

การกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส ในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย

รจนาพรรณ ปั่นกาญจนโต¹ ภาวิณี อินนาค¹ มะลิวัลย์ นุ่มนวล¹ อีระยุทธ สมบุญ¹ สุภาพร นามมูลน้อย¹
นวลจันทร์ วัจกษณ์จินดา² ھرรษา ไทยศรี¹ และ สุรัคเมธ มหาศิริมงคล¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ โรคฟีนิลคีโตนูเรียเป็นโรคหายาก เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ย่อยกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนไปเป็นไทโรซีน การสะสมของฟีนิลอะลานีนในร่างกายส่งผลให้เซลล์สมองถูกทำลายและสติปัญญาบกพร่อง เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลสในทารกไทย คณะผู้วิจัยได้นำตัวอย่างกระดากซ์เลือดแห้งที่เหลือจากการตรวจในงานประจำของศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ที่สงสัยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรียจากการตรวจคัดกรองและมีผลการตรวจยืนยันค่าฟีนิลอะลานีนในซีรัมมากกว่า 2.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และอัตราส่วนของฟีนิลอะลานีนต่อไทโรซีนมากกว่า 2 จำนวน 32 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว พบการกลายพันธุ์ 2-5 ตำแหน่ง ในทุกตัวอย่างรวม 17 รูปแบบ ซึ่งเป็นแบบเปลี่ยนรหัสเบสหนึ่งตำแหน่ง แบ่งเป็นหลังแปลรหัสแล้วเปลี่ยนกรดอะมิโน 13 รูปแบบ เป็นกรดอะมิโนเดิม 3 รูปแบบ และแบบที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน 1 รูปแบบ โดยการกลายพันธุ์ชนิดเปลี่ยนกรดอะมิโนพบใน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.12) และมีผลตรวจวิเคราะห์ฟีนิลอะลานีนในซีรัมมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรขึ้นไป เนื่องจากข้อจำกัดของการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger sequencing และมีการตรวจพบการกลายพันธุ์หลายตำแหน่ง จึงอาจนำเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสสมัยใหม่มาใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะยีนเป้าหมาย เพื่อวินิจฉัยโรคฟีนิลคีโตนูเรียให้มีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: การกลายพันธุ์, ยีนฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซีเลส, โรคฟีนิลคีโตนูเรีย, ทารกไทย

Corresponding author E-mail: rotjanapan.p@dmasc.mail.go.th

Received: 25 August 2022

Revised: 20 October 2022

Accepted: 31 October 2022

บทนำ

โรคฟีนิลคีโตนูเรีย (phenylketonuria, PKU) เป็นโรคหายากทางพันธุกรรมแบบยีนด้อย (autosomal recessive) ที่การกลายพันธุ์ทำให้การผลิตเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนไฮดรอกซิเลส (phenylalanine hydroxylase, PAH) บกพร่อง มีผลทำให้ผู้ที่ป่วยเป็นโรคนี้ไม่สามารถย่อยสลายกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, Phe) ไปเป็นไทโรซีน (tyrosine, Tyr) ได้เหมือนคนปกติ เกิดการสะสมของ Phe ในร่างกายมากผิดปกติ รวมทั้งมีการดฟีนิลไพรูวิก (phenylpyruvic acid) และกรดอินทรีย์ (organic acid) อื่นๆ ปนมาในปัสสาวะ แม้ PKU เป็นโรคที่พบได้ค่อนข้างน้อย แต่หากไม่ได้รับการรักษา อาจทำให้เกิดปัญหาสุขภาพร้ายแรง อาการที่อาจพบได้แก่ สัน ซัก สมาธิสั้น ไม่อยู่นิ่ง ผิวซีด ผอมส่อน หรืออาจมีแผลที่เกิดจากผิวหนังอักเสบ ลมหายใจ ผิว และปัสสาวะมีกลิ่นสาบหนู ทารกมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ อาการมีตั้งแต่ระดับน้อยจนถึงระดับรุนแรง ที่ทำให้ระบบประสาทและสมองเกิดความเสียหายและสติปัญญาบกพร่อง โรคนี้พบได้มากในคนผิวขาว (อุบัติการณ์ประมาณ 1 ต่อ 10,000) ประเทศไทยพบได้น้อย (อุบัติการณ์ประมาณ 1 ต่อ 200,000) หากผู้ป่วยมีอาการที่อาจเป็นสัญญาณของโรคนี้ แพทย์จะสั่งตรวจเลือดหาปริมาณ Phe เพื่อการวินิจฉัยโรค และอาจตรวจยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธีอื่น เช่น ตรวจปัสสาวะหรือตรวจทางพันธุกรรม เป็นต้น กรณีที่ผู้ป่วยหรือคนในครอบครัวเคยมีประวัติเป็นโรคนี้ ก่อนวางแผนมีบุตรควรไปปรึกษาแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญทางพันธุศาสตร์⁽¹⁻³⁾

ปัจจุบันทารกแรกเกิดในประเทศไทยร้อยละ 95 ได้รับการตรวจคัดกรองโรค PKU โดยทางโรงพยาบาล ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของทารกแล้วหยดบนกระดาษซับเลือด จากนั้นส่งกระดาษซับเลือดแห้ง (dried blood spot, DBS) ตรวจที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หากพบ Phe ในเลือดมีค่าเกิน 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (mg/dL) วินิจฉัยว่าเป็นโรค PKU ในคนปกติค่า Phe ต่ำกว่า 2 mg/dL แต่ในรายที่เป็นโรคไม่รุนแรง Phe อาจอยู่ที่ค่าตั้งแต่ 5 mg/dL ขึ้นไป ซึ่งอาจทำให้ระดับไอคิวต่ำกว่าคนปกติ แพทย์จะรักษาตามอาการและป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อน โดย

