A	0/100	2/100	2
101	C>G	4/100	4/100	6
330	C>T	15/100	15/100	22.5
440	C>A	3/100	0/100	1.5
Intron 1				
452-14	delT	8/100	0/100	4
Exon 2				
799	G>T	1/100	0/100	0.5
832	C>T	1/100	0/100	0.5
3'UTR				
894+6	C>T	0/100	1/100	1.0
PVRL1				
Intron 4				
854+15	G>T	3/100	0/100	1.5
Exon 6				
1186	G>A	1/100	0/100	0.5
1335-1337	insGAG	5/100	0/100	2.5

ผลวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1*

การวิเคราะห์การเปลี่ยนเบสในยีน *MSX1* และยีน *PVRL1* เพื่อแบ่งการเปลี่ยนเบส ออกเป็น 2 กลุ่มคือ

- การเปลี่ยนเบสที่ก่อให้เกิดโรค หรือ การกลายพันธุ์ (pathogenic mutation)
- การเปลี่ยนเบสที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือ โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism)

โดยอาศัยข้อมูลต่อไปนี้ เป็นเกณฑ์การแบ่ง

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโน
2. การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติ
3. เปรียบเทียบ domain ที่ทำหน้าที่ของโปรตีน msx1 และโปรตีน nectin-1 กับตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนเบสหรือกรดอะมิโน
4. เปรียบเทียบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับตำแหน่งที่มีการ conserve ในสิ่งมีชีวิต

<u>ยีน *MSX1*</u>

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโน

การเปลี่ยนเบสของยีน *MSX1* มีทั้งหมด 8 ตำแหน่ง แต่มีตำแหน่งที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโน (missense mutation) เพียง 4 ตำแหน่ง ไม่มีการเปลี่ยนของกรดอะมิโน (silent mutation) 2 ตำแหน่ง ส่วนอีก 2 ตำแหน่งไม่ได้อยู่ในบริเวณที่มีการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนมีรายละเอียดดังนี้

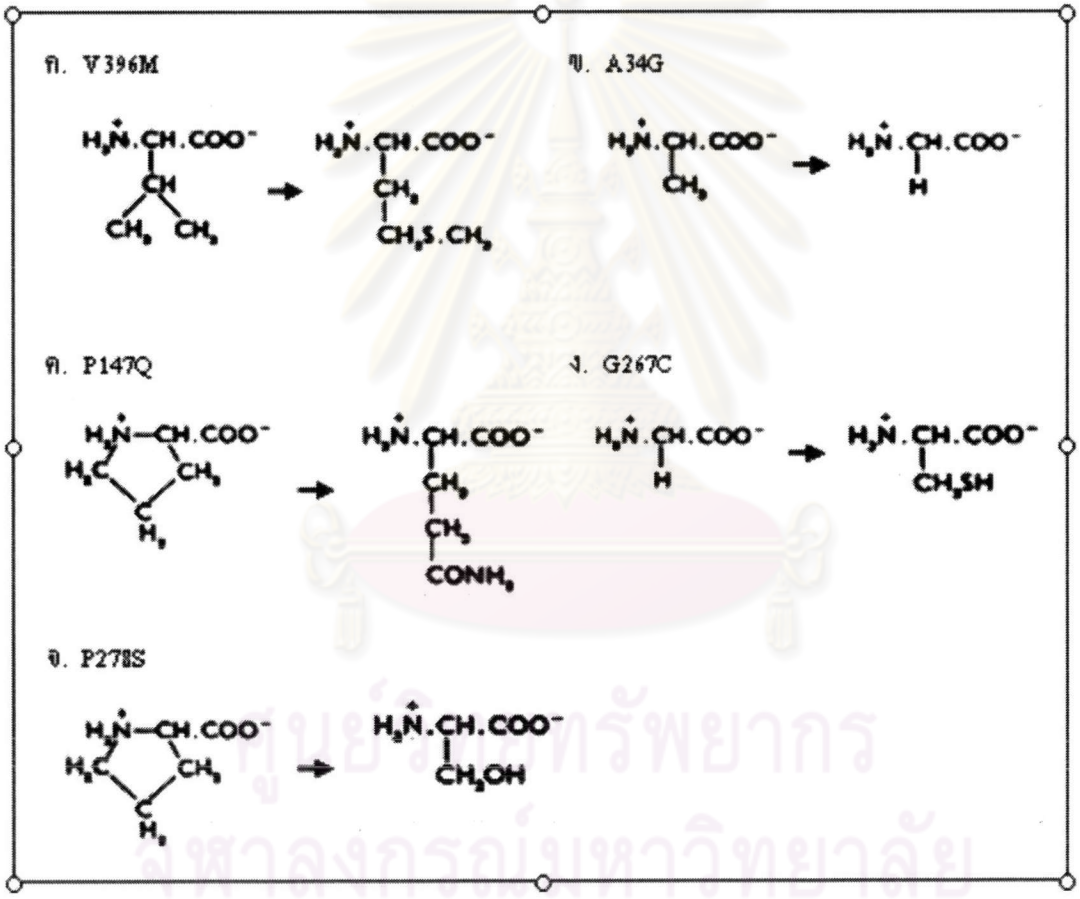
- 101C>G ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 34 เปลี่ยนจาก alanine เป็น glycine (A34G) ซึ่งโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนทั้งสองมีความคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 7) จัดอยู่ในกลุ่มไม่มีขั้ว (non-polar) เหมือนกัน จึงไม่น่าจะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีน

- 440C>A ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 147 เปลี่ยนจาก proline เป็น glutamine (P147Q) ซึ่งโครงสร้างของกรดอะมิโนทั้งสองมีความแตกต่างกัน (รูปที่ 7) เนื่องจากโครงสร้างของ proline มีลักษณะเป็น cyclic แต่ glutamine เป็นเส้นตรง และคุณสมบัติก็แตกต่างกัน โดย proline จัดอยู่ในกลุ่มไม่มีขั้ว แต่ glutamine อยู่ในกลุ่ม ไม่มีประจุ แต่มีขั้ว (uncharge polar) การเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีน

- 799G>T ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 267 เปลี่ยนจาก glycine เป็น cysteine (G267C) ซึ่งโครงสร้างของกรดอะมิโนทั้งสองแตกต่างกัน (รูปที่ 7) แม้จะมีคุณสมบัติอยู่ในกลุ่มไม่มีขั้วเหมือนกัน

แต่ cysteine มีธาตุกำมะถัน (Sulphur) เป็นองค์ประกอบ ทำให้สร้างพันธะกับธาตุกำมะถันด้วยกันได้ เกิดเป็น disulfide bond อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนได้

- 832C>T ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 278 เปลี่ยนจาก proline เป็น serine (P278S) ซึ่งโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนทั้งสองมีความแตกต่างกัน (รูปที่ 7) เช่นเดียวกับที่รายงานในตำแหน่ง 440C>A โครงสร้างของ proline มีลักษณะเป็น cyclic แต่ serine เป็นเส้นตรง และคุณสมบัติก็แตกต่างกัน โดย proline จัดอยู่ในกลุ่มไม่มีขั้ว แต่ serine อยู่ในกลุ่ม ไม่มีประจุ แต่มีขั้ว (uncharge polar) การเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีน



รูปที่ 7 โครงสร้างของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละตำแหน่งการกลายพันธุ์

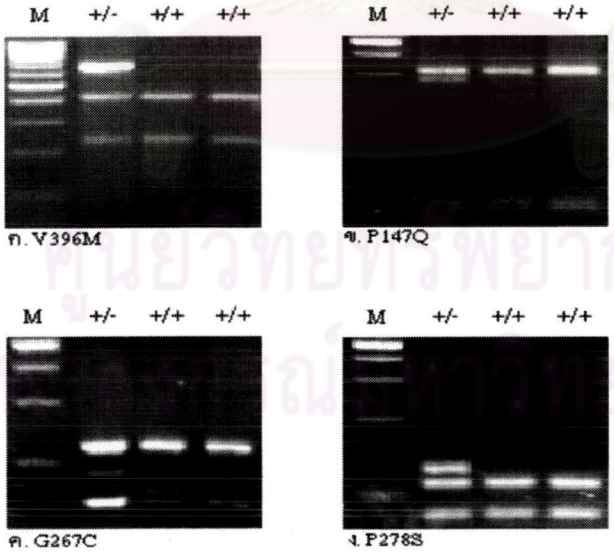
2. การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติ

การศึกษานี้จะศึกษาเฉพาะการเปลี่ยนเบสที่คาดว่าเป็นการกลายพันธุ์เท่านั้น ซึ่งในยีน *MSX1* ตำแหน่งที่คาดว่าเป็นการกลายพันธุ์จากข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมี 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 1) P147Q 2) G267C และ 3) P278S โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในคนปกติ 100 คน มีผลดังนี้ (ตารางที่ 10)

1) P147Q ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I (รูปที่ 8) โดยใช้วิธี mutagenesis primer เนื่องจากตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนเบส ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดแล้วได้ขนาดที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วย agarose gel electrophoresis จึงออกแบบ primer ใหม่ ผลการตัดเอนไซม์ในคนปกติบางส่วน พบว่ามีอัลลีล P147Q จึงไม่ได้ทำการตัดในคนปกติครบทั้ง 100 คน พบอัลลีล P147Q ในคนปกติ 6 คน โดยพบเพียง 1 อัลลีลในทั้ง 6 คน แสดงว่าอัลลีล P147Q ในคนไทยปกติมีความถี่ 6 อัลลีลใน 120 อัลลีล (5%)

2) G267C ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I (รูปที่ 8) โดยใช้วิธี mutagenesis primer เนื่องจากตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนเบส ไม่มี recognition site สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงต้องออกแบบ primer เพื่อให้มี recognition site สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่พบอัลลีล G267C ในคนไทยปกติ

3) P278S ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mwo* I (รูปที่ 8) ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่พบอัลลีล P278S ในคนไทยปกติ



รูปที่ 8 ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในแต่ละตำแหน่งการกลายพันธุ์

M : 100 bp Marker, +/+ : homozygous normal, +/- : heterozygous mutant

ตารางที่ 10 ข้อมูลการตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติ โดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Nucleotide position	Nucleotide change	Expected amino acid change	Restriction enzyme	Frequency in controls
MSX1				
Exon 1				
440	C>A	P147Q	*Dde* I	6/60
Exon 2				
799	G>T	G267C	*Dde* I	0/100
832	C>T	P278S	*Mwo* I	0/100
PVRL1				
Exon 6				
1186	G>A	V396M	*Pml* I	0/200

3. เปรียบเทียบ domain ที่ทำหน้าที่ของโปรตีน msx1 กับตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนเบสหรือกรดอะมิโน

ยีน *MSX1* ทำหน้าที่เป็น transcription factor เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) domain ที่ทำหน้าที่นี้คือ homeodomain ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 60 ตัว (กรดอะมิโนตำแหน่ง 166-225 ในยีน *MSX1*) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความจำเพาะในยีนกลุ่ม Hox family และส่วน N-terminal ของ homeodomain ซึ่งเรียกว่า extended homeodomain (EHD) มีการสันนิษฐานว่าเป็นตำแหน่งที่เกิด phosphorylation หรือเป็นตำแหน่งที่กำหนดให้โปรตีน msx1 ทำงานบริเวณนิวเคลียส นอกจากนี้มีส่วนของ exon 2 ที่สันนิษฐานว่ามี regulatory element อยู่ แต่ยังไม่ทราบถึงหน้าที่การทำงานแน่ชัด ดังนั้นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของยีน *MSX1* มีอยู่ 3 บริเวณด้วยกันคือ 1) homeodomain 2) EHD และ 3) exon 2

จากข้อมูลนี้การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่มีความเกี่ยวข้องกับบริเวณที่ทำหน้าที่ในยีน *MSX1* มีด้วยกัน 4 ตำแหน่งคือ 1) P147Q 2) G267C 3) P278S และ 4) 894+6C>T อัลลีล P147Q อยู่ใน EHD ส่วนสามตำแหน่งที่เหลืออยู่ใน exon 2 ซึ่งเป็นส่วนที่สันนิษฐานว่ามี regulatory element

4. เปรียบเทียบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับตำแหน่งที่มีการ conserve ในสิ่งมีชีวิต

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน msx1 ในสิ่งมีชีวิต 7 ชนิด ได้แก่ ปลา (zebra fish), กบ, ไก่, วัว, หนู (rat), หนู (mouse) และคน โดยโปรแกรม clustalX แสดงดังรูปที่ 9 มีรายละเอียดของแต่ละตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสดังนี้

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 30 (A30A) ในคน

ปลา : ไม่มีกรดอะมิโนตำแหน่งนี้
กบ : asparagine (N)
ไก่ : ไม่มีกรดอะมิโนตำแหน่งนี้
วัว : threonine (T)
หนู (rat) : alanine (A)
หนู (mouse) : alanine (A)
คน : alanine (A)

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 30 ในคนมีการ conserve ในหนูและคนเท่านั้น

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 34 (A34G) ในคน

ปลา : glutamine (G)
กบ : glutamine (G)
ไก่ : alanine (A)
หนู (rat) : alanine (A)
หนู (mouse) : alanine (A)
วัว : alanine (A)
คน : alanine (A)

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 34 ในคนมีการ conserve ในวัว หนู และคน

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 110 (G110G) ในคน

ปลา : glycine (G)
กบ : glycine (G)
ไก่ : glycine (G)
วัว : glycine (G)
หนู (rat) : glycine (G)
หนู (mouse) : glycine (G)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คน : glycine (G)

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 110 ในคนมีการ conserve ตั้งแต่ปลาจนถึงคน

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 147 (P147Q) ในคน

ปลา : proline (P)

กบ : proline (P)

ไก่ : proline (P)

วัว : proline (P)

หนู (rat) : proline (P)

หนู (mouse) : proline (P)

คน : proline (P)

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 147 ในคนมีการ conserve ตั้งแต่ปลาจนถึงคน

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 267 (G267C) ในคน

ปลา : serine (S)

กบ : glycine (G)

ไก่ : glycine (G)

วัว : glycine (G)

หนู (rat) : serine (S)

หนู (mouse) : serine (S)

คน : glycine (G)

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 267 ในคน ไม่มีการ conserve เลย

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 278 (P278S) ในคน

ปลา : asparagine (N)

กบ : proline (P)

ไก่ : proline (P)

วัว : proline (P)

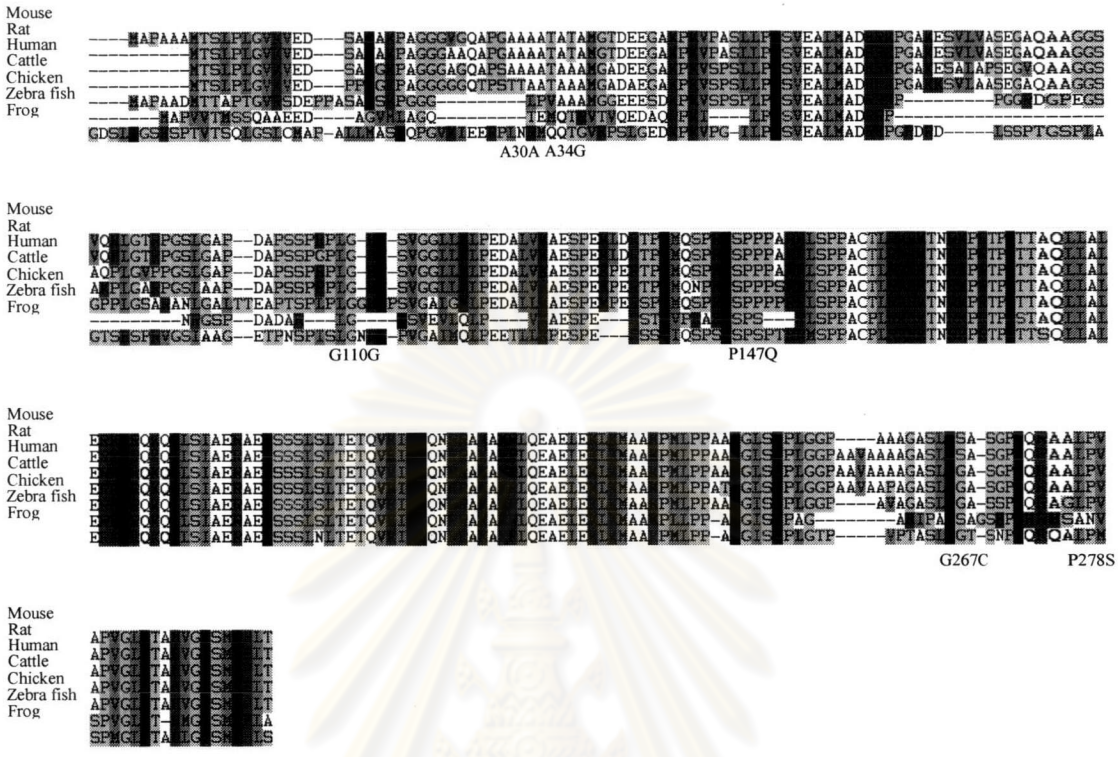
หนู (rat) : proline (P)

หนู (mouse) : proline (P)

คน : proline (P)

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 278 ในคนมีการ conserve ตั้งแต่กบถึงคน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ในยีน *MSX1* ของสิ่งมีชีวิต 7 ชนิด

<u>สรุปการเปลี่ยนเบสที่พบในยีน *MSX1*</u>

จากข้อมูลทั้ง 4 อย่าง สนับสนุนการเปลี่ยนเบสตำแหน่ง 799G>T และ 832C>T เป็นการกลายพันธุ์ ส่วนตำแหน่งอื่น ๆ เป็นโพลิมอร์ฟีซึม

<u>ยีน *PVRL1*</u>

1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโน

การเปลี่ยนเบสของยีน *PVRL1* มีทั้งหมด 3 ตำแหน่ง มี 2 ตำแหน่ง ที่ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง อีก 1 ตำแหน่งอยู่ในส่วนของ intron จึงไม่ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

- 1186G>A ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 396 เปลี่ยนจาก valine เป็น methionine (V396M) ซึ่งโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4) จัดอยู่ในกลุ่มไม่มีขั้วเหมือนกัน จึงไม่น่าส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีน

- 1335insGAG ส่งผลให้มี glutamic acid ที่ตำแหน่ง 445 เพิ่มขึ้นมา 1 ตัว ไม่น่าจะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีน

2. การตรวจการกลายพันธุ์ในคนปกติ

เช่นเดียวกับยีน *MSX1* การศึกษานี้จะศึกษาเฉพาะการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่คาดว่าเป็นการกลายพันธุ์เท่านั้น จากข้อมูลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของกรดอะมิโนไม่พบการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งใดที่อาจจะเป็นการกลายพันธุ์ แต่เนื่องจากมีการศึกษาในยีนนี้เป็นครั้งแรก และอัลลีล V396M ยังไม่มีรายงานการพบในคนปกติ จึงนำอัลลีลดังกล่าวมาตรวจหาในคนปกติ เพื่อหาความถี่ของอัลลีล โดยคาดหวังว่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป มีผลดังนี้ (ตารางที่ 8)

- V396M ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pml* I (รูปที่ 5) ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในคนปกติ 100 คน ไม่พบอัลลีลดังกล่าวเลย แต่ตำแหน่งดังกล่าวสันนิษฐานว่าเป็นโพลิมอร์ฟิซึม จึงทำการตรวจหาอัลลีลดังกล่าวเพิ่มเติมในคนปกติและผู้ป่วย เนื่องจากตำแหน่ง V396M อยู่ใกล้กับตำแหน่ง E445ins จึงเลือกใช้วิธี direct sequencing ในการตรวจหาอัลลีล V396M และ E445ins ในคนปกติ เพื่อจะได้ข้อมูลความถี่ของอัลลีล E445ins ในคนปกติเพิ่มเติม และตัดเอนไซม์ในผู้ป่วยเพิ่ม 81 คน ผลการตรวจหาอัลลีล V396M ทั้งในคนปกติและผู้ป่วยไม่พบอัลลีลดังกล่าว แต่อัลลีล E445ins พบ 5 อัลลีล