ให้ผู้ป่วยควบคุมอาหารและต้องรับประทานอาหารตามแพทย์หรือนักโภชนาการแนะนำ สำหรับผู้ป่วยวัยทารกสามารถรับประทานนมแม่ได้ตามปกติ เนื่องจากนมแม่มีระดับ Phe ต่ำ ส่วนเด็กโตแพทย์แนะนำให้ดื่มน้ำที่มีโปรตีนสูง เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ ถั่ว หรือเนย และควรรับประทานอาหารจำพวกผัก ผลไม้ และอาหารที่มี Phe ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งอาจแนะนำให้รับประทานอาหารเสริม Tyr ด้วย นอกจากนี้ผู้ป่วยควรหลีกเลี่ยงยาบางชนิดที่อาจมีส่วนประกอบของแอสปาร์แตม วิตามิน หรืออาหารเสริมบางชนิดที่อาจมีส่วนผสมของกรดอะมิโนหรือนมผงขาดมันเนย ทั้งนี้ผู้ป่วยควรไปตรวจติดตามผลเป็นประจำ เพื่อให้แพทย์ประเมินผลและวางแผนการรักษาอย่างเหมาะสมต่อไป⁽³⁻⁶⁾

เอนไซม์ PAH ถูกสร้างที่เซลล์ตับ ทำหน้าที่ย่อยกรดอะมิโน Phe เป็น Tyr โดยมีเตตราไฮโดรไบโอเทอริน (tetrahydrobiopterin, BH₄) เป็นตัวช่วยเร่งในการย่อย เอนไซม์ PAH ถูกสร้างจากยีน PAH (Gene ID: 5053) ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 (12 q22-24.1) ประกอบไปด้วย 13 เอ็กซอน (exons) ขนาดความยาว 90 กิโลเบส (kb) ปัจจุบันในฐานข้อมูล The PAH Mutation Analysis Consortium มีข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน PAH จากคนป่วยโรค PKU ที่แตกต่างกันมากกว่า 520 ตำแหน่ง^(7,8)

การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในระดับยีนที่มีนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในสายดีเอ็นเอ (DNA) เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาจส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพการทำงานหรือมีการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ ประเภทของการกลายพันธุ์แบ่งเป็น แบบการขาดหายไป (deletion) หรือแบบการแทรกเพิ่ม (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่หนึ่งเบสขึ้นไป แบบเปลี่ยนรหัสเฉพาะตำแหน่ง (point mutation) ซึ่งอาจเป็นเบสเดียวหรือเบสจำนวนไม่มาก ทำให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิม (missense mutation) หรือได้โปรตีนตัวเดิม (silent mutation) แบบเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด (nonsense mutation) ทำให้ได้โปรตีนสั้นลงกว่าเดิม แบบเลื่อนกรอบแปลรหัส (frameshift mutation) จากการมีเบสแทรกเพิ่มหรือขาดหายไปแบบไม่ครบโคดอน

(1 codon = 3 นิวคลีโอไทด์) และแบบส่งผลต่อการแสดงออกของยีน(transcriptional mutation) ที่ทำให้เกิดจากความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์และตกแต่งเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนผิดปกติไปโดยเฉพาะบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน(regulatory elements) ได้แก่ โปรโมเตอร์ (promoter) เอนแฮนเซอร์ (enhancer) และตำแหน่งแคป (cap site) เป็นต้น⁽⁹⁾

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายเพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่สนใจศึกษาหรือต้องการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ว่าถูกต้องหรือไม่ DNA sequencing เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับใช้ยืนยันผลของทุกเทคนิคที่เป็นการตรวจคัดกรองการกลายพันธุ์ DNA sequencing มีหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมคือเทคนิคของแซงเกอร์ (Sanger sequencing) ซึ่งมีข้อจำกัดในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สูงสุดไม่เกิน 1,000 คู่เบส (bp) และต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ที่อยู่บริเวณปลายหรือบริเวณขนาบข้างของบริเวณที่ศึกษาเพื่อออกแบบไพรเมอร์ (primer) และจำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นในคนปกติทั่วไป (reference sequence) เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบในกรณีตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป⁽¹⁰⁾

ประเทศไทยมีการนำเทคนิค DNA sequencing มาใช้ศึกษาโรค PKU จากการตรวจยีน PAH และยีนที่เกี่ยวข้องกับการพร่อง BH₄ ที่เป็นตัวช่วยในการทำงานของเอนไซม์ ปี พ.ศ. 2560 มีรายงานการศึกษาในผู้ป่วย 4 ราย พบการกลายพันธุ์ของยีน PAH 2 ราย และยีน 6-pyrovoyl-tetrahydropterinsynthase (PTS) 2 ราย รวม 8 รูปแบบ⁽¹¹⁾ และปี พ.ศ. 2564 มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติของยีน PAH ที่มีการกลายพันธุ์ 11 รูปแบบ ในคนป่วยโรค PKU 13 ราย พบว่ามีประสิทธิภาพน้อยกว่าเอนไซม์ปกติ⁽¹²⁾ ศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ให้บริการตรวจคัดกรองโรคฟีนิลคีโตนูเรียใน DBS ด้วยวิธีของกัทธรี (guthrie) ซึ่งเป็นตัวอย่างของทารกแรกเกิดอายุตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป และได้รับนมแล้ว กรณีพบค่า Phe มีแนวโน้มผิดปกติ (ตั้งแต่ 4 mg/dL ขึ้นไป)

จะขอตัวอย่างใหม่เป็นชนิดซีรัม เพื่อตรวจยืนยันผลด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry) ซึ่งหากสามารถตรวจยืนยันจาก DBS ได้ จะช่วยให้แพทย์วินิจฉัยและวางแผนการดูแลรักษาทารกได้เร็วขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้นำ DBS มาสกัด DNA หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing และวิเคราะห์ความผิดปกติของยีน PAH ที่เป็นสาเหตุของโรค PKU ในทารกไทย เพื่อดูอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน PAH ซึ่งอาจนำมาใช้ออกแบบการตรวจวิเคราะห์ยีนสำหรับวินิจฉัยโรค PKU ให้มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดย้อนหลัง ในระบบสารสนเทศของห้องปฏิบัติการตรวจคัดกรอง (NNSPLims) ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2554–2564 โดยใช้เกณฑ์ผลการตรวจยืนยันค่า Phe ในซีรัมมากกว่า 2.3 mg/dL และ Phe/Tyr มากกว่า 2 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Tandem mass spectrometer (Waters, United states) จำนวน 32 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น DBS ที่เหลือจากการตรวจคัดกรองที่จัดเก็บได้ในคลังตัวอย่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±5°C และได้รับอนุญาตให้ใช้ตัวอย่างตามหลักเกณฑ์การใช้ประโยชน์จากคลังตัวอย่างกระดาษซับเลือดที่จัดเก็บได้จากกิจกรรมการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2563⁽¹³⁾

การวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลขที่ สธ 0625/EC082 รหัสโครงการวิจัยที่ 16/2564 เมื่อวันที่ 16 กันยายน 2564

เจาะ DBS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มิลลิเมตร จำนวน 6 วง เพื่อนำไปสกัด DNA ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany)⁽¹⁴⁾ ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 µL ตรวจสอบคุณภาพ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis และ/หรือวัดปริมาณด้วยเครื่อง Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific, United states) เก็บรักษาตัวอย่าง DNA ที่ -20°C จนถึงขั้นตอนการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ primers สำหรับ 13 exons ของยีน *PAH* อ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้า^(15,16) และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAH* อ้างอิง (reference sequence, Ref) ตาม GenBank: Accession no.NG008690.2 จากฐานข้อมูล NCBI (The National Center for Biotechnology Information)⁽¹⁷⁾ ดังแสดงในตารางที่ 1 เตรียมส่วนผสม PCR master mix ของ KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit (KAPA Biosystems, United states) โดยใช้ primer ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM และตัวอย่าง

DNA 10 ng ในปฏิกิริยา ปริมาตร 25 μ L ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา⁽¹⁸⁾ นำเข้าเครื่อง Thermal cycle (รุ่น ProFlex PCR System, Applied Biosystems, United states) ตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นในการทำ PCR ที่ 95°C นาน 3 นาที หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิที่ 95°C นาน 15 วินาที ที่ 60°C นาน 30 วินาที และที่ 72°C นาน 45 วินาที เมื่อครบเพิ่มที่ 72°C นาน 1 นาที และตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis

ตารางที่ 1 รายละเอียด Forward และ Reverse primers สำหรับ 13 exons ของยีน *PAH*

Primer Name	Sequence (5' to 3')	Position (Ref: NG008690.2)	Length (bp)	Tm (°C)	PCR Product size (bp)
1F	CCTCCTGCGTCAGGACAAC	46093-111	19	59.1	454
1R	AAAGCCACCGAGGACAGAT	46528-46	19	56.4	
2F	TGATCATTTAATTGCCCTGGA	50320-40	21	51.1	490
2R	TGGAAAACTGAAGCTCAGA	50790-809	20	50.9	
3F	TCTCCATTTTGTGCGTTAGG	68392-412	21	52.8	470
3R	AATCCCCCAAACAGTCTTCC	68841-61	21	54.8	
4F	CCGGTTTCTAAGGAAAATG	85687-705	19	47.8	407
4R	CCAGCCCTCGTGTAATAG	86075-93	19	52.7	
5F	GCCCCCATTCAAAGCATT	96668-85	18	53.5	233
5R	CCATCCTCAACTGGATGA	96883-900	18	50.9	
6F	TGAAATTCAGTGTAGCAAGT	107953-72	20	48.2	466
6R	TTCCTGGAGGAATCAACCTG	108399-418	20	54.2	
7F	TGGGAATTTACTTGATCCAGAT	110273-94	22	50.4	492
7R	GATGGAGCAAATCTCCAGAA	110745-64	20	51.8	
8F	GCCTTTTATGATCCCAACC	111489-507	19	50.8	383
8R	ACCACACACCCATTTCAGGT	111852-71	20	56.8	
9F	ATGGCCAAGTACTAGGTTGG	116386-405	20	54.3	223
9R	GGAAAGTTTCAAAGACCTGAGGGC	116565-88	24	58.5	
10F	TCATCCAGTCAAGGTGA	118910-26	17	49.1	297
10R	ACTGGAGAATGAGTTCCC	119189-206	18	50.9	
11F	GCATTTGGGCTGTGATGTAG	119503-22	20	54.1	462
11R	GTGTGTGCAAAGGTCAGCAT	119945-64	20	56.2	
12F	GCTGTTGAAGACCCTGCTCTA	122766-86	21	57.0	478
12R	TGGAGTGGAATCTAGGAAGG	123214-33	20	53.2	
13F	TGAGGCTGTAAGCTCCTTGAA	124048-68	21	55.8	507
13R	CTTGAATGAAGCAGGTCCC	124536-54	19	53.5	

หมายเหตุ: Tm = melting temperature, F = Forward primer, R = Reverse primer

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermofisher, United states)⁽¹⁹⁾ จากนั้นทำ sequencing reaction ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermofisher, United states)⁽²⁰⁾ โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 96°C นาน 1 นาที ที่ 96°C นาน 10 วินาที ที่ 50°C นาน 5 วินาที และที่ 60°C นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนที่ระบุในเอกสารกำกับชุดน้ำยา D-Pure dye terminator removal kit (NIMAGEN, Netherlands)⁽²¹⁾ ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ปริมาตร 15 µL ใส่ในเพลทวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ 3500XL genetic analyzer (Applied Biosystems, United states) ประมวลผลเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้กับยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no.NG008690.2 ด้วยโปรแกรม SeqScape version 3.0 (Applied Biosystems, United states) นำเสนอข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา แสดงความถี่ของรูปแบบการกลายพันธุ์เป็นจำนวนและร้อยละที่ตรวจพบ โดยแต่ละตัวอย่างแสดงผลการตรวจยืนยันค่า Phe ในซีรัม (mg/dL) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบและค่า Phe ในซีรัม (mg/dL)

ผล

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ของ DNA ที่สกัดจาก DBS พบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 13 exons ของยีน *PAH* มีขนาดตามต้องการ ดังแสดงในภาพที่ 1

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 13 exons ของยีน *PAH* ที่ได้จาก 32 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no.NG008690.2 พบทุกตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ 2–5 ตำแหน่ง โดยมีนิวคลีโอไทด์แตกต่างไปจากยีน *PAH* อ้างอิง 17 รูปแบบ ซึ่งเป็นแบบเปลี่ยนรหัสเบสหนึ่งตำแหน่งทั้งชนิด homozygous mutation และ heterozygous mutation แบ่งเป็นหลังแปลรหัสแล้วเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนตัวใหม่ (missense mutation) 13 รูปแบบ ซึ่งพบใน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.1) ได้กรดอะมิโนตัวเดิม (silence mutation) 3 รูปแบบ พบในทุกตัวอย่าง (ร้อยละ 100) และแบบที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน (transcriptional mutation) 1 รูปแบบ ที่อยู่บริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory element) พบใน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.0) เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกลายพันธุ์และค่าความเข้มข้น Phe ในซีรัมของแต่ละตัวอย่างจากมากไปน้อย พบการกลายพันธุ์แบบ missense เฉพาะตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้น Phe ในซีรัมตั้งแต่ 5.7 mg/dL ขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 ผลลัพธ์ PCR ทั้ง 13 exons ของยีน *PAH* โดยใช้ DNA ที่สกัดจากตัวอย่าง DBS

Lane 1 – DNA Marker 1 kb ladder

Lane 3 – PCR Product Exon-2 (490 bp)

Lane 5 – PCR Product Exon-4 (407 bp)

Lane 7 – PCR Product Exon-6 (466 bp)

Lane 9 – PCR Product Exon-8 (383 bp)

Lane 11 – PCR Product Exon-10 (297 bp)

Lane 13 – PCR Product Exon-12 (478 bp)

Lane 2 – PCR Product Exon-1 (454 bp)

Lane 4 – PCR Product Exon-3 (470 bp)

Lane 6 – PCR Product Exon-5 (233 bp)

Lane 8 – PCR Product Exon-7 (492 bp)

Lane 10 – PCR Product Exon-9 (223 bp)

Lane 12 – PCR Product Exon-11 (462 bp)

Lane 14 – PCR Product Exon-13 (507 bp)

ตารางที่ 2 ค่า Phe (เรียงจากมากไปน้อย) ค่า Phe/Tyr Ratio และข้อมูลการกลายพันธุ์ 17 รูปแบบ ที่ตรวจพบใน 32 ตัวอย่าง

Sample No.	Phe (mg/dL)	Phe/Tyr Ratio	Transcript		Missense																	Silence		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					
			Exon1	Exon2	Exon5	Exon5	Exon5	Exon6	Exon6	Exon6	Exon6	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon12	Exon12	Exon12	Exon6	Exon7	Exon11		
			c.(-71)A>C (Regulatory)	c.143T>C (p.Leu48Ser)	c.473G>A (p.Arg158Gln)	c.493G>C (p.Ala165Pro)	c.506G>T (p.Arg169Leu)	c.561G>C (p.Trp187Cys)	c.611A>G (p.Tyr204Cys)	c.674C>T (p.Pro225Leu)	c.728G>A (p.Arg243Gln)	c.754C>T (p.Arg252Trp)	c.809G>A (p.Arg270Lys)	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.1222C>T (p.Arg408Trp)	c.1223G>A (p.Arg408Gln)	c.696A>G (p.Gln232Gln)	c.735G>A (p.Val245Val)	c.1155C>G (p.Leu385Leu)					
1	53.1	31.4	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	hetero					
2	50.5	37.4	-	hetero	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	hetero	hetero	hetero					
3	48.0	33.5	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	homo	homo					
4	48.0	22.9	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	homo	homo	homo					
5	48.0	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	homo	homo	homo					
6	40.7	21.8	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	homo	hetero	homo					
7	40.2	16.4	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	hetero	homo					
8	35.4	17.7	homo	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	homo	-	-					
9	35.2	30.0	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	hetero	hetero	homo					
10	34.5	35.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	homo	homo					
11	32.8	26.9	-	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	hetero	hetero	homo					
12	22.8	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	homo	homo					
13	22.2	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	homo	homo	homo	hetero					
14	13.8	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	hetero	hetero					
15	12.3	5.8	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	-	-	hetero	-	-	-	-	homo					
16	12.3	1.5	-	-	-	-	homo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo					
17	12.1	7.3	-	hetero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	homo	homo	homo					

ตารางที่ 2 ค่า Phe (เรียงจากมากไปน้อย) ค่า Phe/Tyr Ratio และข้อมูลการกลายพันธุ์ 17 รูปแบบ ที่ตรวจพบใน 32 ตัวอย่าง (ต่อ)

Sample No.	Phe (mg/dL)	Phe/Tyr Ratio	Transcript		Missense																	Silence																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Exon1	Exon2	Exon5	Exon5	Exon5	Exon6	Exon6	Exon6	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7	Exon7

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PAH* ในทารกไทยที่สงสัยเป็นโรค PKU จำนวน 32 ราย เปรียบเทียบกับยีน *PAH* อ้างอิงตาม GenBank: Accession no. NG008690.2 ในฐานข้อมูล NCBI พบการกลายพันธุ์ในทุกตัวอย่าง 2–5 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 17 รูปแบบ โดยทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ในฐานข้อมูล *PAH*vd⁽²²⁾ ซึ่งตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *PAH* ที่พบมีดังนี้

ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ (> ร้อยละ 80) ได้แก่ c.696A>G (p.Gln232Gln) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 28 ราย (ร้อยละ 87.5) c.735G>A (p.Val245Val) ของเอ็กซอน 7 พบจำนวน 26 ราย (ร้อยละ 81.2) และตำแหน่ง c.1155C>G (p.Leu385Leu) ของเอ็กซอน 11 พบจำนวน 31 ราย (ร้อยละ 96.9) โดยทั้ง 3 ตำแหน่ง เป็นการกลายพันธุ์แบบ silence จึงไม่ใช้การกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ในมณฑลซานซีของประเทศจีน ในปี พ.ศ. 2555 มีรายงานการถูกตรวจพบความผิดปกตินี้ทั้งในเด็กป่วยที่เป็นโรค PKU และเด็กสุขภาพดี⁽²³⁾

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.(-71)A>C ของเอ็กซอน 1 พบจำนวน 8 ราย (ร้อยละ 25.0) โดย 5 รายที่ไม่พบการกลายพันธุ์ร่วมชนิด missense mutation จะมีค่า Phe ในช่วง 2.4–3.5 mg/dL และ 2 รายซึ่งพบการกลายพันธุ์ร่วมชนิด missense mutation มีค่า Phe สูง (35.4 และ 53.1 mg/dL) อย่างไรก็ตามมี 1 รายที่ไม่พบการกลายพันธุ์ร่วมชนิด missense mutation แต่กลับมีค่า Phe สูงถึง 53.1 mg/dL เนื่องจากการกลายพันธุ์นี้อยู่ที่ตำแหน่ง 71 เบส ก่อนถึง start codon ซึ่งเป็นบริเวณ upstream ที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อการเข้าจับของ DNA-binding protein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory element) จึงอาจยับยั้งหรือกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ mRNA (transcription) ที่ผิดปกติได้⁽²⁴⁾

ตำแหน่ง c.143T>C (p.Leu48Ser) ของเอ็กซอน 2 พบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 6.2) มีค่า Phe 12.1 และ 50.5 mg/dL มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ปี พ.ศ. 2551 ในคนเกาหลีที่เป็นโรค PKU ชนิดรุนแรง⁽⁸⁾

ปี พ.ศ. 2558 พบในคนอิหร่านที่ป่วยเป็นโรค PKU 1 ราย (ร้อยละ 2.6)⁽¹⁶⁾ และปี พ.ศ. 2559 พบในคนโรมาเนียที่ป่วยเป็นโรค PKU 14 ราย (ร้อยละ 17.3) ที่มีผลการตรวจคัดกรองค่า Phe ตั้งแต่ 4–32 mg/dL⁽²⁵⁾

ตำแหน่ง c.473G>A (p.Arg158Gln) ของเอ็กซอน 5 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 35.2 mg/dL ปี พ.ศ. 2555 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนไซปรัสที่เป็นโรค PKU 1 ราย (ร้อยละ 8.3) โดยมีค่าพลาสมา Phe 5.6 mg/dL และวินิจฉัยว่าเป็นโรค PKU ชนิดไม่รุนแรง⁽²⁶⁾

ตำแหน่ง c.493 G>C (p.Ala165Pro) ของเอ็กซอน 5 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 48.0 mg/dL ปี พ.ศ. 2559 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนฝรั่งเศสที่เป็นโรค PKU แต่ไม่สามารถอธิบายการกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากพบผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการให้ BH₄ ร้อยละ 30–40⁽²⁷⁾

ตำแหน่ง c.506G>T (p.Arg169Leu) ของเอ็กซอน 5 พบจำนวน 6 ราย (ร้อยละ 18.8) ที่มีค่า Phe 5.7–12.3 mg/dL ปี พ.ศ. 2564 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนไทยที่ป่วยเป็นโรค PKU จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 38.5) โดยเป็นแบบไม่รุนแรง⁽¹²⁾

ตำแหน่ง c.561 G>C (p.Trp187Cys) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 40.2 mg/dL ปี พ.ศ. 2565 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนเปรูและสเปนที่ป่วยเป็นโรค PKU ซึ่งวินิจฉัยว่าเป็นโรค PKU ชนิดรุนแรง⁽²⁸⁾

ตำแหน่ง c.611A>G (p.Tyr204Cys) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 11.3 mg/dL มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วย PKU ของคนไทย โดยปี พ.ศ. 2564 พบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 15.4) ที่มีอาการรุนแรง⁽¹²⁾ และปี พ.ศ. 2560 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 25.0)⁽¹¹⁾ ปี พ.ศ. 2551 พบในคนเกาหลีที่เป็น PKU ชนิดรุนแรงจำนวน 3 ราย (ร้อยละ 9.1)⁽⁸⁾ และปี พ.ศ. 2534 พบในคนจีนและคนญี่ปุ่น คิดเป็นร้อยละ 13 และร้อยละ 5 ของคนเอเชียตะวันออกที่เป็นโรค PKU ตามลำดับ เมื่อนำยีนที่มีการกลายพันธุ์นี้มาสังเคราะห์โปรตีน พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเอนไซม์ *PAH* ปกติ แต่การกลายพันธุ์นี้

เกิดเฉพาะโครโมโซมของคนเป็นโรค PKU จึงเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจคัดกรองผู้ที่เป็พาทะของโรค PKU⁽²⁹⁾

ตำแหน่ง c.674 C>T (p.Pro225Leu) ของเอ็กซอน 6 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 32.8 mg/dL ปี พ.ศ. 2554 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนญี่ปุ่นที่เป็นโรค PKU โดยตำแหน่งนี้เป็น 1 ใน 22 ตำแหน่งที่ถูกพบว่าเป็นการกลายพันธุ์รูปแบบใหม่⁽³⁰⁾

ตำแหน่ง c.728G>A (p.Arg243Gln) ของเอ็กซอน 7 พบจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 12.5) ที่มีค่า Phe 22.2, 35.4 และ 48.0 mg/dL ปี พ.ศ. 2551 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนเกาหลีที่เป็นโรค PKU ชนิดรุนแรงจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 12.1)⁽⁸⁾ และปี พ.ศ. 2534 พบในคนจีน คิดเป็นร้อยละ 18 ของคนเอเชียตะวันออกที่เป็นโรค PKU เมื่อนำยีนที่มีการกลายพันธุ์นี้มาสังเคราะห์โปรตีน พบว่ามีประสิทธิภาพน้อยกว่าร้อยละ 10 ของเอนไซม์ PAH ปกติ และถ้าเป็นกลายพันธุ์แบบ homozygous mutation ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรง⁽²⁹⁾

ตำแหน่ง c.754C>T (p.Arg252Trp) ตำแหน่ง c.842C>T (p.Pro281Leu) ของเอ็กซอน 7 และตำแหน่ง c.1222C>T (p.Arg408Trp) ของเอ็กซอน 12 โดยพบตำแหน่งละ 1 ราย (ร้อยละ 3.1) โดยมีค่า Phe 40.7, 12.3 และ 35.2 mg/dL ตามลำดับ ปี พ.ศ. 2559 มีรายงานพบการกลายพันธุ์ 3 แบบนี้ในคนโรมาเนียที่ป่วยเป็นโรค PKU โดยพบ 1 ราย (ร้อยละ 1.2) 11 ราย (ร้อยละ 13.6) และ 45 ราย (ร้อยละ 55.6) ตามลำดับ⁽²⁵⁾ และปี พ.ศ. 2564 พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง c.842 C>T ในคนไทยที่ป่วยเป็นโรค PKU จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 7.7) โดยเป็นแบบไม่รุนแรง⁽¹²⁾

ตำแหน่ง c.809 G>A (p.Arg270Lys) ของเอ็กซอน 7 พบจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.1) ที่มีค่า Phe 50.5 mg/dL ปี พ.ศ. 2565 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนสเปนที่ป่วยเป็นโรค PKU ซึ่งวินิจฉัยเป็นโรค PKU ชนิดไม่รุนแรง⁽²⁸⁾

ตำแหน่ง c.1223G>A (p.Arg408Gln) ของเอ็กซอน 12 พบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 6.2) ที่มีค่า Phe 7.2 และ 22.2 mg/dL ปี พ.ศ. 2564 มีรายงานพบการกลายพันธุ์นี้ในคนไทยที่ป่วยเป็นโรค PKU จำนวน

4 ราย (ร้อยละ 30.8) โดยเป็นแบบไม่รุนแรงจนถึงแบบปานกลาง⁽¹²⁾

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการกลายพันธุ์และค่าความเข้มข้นของ Phe พบว่ารายที่มีค่าความเข้มข้นของ Phe ในซีรัมมากกว่า 5 mg/dL ขึ้นไป จะมีการกลายพันธุ์แบบ missense mutation ซึ่งกรดอะมิโนเปลี่ยนไปมีผลทำให้เอนไซม์ PAH ที่สร้างขึ้นมีรูปร่างและการทำงานผิดปกติ⁽⁹⁾ จึงไม่สามารถย่อยกรดอะมิโน Phe ได้ ทำให้มีปัญหาการคั่งของ Phe ในเลือด ทั้งนี้ในทุกตัวอย่างยังพบการกลายพันธุ์ 2-5 ตำแหน่ง ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งในแง่ส่งเสริมหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PAH ได้

ข้อจำกัดในการศึกษานี้ คือ ไม่สามารถติดตามข้อมูลระดับอาการป่วยของโรค PKU ในทารกกลุ่มศึกษา ทำให้ไม่สามารถเชื่อมโยงการกลายพันธุ์กับความรุนแรงของโรคได้ นอกจากนี้การทำ DNA sequencing จากผลิตภัณฑ์ PCR 13 exons ที่ได้จากการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเพียงร้อยละ 6.64 ของความยาวยีน *PAH* ทั้งหมด (5,332 ใน 80,356 นิวคลีโอไทด์) และไม่ครอบคลุมส่วน promoter ของยีนที่ตำแหน่ง 47079-138 (Ref: NG008690.2)⁽³¹⁾ และส่วน splicing site ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ไม่พบการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับค่า Phe และ Phe/Tyr ratio ในตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่มีค่า Phe มากกว่า 10 mg/dL (ตัวอย่างที่ 1, 10, 12, 14 และ 19) บางรายพบเพียงการกลายพันธุ์แบบ silence หรือ transcriptional element mutation เท่านั้น การศึกษาเพิ่มเติมให้ครอบคลุมทั้งยีน โดยนำเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสสมัยใหม่ (next generation sequencing, NGS) มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งยีน *PAH* และนำการกลายพันธุ์ที่พบมาศึกษาการแสดงออกของยีน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ PAH ที่ได้จากการกลายพันธุ์กับเอนไซม์ปกติ ทั้งนี้ควรศึกษา DNA sequencing เพิ่มเติมในทารกที่มีค่า Phe และ Phe/Tyr ratio ปกติ เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมการพบการกลายพันธุ์ของยีน *PAH* ของทารกที่สงสัยเป็นโรค PKU ด้วย

สรุป

DNA ที่สกัดจากกระดาศับเลือดที่เหลือจากการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดของตัวอย่างที่สงสัยเป็นโรค PKU จากเกณฑ์ค่า Phe ในซีรัมมากกว่า 2.3 mg/dL และอัตราส่วนของ Phe ต่อ Tyr มากกว่า 2 จำนวน 32 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มขยายยีน *PAH* ได้ทั้ง 13 exons เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing และวิเคราะห์การกลายพันธุ์เทียบกับลำดับเบสในยีน *PAH* อ้างอิง พบทุกตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ 2–5 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 17 รูปแบบ ซึ่งเป็นแบบเปลี่ยนรหัสเบสหนึ่งตำแหน่ง หลังแปลรหัสแล้วเป็น missense mutation 13 รูปแบบ silence mutation 3 รูปแบบ และ transcriptional mutation บริเวณ regulatory element ของยีน 1 รูปแบบ ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบมีระบุในฐานข้อมูล *PAH*vdb แล้ว การกลายพันธุ์ชนิดเปลี่ยนกรดอะมิโนพบใน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 53.12) และมีผลตรวจวิเคราะห์ Phe ในซีรัมตั้งแต่ 5 mg/dL ขึ้นไป งานวิจัยนี้จึงไม่พบการกลายพันธุ์แบบใหม่ อาจเนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนตัวอย่าง ($n = 32$) และเทคนิคการหาลำดับเบสด้วย Sanger sequencing ที่ยังไม่ครอบคลุมการกลายพันธุ์ทั้งหมดของยีน *PAH* การนำเทคโนโลยี NGS มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนเอ็กโซม (exome sequencing) หรือเฉพาะยีนเป้าหมาย (targeted sequencing) อาจช่วยให้การวินิจฉัยโรค PKU มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์การแพทย์จีโนมิกส์ที่ให้ออกุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และชุดน้ำยาต่างๆ ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้งบประมาณในการทำวิจัย และขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ผู้อำนวยการศูนย์ปฏิบัติการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่เป็นแรงผลักดันและให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขนิพนธ์ต้นฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev 2008; 29(1): 31–41.
- Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. J Inherit Metab Dis 2007; 30(4): 430–8.
- Pangkanon S, Charoensiriwatana W, Janejai N, Boonwanich W, Chaisomchit S. Detection of phenylketonuria by the newborn screening program in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40(3): 525–9.
- Diamond A. Phenylalanine levels of 6–10 mg/dl may not be as benign as once thought. Acta Paediatr Suppl 1994; 407: 89–91.
- Nelwan ML. Phenylketonuria: Genes in phenylketonuria, diagnosis, and treatments. Afr J Bio Sc 2020; 2(1): 1–8.
- Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. Genet Med 2011; 13(8): 697–707.
- Hoang L, Byck S, Prevost L, Scriver CR. PAH mutation analysis consortium database: a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus. Nucleic Acids Res 1996; 24(1): 127–31.
- Lee YW, Lee DH, Kim ND, Lee ST, Ahn JY, Choi TY, et al. Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. Exp Mol Med 2008; 40(5): 533–40.
- วรทัย ไหมศรีขาว. การตรวจกรองการกลายพันธุ์และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน COMT ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม [วิทยานิพนธ์]. สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ, คณะวิทยาศาสตร์. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2553; หน้า 10.

10. Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Qian Y, Zhang K. Sanger sequencing principles, history, and landmarks. In: Next generation sequencing technologies in medical genetics. New York: Springer; 2013. p. 3-11.
11. Chaiyasap P, Ittiwut C, Srichomthong C, Sangsin A, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Massive parallel sequencing as a new diagnostic approach for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficiency in Thailand. BMC Med Genet 2017; 18: 102. (6 pages).
12. Ngiwsara L, Vatanavicharn N, Sawangareetrakul P, Liammongkolkul S, Ratanarak P, Boonyawat B, et al. Molecular characterization of Thai patients with phenylalanine hydroxylase deficiency and in vitro functional study of two novel PAH variants. Mol Biol Rep 2021; 48(3): 2063-70.
13. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง หลักเกณฑ์การใช้ประโยชน์จากคลังตัวอย่างกระดาศับเลือดที่จัดเก็บได้ตามกิจกรรมการตรวจคัดกรองสุขภาพทารกแรกเกิดแห่งชาติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พ.ศ. 2563. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 69 ง (วันที่ 26 มีนาคม 2564). หน้า 17.
14. QIAamp DNA blood mini kit – QIAGEN. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 26]; [10 screens]. Available from: URL: <https://www.qiagen.com/us/landing-pages/microbiome-rna-research-workflow/sample-disruption/qiaamp-dna-blood-mini-kit>.
15. Vilarinho L, Esteves S, Ramos E, Amorim A, Azevedo L. PAH mutational spectrum: still expanding. Open J Genet 2011; 1(2): 9-12.
16. Biglari A, Saffari F, Rashvand Z, Alizadeh S, Najafipour R, Sahmani M. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in Iranian patients with phenylketonuria. Springerplus. 2015; 4: 542. (5 pages).
17. National Library of Medicine. Homo sapiens phenylalanine hydroxylase (PAH), RefSeqGene on chromosome 12. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 26]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_008690.2.
18. Kapa Biosystems. KAPA2G fast multiplex PCR kit. [online]. 2016; [cited 2022 Sep 26]; [4 screens]. Available from: URL: <https://www.n-genetics.com/products/1104/1023/12664.pdf>.
19. Thermo Fisher Scientific. ExoSAP-IT™ PCR product cleanup reagent. [online]. 2017; [cited 2022 Sep 26]; [2 screens]. Available from: URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F78200b.pdf>.
20. Applied Biosystems. BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit. [online]. 2010; [cited 2022 Sep 26]; [72 screens]. Available from: URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf.
21. NimaGen BV. D-Pure™ Dye Terminator removal kit. [online]. 2018; [cited 2022 Sep 26]; [4 screens]. Available from: URL: https://www.nimagen.com/gfx/brands/D-Pure/D-pure_protocol%20v2.pdf.
22. BIOPKUdb: database of patients and genotypes causing HPA/PKU. [online]. 2022; [cited 2022 Sep 26]. Available from: URL: <http://www.biopku.org/home/biopku.asp>.
23. Zhou YA, Ma YX, Zhang QB, Gao WH, Liu JP, Yang JP, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi, China. Genet Mol Biol 2012; 35(4): 709-13.
24. กวี สุจิตฺติ. บทที่ 8 การควบคุมการแสดงออกของยีน. ใน: พันธุศาสตร์โมเลกุลเบื้องต้น. [online]. 2547; [สืบค้น 11 ต.ค. 2565]; [34 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://conf.agi.nu.ac.th/webnewasp/ereading/gene/unit8.pdf>.

25. Gemperle-Britschgi C, Iorgulescu D, Mager MA, Anton-Paduraru D, Vulturar R, Thöny B. A novel common large genomic deletion and two new missense mutations identified in the Romanian phenylketonuria population. *Gene* 2016; 576(1): 182-8.
26. Georgiou T, Ho G, Vogazianos M, Dionysiou M, Nicolaou A, Chappa G, et al. The spectrum of mutations identified in Cypriot patients with phenylalanine hydroxylase deficiency detected through neonatal screening. *Clin Biochem* 2012; 45(7-8): 588-92.
27. Jeannesson-Thivisol E, Feillet F, Chéry C, Perrin P, Battaglia-Hsu SF, Herbeth B, et al. Genotype-phenotype associations in French patients with phenylketonuria and importance of genotype for full assessment of tetrahydrobiopterin responsiveness. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10: 158. (22 pages).
28. Martín-Rivada Á, Palomino Pérez L, Ruiz-Sala P, Navarrete R, Cambra Conejero A, Quijada Fraile P, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism within the expanded newborn screening in the Madrid region. *JIMD Rep* 2022; 63(2): 146-61.
29. Wang T, Okano Y, Eisensmith RC, Lo WH, Huang SZ, Zeng YT, et al. Missense mutations prevalent in Orientals with phenylketonuria: molecular characterization and clinical implications. *Genomics* 1991; 10(2): 449-56.
30. Okano Y, Kudo S, Nishi Y, Sakaguchi T, Aso K. Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan. *J Hum Genet* 2011; 56(4): 306-12.
31. Eukaryotic Promoter Database - PAH_1 viewer [online]. 2019; [cited 2022 Oct 7]; [2 screens]. Available from: URL: https://epd.epfl.ch/cgi-bin/get_doc?db=hgEpdNew&format=genome&entry=PAH_1.

Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Thai Neonates with Suspected Phenylketonuria

Rotjanapan Pankanjanato,¹ Pawinee Innark,¹ Maliwan Numnuan,¹ Thirayut Sombun,¹ Supaporn Nammoonnoy,¹ Nuanjun Wichukchinda,² Hansa Thaisri,¹ and Surakameth Mahasirimongkol¹

¹Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Phenylketonuria (PKU) is a rare genetic disease caused by mutations of the phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene. This gene produces an enzyme, which metabolizes phenylalanine (Phe) into tyrosine (Tyr). Accumulation of Phe in the body leads to brain damage and mental retardation. To study *PAH* mutation in PKU-suspected Thai neonates, DNA extraction and sequencing were performed using leftover dried blood spot samples from the routine work of The Neonatal Screening Operating Centre. We selected 32 DBS which had confirmed Phe in serum > 2.3 mg/dL and Phe/Tyr ratio > 2 (n = 32). The sequencing results showed all samples had 2–5 point mutations. From the total of 17 mutation types; 13 were missense mutations, 3 were silence mutations and 1 was a mutation at regulatory element. Especially, missense mutations were found in 17 samples (53.12%) with Phe in serum > 5 mg/dL. Due to the limitation of Sanger sequencing and many point mutations found, Next Generation Sequencing (NGS) may be used for targeted gene sequencing to diagnose PKU effectively.

Keyword: Mutations, Phenylalanine hydroxylase gene, Phenylketonuria, Thai neonates