3. เปรียบเทียบ domain ที่ทำหน้าที่ของโปรตีน nectin-1 กับตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนเบสหรือกรดอะมิโน

nectin-1 เป็น cell-cell adhesion molecule โดยทำงานร่วมกับ afadin เพื่อชักนำให้เกิดการสร้าง adheren junction มีบริเวณที่สำคัญ 3 ส่วนคือ 1) Extracellular region ประกอบด้วย IG-like domain (กรดอะมิโนตำแหน่ง 40-142) และ IGcam domain (กรดอะมิโนตำแหน่ง 247-332) โดย IG-like domain เป็น receptor ของ herpes simplex virus ส่วน IGcam domain เป็นบริเวณที่เกิด trans dimerization ทำให้ nectin-1 ยึดกันได้ 2) transmembrane region ทำหน้าที่ยึดโปรตีนไว้กับ plasma membrane 3) cytoplasmic region เป็นส่วนสำคัญ เนื่องจากมีบริเวณ E/A-X-Y-V ที่ทำหน้าที่จับกับ PDZ domain ของ afadin ซึ่งทั้ง 3 ส่วนพบได้ในไอโซฟอร์มแบบแอลฟาและเบตา แต่บริเวณ E/A-X-Y-V พบเฉพาะไอโซฟอร์มแอลฟา ส่วนไอโซฟอร์มแบบแกมมามีแต่ส่วน extracellular region ดังนั้นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของยีน *PVRL1* มีอยู่ 3 บริเวณด้วยกันคือ 1) E/A-X-Y-V 2) IG-like domain และ 3) IGcam domain

จากข้อมูลนี้ไม่พบการเปลี่ยนเบสที่มีความเกี่ยวข้องกับบริเวณที่ทำหน้าที่ในยีน *PVRL1* อย่างไรก็ตามอัลลีล V396M อยู่ใกล้กับ IGcam domain และ E/A-X-Y-V ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของ domain นั้น ๆ ได้

4. เปรียบเทียบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโน กับตำแหน่งที่มีการ conserve ในสิ่งมีชีวิต

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน nectin 1 ในสิ่งมีชีวิต 3 ชนิด ได้แก่ หนู (mouse), หมู และคน (มี 3 ไอโซฟอร์ม) โดยโปรแกรม clustalX แสดงดังรูปที่ 10 มีรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสดังนี้

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 396 (V396M) ในคน (แอลฟาไอโซฟอร์ม)

หนู (mouse) : valine (V)

หมู : valine (V)

คน (แอลฟา) : valine (V)

คน (เบตา) : threonine (T)

คน (แกมมา) : ไม่มีกรดอะมิโน

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 396 ในคนมีการ conserve ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิด แต่ไม่ conserve ในกลุ่มยีนแบบเดียวกัน

- กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 438-445 (E445insE) ในคน (แอลฟาไอโซฟอร์ม)

หนู (mouse) : glutamic acid (E) 7 ตัว

หมู : glutamic acid (E) 7 ตัว

คน (แอลฟา) : glutamic acid (E) 8 ตัว

คน (เบตา) : glutamic acid (E) 3 ตัว

คน (แกมมา) : ไม่มีกรดอะมิโน

แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 438-445 ในคน ไม่ conserve ทั้งในสิ่งมีชีวิตและในยีนกลุ่มเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ในยีน *PVRL1* ของสิ่งมีชีวิต 3 ชนิด

<u>สรุปการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่พบในยีน*PVRL1*</u>

จากข้อมูลทั้ง 4 อย่าง สนับสนุนการเปลี่ยนลำดับเบสตำแหน่ง 1186G>A เป็นการกลายพันธุ์ ส่วนตำแหน่งอื่น ๆ เป็นโพลิมอร์ฟิซึม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย