การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *p63* ในผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่
ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย

นางสาวเพชรรัตน์ เลยกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2037-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATIONAL ANALYSIS OF THE *p63* GENE IN PATIENTS WITH NONSYNDROMIC CLEFT LIP WITH OR WITHOUT PALATE

Miss Petcharat Leoyklang

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2037-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *p63* ในผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย
โดย	นางสาวเพชรรัตน์ เลยกลาง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์อิศรางค์ นุชประยูร)

.... กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์พิชิต ศิริวรรณ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพชรรัตน์ เลยกลาง : การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน p63 ในผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย (MUTATIONAL ANALYSIS OF THE *p63* GENE IN PATIENTS WITH NONSYNDROMIC CLEFT LIP WITH OR WITHOUT PALATE) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 57 หน้า ISBN 974-53-2037-4

โรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย (nonsyndromic cleft lip with or with our cleft palate, CL/P) เป็นความพิการแต่กำเนิดที่เกิดขึ้นของกะโหลกศีรษะ และใบหน้า ที่พบได้บ่อยที่สุด ทั้งนี้โรคนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีนที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่มี CL/P เป็นลักษณะร่วมด้วยลักษณะหนึ่ง (syndromic CL/P) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ยีน *p63* สัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายโรคที่มี CL/P ร่วมด้วย การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อหาว่าการกลายพันธุ์ของยีน *p63* เป็นสาเหตุของปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วยหรือไม่ โดยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย 100 คน ด้วยวิธีการหาลำเบส (sequencing) ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีน *p63* พบการเปลี่ยนลำดับเบสทั้งหมด 22 ตำแหน่ง เป็นเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโน (nonsynonymous variant) 3 ตำแหน่ง คือ S90L, R313G และ D564H ซึ่งอยู่ใน exon 4, 8 และ 14 ตามลำดับ โดย R313G น่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลให้เกิดโรค (pathogenic variant) จากหลักฐาน ดังนี้ 1. กลุ่มของกรดอะมิโน เปลี่ยนจากอาร์จีนีนเป็นไกลซีน 2.การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่พบในบิดามารดา (*de novo*) 3. ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งนี้ในคนไทยปกติ 500 คน 4. การเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ใน DNA bindnig domain 5. กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 313 นี้เป็นอาร์จีนีน ทั้งใน zebrafish, African clawed frog, chicken, house mouse และ Norway rat 6. โปรแกรม PolyPhen บ่งว่า R313G น่าจะส่งผลให้โปรตีนทำงานผิดปกติ จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ในยีน *p63* สามารถทำให้เกิด CL/P ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย และเน้นให้เห็นถึงการแสดงออกของลักษณะทางคลินิกที่หลากหลายและอาจส่งผลถึงการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์กับผู้ป่วยและครอบครัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต......เพชรรัตน์ เลยกลาง......
ปีการศึกษา 2548	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา......[signature]......

467 47544 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS: Oral cleft CL/P Mutation analysis *p63*

PETCHARAT LEOYKLANG: MUTATIONAL ANALYSIS OF THE *p63* GENE IN PATIENTS WITH NONSYNDROMIC CLEFT LIP WITH OR WITHOUT PALATE THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.VORASUK SHOTELERSUK, M.D., 57 pp. ISBN 974-53-2037-4

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is the most common birth defects of craniofacial anomalies worldwide with complex etiology. Nonsyndromic CL/P can be caused by mutation in genes responsible for monogenic disorders. Mutations in the *p63* gene underlie several monogenic malformation syndromes manifesting cleft lip with or without cleft palate. We investigated whether *p63* mutations also result in non-syndromic CL/P. Specifically, we performed mutation analysis of the 16 exons of the *p63* gene for 100 Thai patients with non-syndromic CL/P. A total of 22 variant sites were identified. All were single nucleotide changes, with six in coding regions, including three non-synonymous changes, S90L, R313G and D564H. The R313G was concluded to be pathogenic on the basis of its amino acid change, evolutionary conservation, its occurrence in functionally important domain, its predicted damaging function, its *de novo* occurrence, and its absence in 500 control individuals. Our data indicate, for the first time, a causative role of a mutation in *p63* in non-syndromic CL/P, highlighting the wide phenotypic spectrum and the genetic counseling implications of *p63* mutations.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Medical Science   Student's signature Petcharat Leoyklang

Academic year 2005   Advisor's signature Vorasuk Shotelersuk

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำสั่งสอนอย่างดียิ่งจากรองศาสจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา จึงกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่กรุณาให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการวิทยานิพนธ์และให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องห้องปฏิบัติการในการวิจัย เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ อีกทั้งคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์อิศรางค์ นุชประยูร และอาจารย์ นายแพทย์พิชิต ที่กรุณาให้เกียรติมาเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณศิรประภา ทองกอบเพชร คุณทิวารัตน์ สินธุวิวัตน์ คุณเฉลิมพล ศรีจอมทอง คุณวานี เปล่งพานิช คุณจุรีรัตน์ โพธิ์แก้วและพี่ๆน้องๆ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆในการทำการวิจัย

ขอขอบคุณ ทุกคนในห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ และศาสตราจารย์ นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์ในการทำวิจัย และทุกคนที่ให้กำลังใจเสมอมา

และกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติทุกคน ที่เป็นกำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนและส่งเสริม จนประสบความสำเร็จ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฌ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3. วิธีดำเนินการวิจัย	13
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	24
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	33
รายการอ้างอิง	38
ภาคผนวก	42
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงผลการศึกษาการกลายพันธุ์โดย SSCP analysis และ directed sequence ในชาว Iowa white 31 ราย และชาวฟิลิปปินส์ 31 ราย... 8

2 แสดงขนาดของแต่ละ domain.. 11

3 แสดงขนาดของโปรตีนแต่ละแบบ(isotype)ของยีน *p63* 11

4 คุณสมบัติและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย.. 13

5 primers สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละ exons 20

6 ปริมาณของสารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ... 21

7 อุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ... 22

8 เอนไซม์ตัดจำเพาะ และชนิดและเปอร์เซ็นต์ของ gel ………………………………… 23

9 ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ ……………………………………………………….. 24

10 สรุปการพิสูจน์การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อการเกิดโรค(Pathogenic mutation)…………………………………………………………………………… 36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูป		หน้า
1	แสดงลักษณะทางคลินิกที่หลากหลายของโรคปากแหว่งเพดานโหว่.......................	1
2	การพัฒนาของริมฝีปากบนและเพดานแข็ง...…………………………..................	6
3	การพัฒนาของเพดานอ่อน..	6
4	โครงสร้างของโปรตีนแต่ละแบบของยีน*p63*…………..…………………………	10
5	Chromatogram ของ non-synonymous ทั้ง 3 ตำแหน่ง…................................	25
6	แสดงผล Restriction enzyme digestion…………………………………………..	26
7	แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในมนุษย์กับสิ่งมีชีวิตอื่น...........................	27
8	แสดงโปรแกรม PolyPhen..	30
9	แสดงผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีน *tp63* ที่ตำแหน่ง S90L.............................	31
10	แสดงผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีน *tp63* ที่ตำแหน่ง R313G..........................	31
11	แสดงผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีน *tp63* ที่ตำแหน่ง D564H…………………	32
12	แสดงคนไข้ปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วยที่มีการ เปลี่ยนแปลง ตำแหน่ง S90L R313G D564H…………………………………………………	37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CL/P	=	Cleft lip with or without cleft palate
CL	=	Cleft lip
CPO	=	Cleft palate only
p63	=	protein 63 kDa

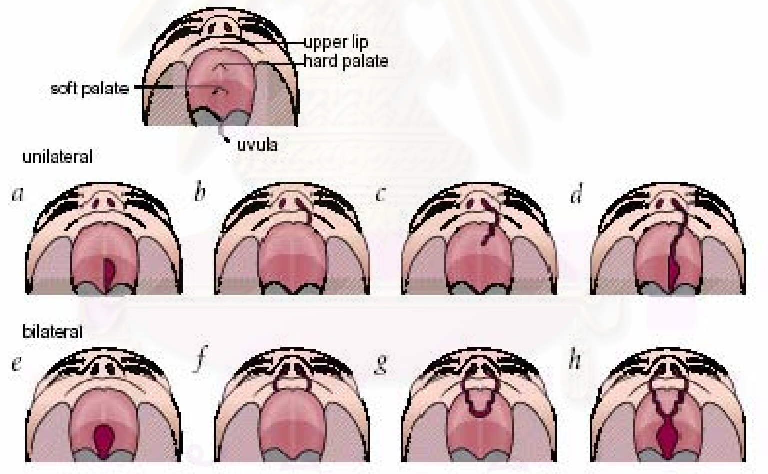
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Orofacial clefts เป็นความพิการแต่กำเนิดของศีรษะและใบหน้าที่พบได้บ่อยที่สุด ลักษณะที่ปรากฏคือ มีรอยโหว่ที่บริเวณริมฝีปากด้านบนและจมูก ความผิดปกติที่เกิดขึ้นส่งผลต่อการหายใจ การทานอาหาร การพูด การได้ยิน การพัฒนาทางด้านจิตใจ (1) ลักษณะทางคลินิกที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยจะมีความรุนแรงแตกต่างกันไป ตั้งแต่การโหว่ของริมฝีปากบนและ/หรือเพดานโหว่เพียงด้านเดียว (unilateral) ไปจนถึงโหว่ทั้งสองด้าน(bilateral) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางคลินิกที่หลากหลายของโรคปากแหว่งเพดานโหว่ รูปแถวบนสุดแสดงลักษณะปกติของริมฝีปากบนและเพดานปาก a-d แสดงลักษณะการโหว่ของริมฝีปากบนและ/หรือเพดานโหว่เพียงด้านเดียว (unilateral) e-h แสดงลักษณะการโหว่ของริมฝีปากบนและ/หรือเพดานโหว่ทั้งสองด้าน (bilateral)

Orofacial clefts แบ่งออกได้เป็น Cleft lip and/or palate (CL/P) โดยผู้ป่วย CL ประมาณ 50% จะมี CP ร่วมด้วย ลักษณะที่เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดปกติในการพัฒนาของเพดานปากและจมูกในช่วงที่เป็น embryoและ Cleft palate only (CPO) (2-5) โดย CL/P และ CPO แบ่งออกเป็น nonsyndromic และ syndromic โดย nonsyndromic จะแสดงลักษณะเฉพาะ CL/P หรือ CPO เท่านั้น จะไม่แสดงลักษณะอาการอื่นร่วมด้วย ซึ่ง nonsyndromic CL/P คิดเป็น 70 %ของ CL/P ทั้งหมด และ nonsyndromic CPO คิดเป็น 50% (6) ของ CPO ทั้งหมด ส่วน syndromic จะแสดงลักษณะ CL/P และมีอาการอื่นร่วมด้วย ซึ่งแบ่งออกเป็น.1.chromosomal syndromes 2. Mendelian disorders 3. teratogens และ 4.uncategorized syndromes.

Orofacial cleft มีอุบัติการณ์การเกิด 1/300 -1/ 2500 ของเด็กแรกเกิด (1) ขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่ วัฒนธรรม สถานะทางเศรษฐกิจและสังคม พบว่า Asian มีความถี่การเกิดปากแหว่งเพดานโหว่สูงสุด คือ 1/500 พบปานกลางใน Caucasian คือ 1/1000 และ African จะพบน้อยสุด คือ 1/2500 (7, 8) สำหรับประเทศไทยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่สูงถึง 1/600 (9) จากการศึกษามนุษยพันธุศาสตร์ CL/P จัดเป็นโรคที่เป็น complex trait หรือ multifactorial คือ มีปัจจัยทั้งทางสิ่งแวดล้อม และพันธุกรรม (7, 10)

จากอัตราการเกิดโรค CL/P ที่ค่อนข้างสูง และความผิดปกติที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของผู้ป่วย นอกจากนี้ในการรักษาผู้ป่วย CL/P ยังยุ่งยากและซับซ้อนมาก ในคนไข้บางรายจะได้รับการผ่าตัด 1 ครั้ง แต่บางรายจะต้องผ่าตัดมากกว่า 1 ครั้ง และในการรักษายังต้องการแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางหลายด้าน เช่น ศัลยแพทย์ วิสัญญีแพทย์ กุมารแพทย์ ทันตแพทย์ จิตแพทย์ รวมถึงอรรถบำบัด แต่อย่างไรก็ตาม แม้คนไข้จะได้รับการผ่าตัดแล้วก็ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการได้ยิน การพูด และปัญหาทางสังคม ดังนั้นการป้องกันการโรคจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด จึงเป็นเหตุผลที่นำไปสู่การศึกษาหาสาเหตุของการเกิดโรค โดยการศึกษาครั้งนี้อาศัยหลักการ candidate gene approach และเลือกศึกษายีน *p63* ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ *p53* คือเป็น tumour suppressor gene และทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาของ limb, craniofacial และ epithelial development

คำถามของการวิจัย (Research questions)

โรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วยเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *p63* ได้หรือไม่ ?

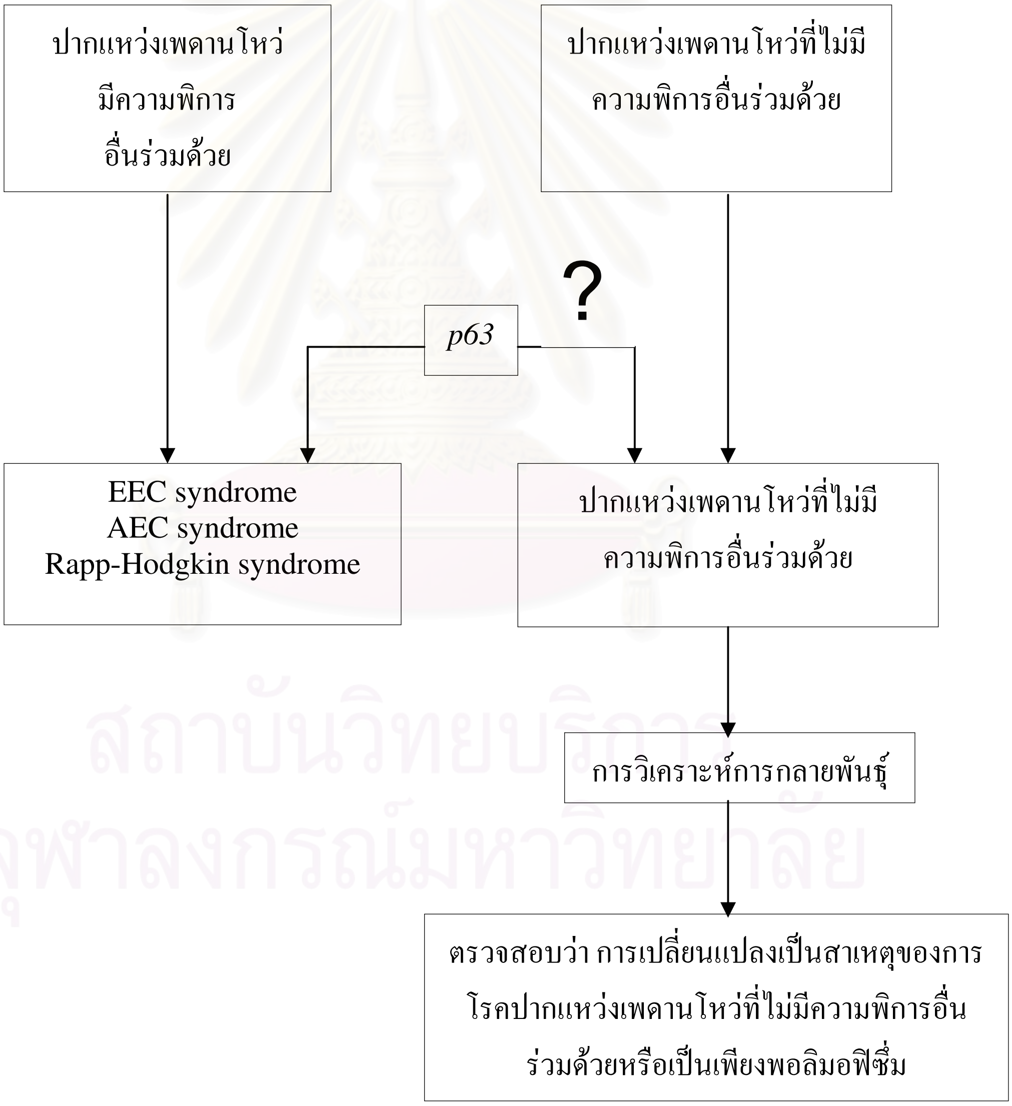
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

เพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีน *p63* ในผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย

สมมติฐาน (Hypothesis)

ผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วยบางราย เกิดการการกลายพันธุ์ในยีน *p63*

กรอบแนวความคิดในการวิจัย(Conceptual framwork)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. **กลุ่มที่จะนำมาทำการศึกษา** (case) คือเลือดของกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วมกลุ่มอาการ

2 **กลุ่มควบคุม**(control) คือเลือดของกลุ่มคนที่มาบริจาคโลหิตที่ไม่เป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่และโรคที่มีสาเหตุมาจากยีน *p63* นอกจากนี้ต้องไม่มีประวัติญาติเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่และโรคที่มีสาเหตุมาจากยีน *p63*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้อาจทำให้ทราบถึงสาเหตุและกลไกที่แน่ชัดของการเกิดปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย อาจช่วยในการให้คำปรึกษาที่ถูกต้องมากขึ้นสำหรับครอบครัวที่มีบุตรเป็นโรค และอาจเป็นแนวทางใหม่ในการเลือก candidate gene ในการศึกษาสาเหตุและกลไกการเกิดโรคต่อไป รวมทั้งอาจหาวิธีการป้องกันการเกิดโรคได้

วิธีดำเนินการวิจัย

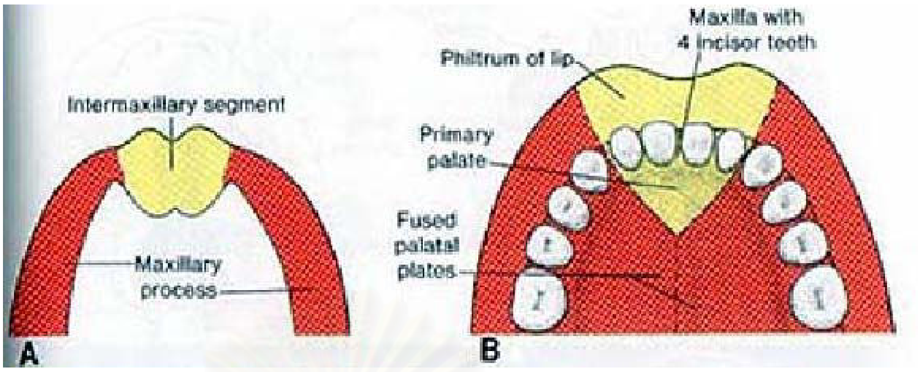
1. เก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและคนปกติ
2. สกัดดีเอ็นเอเพื่อนำมาเพิ่มปริมาณและส่งหาลำดับเบส เพื่อ ตรวจหาการกลายพันธุ์
3. วิเคราะห์การกลายพันธุ์เพื่อหาว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหรือเป็นเพียงโพลิมอร์ฟิซึม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

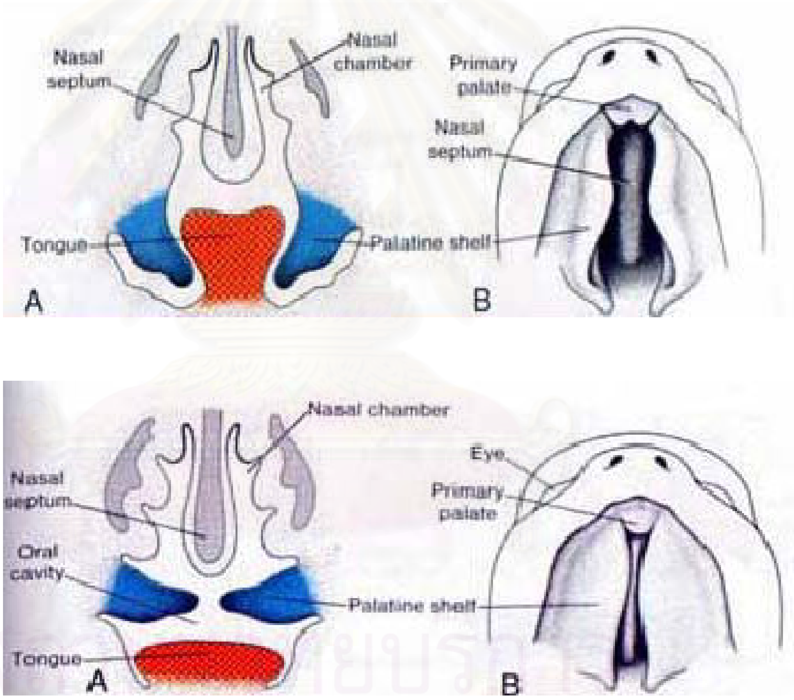
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Orofacial cleft เป็นความพิการแต่กำเนิด ที่เกิดจากความผิดปกติของการพัฒนาของศีรษะและใบหน้า ซึ่งปกติเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ โดย neural crest cell เคลื่อนที่มาบริเวณที่จะพัฒนาเป็นใบหน้าที่เรียกว่า facial primordial โดยส่วนหนึ่งถูกควบคุมจาก homeobox genes(Hox) ซึ่งแบ่งเป็น nasal prominences, maxillary prominences และ mandibular prominences เมื่อถึงระยะ 7-6 สัปดาห์ nasal prominences ทั้งสองรวมกัน กลายเป็น intermaxillary segment ซึ่งส่วนนี้จะเชื่อมกับ maxillary prominences โดย intermaxillary segment จะพัฒนาไปเป็นร่องปาก (filtrum) เพดานแข็ง (primary palate) รวมถึงฟันตัดบนและเบ้ากระดูกฟันของฟันตัดบน 4 ซี่ และทั้งสองข้างของ maxillary prominences จะพัฒนาไปเป็นด้านข้างของริมฝีปากบน (11) ดังรูปที่2 สำหรับเพดานอ่อน (secondary palate) จะพัฒนาแยกกันกับเพดานแข็ง สำหรับการพัฒนาการของเพดานอ่อนจะมีความซับซ้อนมาก โดยเริ่มจาก maxillary prominence แต่ละข้างเจริญยื่นไปในแนวดิ่ง เรียกส่วนที่ยื่นในแนวดิ่งว่า palatal shelves ซึ่ง palatal shelves ประกอบด้วย mesenchymal cell ที่ถูกล้อมรอบด้วย undifferentiated epithelial cell 2-3 ชั้น จากนั้น palatal shelves ยกตัวจากแนวดิ่งไปอยู่ในแนวนอน โดยลิ้นที่กั้นกลางระหว่าง palatal shelves จะต้องตกลงในช่องปากก่อน (12) หลังจากนั้น palatal shelves เชื่อมกันเกิด medial edge epithelial (MEE) โดยอาศัยการทำงานของเซลล์ adhesion molecules และ desmosomes (13, 14) โดยที่ mesenchymal cell ของ palatal shelf ทั้งสองยังถูกแยกด้วย medial edge epithelial (MEE) จนกระทั่ง medial edge epithelial (MEE) หายไป จึงทำให้ mesenchymal cell เชื่อมติดกันอย่างต่อเนื่องและกลายเป็นเพดานอ่อนในที่สุด ซึ่งกลไกการเชื่อมกันนี้จะเหมือนกับการพัฒนาการของใบหน้าบริเวณอื่น เช่น การเชื่อมกันของ intermaxillary segment และ maxillary prominences (15) palatal shelves จะเริ่มเชื่อมจากตรงกลางเลื่อนไปด้านข้างทั้งสอง คือ ด้าน primary palate และลิ้นไก่ กระบวนการ palatogenesis จะสมบูรณ์ตอนอายุ 12 สัปดาห์ ดังรูปที่ 2 และ3 (1)



รูปที่ 2 แสดงการพัฒนาการของริมฝีปากบนและเพดานแข็ง



รูปที่ 3 แสดงการพัฒนาการของเพดานอ่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการศึกษาทางมนุษยพันธุศาสตร์ เช่น ศึกษาโอกาสเสี่ยงการเกิดซ้ำในครอบครัวพบว่า ครอบครัวที่มีลูกหรือพ่อแม่คนใดคนหนึ่งเป็นโรค 1 คน โอกาสเสี่ยงการเกิดซ้ำคิดเป็น 4% ส่วนครอบครัวที่มีลูกเป็นโรค 2 คน มีโอกาสเสี่ยงการเกิดซ้ำ 9% แต่ถ้ามีทั้งลูกและพ่อหรือแม่เป็นโรค จะมีโอกาสเสี่ยงการเกิดซ้ำสูงถึง17 % (16) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา concordance rate ในคู่แฝดพบว่า แฝดแท้ มี concordance rate สูงถึง 40-60% ในขณะที่แฝดเทียมมีเพียง 5 % (5) CL/P จัดเป็นโรคในกลุ่ม complex disease คือเกิดจากยีนหลายยีน เช่น ยีน MTHFR ซึ่งพบว่าหญิงไทยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมในยีนนี้แบบหนึ่ง (genotype 677CT/1298AC) มีโอกาสมีบุตรปากแหว่งเพดานโหว่มากกว่าหญิงทั่วไป 4.4 เท่า ซึ่งหญิงกลุ่มดังกล่าวคิดเป็น 12 % ของผู้ป่วยไทยที่เป็นปากแหว่งเพดานโหว่ ดังนั้นการให้กรดโฟลิกกับหญิงกลุ่มดังกล่าว อาจช่วยลดโอกาสการเกิดโรคนี้ในบุตรได้ (17) และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การสูบบุหรี่ของมารดา (18-21) การดื่มสุราของมารดา (21-23) การขาดโฟลิก (24-27) การได้รับยา Valproic acid หรือ Thalidomide (5, 28) และการได้รับวิตามินเอมากกว่าปกติ (28) เป็นต้น

CL/P มียีนที่ส่งเสริมต่อการเกิดโรคหลายยีน Candidate gene approach เป็นวิธีที่เหมาะสมวิธีหนึ่งในการหายีนที่เป็นปัจจัยเสริมต่อการเกิดโรค การเลือก candidate gene จะนำไปสู่สมมติฐานกลไกการเกิดโรคที่น่าเชื่อถือ และนำไปอธิบายการเกิดโรคที่เป็นไปอย่างซับซ้อนได้ ดังนั้นหลักการเลือก candidate gene จึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยพิจารณาจาก 1. function ของยีน 2. animal model 3. ข้อมูลจากการศึกษา linkage study (29) ซึ่ง candidate gene ที่ได้นำมาศึกษาทั้ง direct analysis, association studies และ genome-wide scans แต่วิธีดังกล่าวก็ยังไม่สามารถหาปัจจัยหลักที่ส่งผลทำให้เกิด cleft ในมนุษย์ได้ แต่เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการศึกษาหาสาเหตุของ cleft จากการวิเคราะห์ในมนุษย์โดยตรง คือ ศึกษายีนที่เป็นสาเหตุของ syndromic CL/P เพื่อนำยีนดังกล่าวมาศึกษา nonsyndromic CL/P ว่ายีนดังกล่าวเป็นปัจจัยต่อการเกิด CL/P หรือไม่ (1, 30) ตัวอย่างของ syndromic CL/P เช่น 1. Margarita Island Ectrodermal dysplasia and clefting syndrome ซึ่งเป็น Autosomal recessive disorder เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *PVRL1* 2. X-linked Mendelian inherited form of CP (CPX) สาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีน *TBX22* มีอาการของ ankyloglossia และCleft palate ร่วมด้วย .3 Van der Woude syndrome เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *IRF6* อาการของโรคนี้คือ จะมี lip pit และ hypodontia ซึ่งจะมี 15 % ของผู้ป่วยที่จะมีเฉพาะ CL/P 4. โรค Ectodactyly, ectodermal dysplasia, and Clefting (EEC)syndrome เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *p63* (5) ซึ่งมีกลุ่มนักวิจัย ที่เลือก Candidate gene ที่เป็นสาเหตุของโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่มีอาการอื่นร่วมด้วย เพื่อหาสาเหตุของปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่เกิดร่วม คือในปี 2003 Jezewski P และคณะ และปี

2004Suzuki Y และคณะ รายงานว่าการกลายพันธุ์ของยีน MSX1 เป็นสาเหตุของการเกิดปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วยในผู้ป่วยบางราย โดยพบการกลายพันธุ์ประมาณ 2% (31, 32) ต่อมาในปี 2004 Zucchero TM และคณะทำการศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน IRF6 แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ที่น่าจะเป็นสาเหตุของโรค แต่พบโพลิมอร์ฟิซึมหลายตำแหน่ง ซึ่งต่อมาในปีเดียวกันมีผู้รายงานว่าโพลิมอร์ฟิซึมในยีน *IRF6* มีความสัมพันธุ์ในแง่ linkage disequilibrium กับปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย (33)

Candidate gene ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ คือ ยีน *p63* เนื่องจากยีนดังกล่าว เมื่อเกิดการกลายพันธุ์แล้วส่งผลต่อการเกิดโรค EEC syndrome นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของ Rapp-Hodgkin syndrome ซึ่งมีอาการ ectodermal dysplasia (34) และ cleft lip/palate, ankyloblepharon-ectodermal dysplasia-clefting (AEC) syndrome, limb-mammary syndrome (LMS) , acro-dermato-unqual-lacrimal-tooth (ADULT)syndrome และ nonsyndromic split-hand/split-foot malformaltion (SHFM) จะพบว่าทั้ง EEC และ AEC syndrome มีอาการ clefting ร่วมด้วย. (35)

มีการศึกษายีน *p63* ต่อการเกิด nonsyndromic orofacial clefts ในชาว Iowa white 31 ราย และชาวฟิลิปปินส์ 31 ราย ศึกษาการกลายพันธุ์โดย SSCP analysis และ directed sequence ดังตารางที่1

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาการกลายพันธุ์โดย SSCP analysis และ directed sequence ในชาว Iowa white 31 ราย และชาวฟิลิปปินส์ 31 ราย

p63 exon	SSCP of Iowa white	SSCP of Filipinos	directed sequence
1	31	Not done	Not done
3’	31	31	Not done
5	31	31	31
6	Not done	31	Not done
7	31	31	Not done
8	31	31	Not done
9	31	Not done	Not done
10	31	Not done	Not done
12	31	Not done	Not done
13	31	Not done	Not done

ผลการศึกษาพบ single nucleotide polymorphism ที่ Intron 5 ตำแหน่ง649 +34 T>G ในคน Iowa white แต่ไม่มีหลักฐานอะไรที่มาสนับสนุนว่ามีผลต่อการเกิด nonsyndromic orofacial clefts ในการศึกษาเดียวกันผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษายีน *p63* ต่อการเกิดโรค EEC syndrome ในชาว Iowa white 2 ครอบครัวและเด็กชาวฟิลิปปินส์ 1 ราย การศึกษาการกลายพันธุ์นอกจากทำ SSCP analysis และ directed sequence แล้วยังทำ RT-PCR ด้วย ผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์แบบ deletion ตรงตำแหน่ง splice acceptor site ในครอบครัว Iowa white 1ครอบครัว ส่วนครอบครัวที่ 2 การกลายพันธุ์เป็นแบบ amino acid substitution ที่ตำแหน่ง R280C และเด็กชาวฟิลิปปินส์มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R304Q ซึ่งทั้งสองตำแหน่งอยู่บน DNA-binding domain (7)

นอกจากนี้มีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *p63* ในผู้ป่วย EEC syndrome และครอบครัว 43ราย โรค SHFM 35 ราย และโรค LMS syndrome 3 ครอบครัว ผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน *p63* ในผู้ป่วย EEC syndrome 40 ราย มีการกลายพันธุ์เป็นแบบ frameshift mutation 1 ราย และที่เหลือเป็น missene mutation ที่ codons 204, 227, 279, 280 และ 304 ซึ่งรูปแบบการกลายพันธุ์แตกต่างจากการกลายพันธุ์ใน SHFM และ LMS แสดงให้เห็นว่ามี genotype-phenotype correlation (36) และนอกจากนี้ยีน *p63* ยังมี variable expression คือมีการแสดงออกที่หลากหลาย เช่น ครอบครัวที่เป็นโรค EEC syndrome

ครอบครัวที่ 1 มีผู้ป่วย EEC syndrome 3 ราย โดยทั้ง 3 รายมีอาการของ ectodermal dysplasia และ Clefting แต่จะมีผู้ป่วย1 ราย ที่มีอาการEctodactyly คือมีอาการผิดปกติ ของ limb

ครอบครัวที่ 2 มีผู้ป่วย EEC syndrome 5 ราย ซึ่ง 5 รายมีอาการของ ectodermal dysplasia และ Clefting แต่จะมีผู้ป่วย 2 ราย ที่มีอาการEctodactyly คือมีอาการผิดปกติของ limb (37)

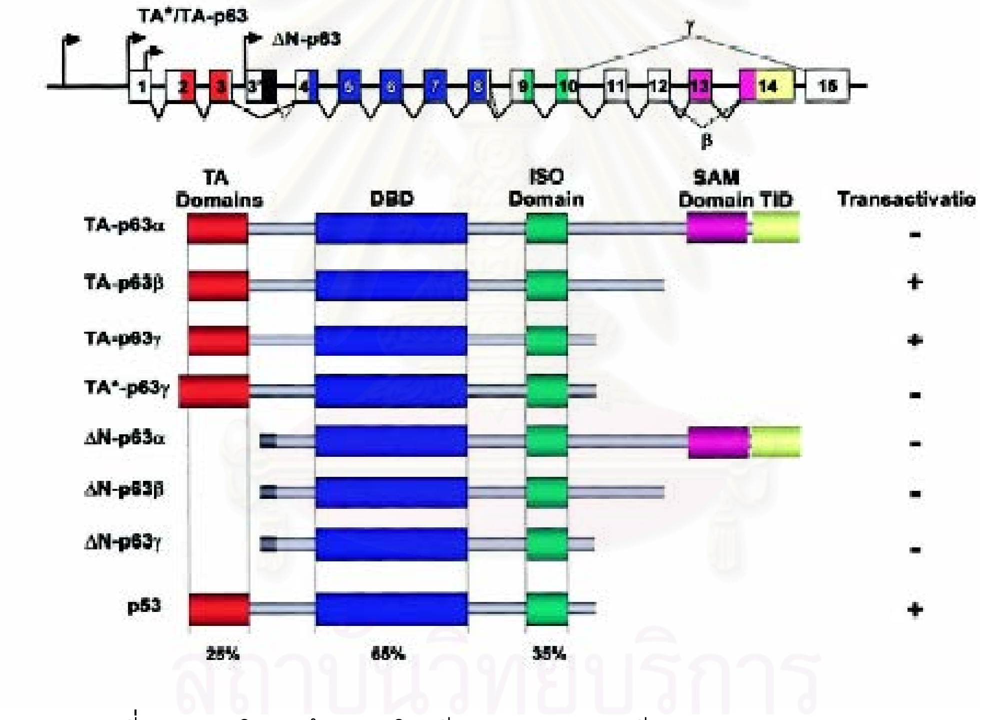
ครอบครัวที่ 3 มีลูกเป็นโรค EEC syndrome และมีการกลายพันธุ์เหมือนกับแม่ แต่การแสดงออกของโรคแตกต่างกัน คือ ลูกจะแสดงอาการผิดปกติทั้ง 3 อาการ แต่ในแม่จะไม่แสดงอาการของ Clefting. (38)

จากคุณสมบัติของยีน *p63* คือ genotype-phenotype correlation และ variable expression ทำให้ยีน *p63* เป็น Candidate gene ที่ดีและน่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้

ยีน *p63* อยู่บนตำแหน่ง 3p27-29 มี 16 exons (7) อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ tumor suppressor *p53* และ *p73* ซึ่งทั้ง 3 ยีนนี้มีความคล้ายกันในด้านขนาดและโครงสร้างของยีน โดยโครงสร้างยีนประกอบด้วย transactivation domain, DNA binding domain และ oligomerization domain (29) ทั้งสามยีนนี้ทำหน้าที่แตกต่างกัน ยีน *p53* จะทำหน้าที่เกี่ยวกับควบคุม cell cycle ส่วนยีน *p73* ทำ

หน้าที่ควบคุมการพัฒนาของ neuronal และ pheromonal และยีน *p63* ควบคุมการพัฒนาของ limb, epithelial และ craniofacial (35)

p63 สร้างโปรตีนอย่างน้อย 6 แบบ เนื่องจากยีน *p63* มีกระบวนการ alternative promoter และ alternative splicing alternative promoter คือ5 ’ promoter อยู่บน exon 1 ผลิตโปรตีนที่มี transcription activation domain (TA-from) และ3 ’ promoter อยู่บน exon 3’ โปรตีนที่ผลิตจะไม่มี transcription activation domain(ΔN-form) ส่วนกระบวนการ alternative splicing จะส่งผลให้ทั้ง TA และ ΔN isoform มีด้านปลาย3 ’ แตกต่างกัน คือ α, β, γ (39) ดังรูปที่4 และขนาดของแต่ละ domain ดังตารางที่ 2



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของโปรตีนแต่ละแบบของยีน *p63*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของแต่ละ domain (ลำดับกรดอะมิโนตาม Human Gene Mutation Database)(40)

Domain	ขนาดของแต่ละ domain)จำนวนกรดอะมิโน(
transcription activation domain	1-68
DNA binding domain	131-323
Iso domain	255-404
SAM domain	502-568
TID domain	571-642
	5

ตารางที่ 3 แสดงขนาดของโปรตีนแต่ละแบบ (isotype) ของยีน *p63* (41)

p63 isotypes	Synonyms	Exon used
TAp63α	*p51B, KET*	1-14
TAp63β		1-12,14
TAp63γ	*p51A*	1-10,15
ΔNp63 α	*CUSS, p73L*	3’,4-14
ΔNp63 β		3’,4-12,14
ΔNp63γ	*p40*	3’,4-10,15

transcription activation domain (TA-from) ทำหน้าที่กระตุ้นการ transcription แต่บางตัวก็ไม่สามารถทำหน้าที่นี้ได้ คือ TAp63α เนื่องจากตรงปลาย3 ’ มี transactivation inhibitory domain (TID) และ TA-isotype ที่มีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นทางด้านปลาย N 39 ตัว(TA*)

ΔN-isotype ทำหน้าที่เป็น dominant negative เช่น ΔNp63 α

sterile-α-motif (SAM) domain ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ protein-protein interaction พบใน TAp63α และ TAp73α (35)

จาก Immunohistochemical analysis ใน ตัวอ่อนของหนู พบว่าระดับของ *p63* สูงในเซลล์เยื่อบุผิว โดยเฉพาะใน progenitor และstem cell ของ เนื้อเยื่อบุผิว ซึ่งพบ dominant-negative ΔNp63 α เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำหน้าที่รักษาระดับการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่เมื่อเซลล์นี้เริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ระดับ ΔNp63 α จะลดลง ในขณะเดียวกันระดับ TAp63 เพิ่มขึ้น (42)

การแสดงออกของ *p63* ใน ตัวอ่อนของหนู พบที่นิวเคลียสของเซลล์ใน basal layer ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นแบบของผิวหนัง ผม ต่อมเหงื่อ นอกจากนี้ Basal cell ของคอ ลิ้น หลอดอาหาร ต่อมน้ำนม ต่อมลูกหมากและ urothelium พบ *p63* ในระดับสูง ส่วนการแสดงออกของ *p63* ใน ectodermal cell ของ limb buds ซึ่ง *p63* จะแสดงออกเฉพาะใน apical ectodermal ridge (AER) ที่ limb bud จะเกิดขึ้นและเจริญเติบโต, tail bud, branchial arches และ oral epithelium

ในกรณีหนูแรกเกิด ที่ยีน *p63* บกพร่อง จะแสดงความผิดปกติของ limb, ผิวหนัง, ตายตั้งแต่แรกเกิดเนื่องจาก dehydration สั้น, tooth primordial, ขนตา, maxilla และ mandible กุด และ secondary palate ไม่เชื่อมติดกัน จากข้อมูลดังกล่าว สรุปว่า *p63* ที่บกพร่องจะแสดงอาการเกี่ยวกับ ectodermal dysplasia การพัฒนาของ limb ผิดปกติ และ facial dysmorphism (43)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

<u>ประชากรเป้าหมาย</u>

ประชากรไทยที่เป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย ที่เข้าร่วมโครงการศัลยกรรมตกแต่งแก้ไขปากแหว่งเพดานโหว่และโครงการวิจัย เพื่อหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมในการเกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่ เก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรเป้าหมาย ตั้งแต่ พ.ศ 2547-2545 .ในจังหวัดกาฬสินธุ์ ตรัง นครราชสีมา น่าน แม่ฮ่องสอน สระแก้ว หนองคาย และอุทัยธานี จำนวน 100 คน ประชากรเป้าหมายมีคุณสมบัติและลักษณะทางคลินิกรุนแรงต่างกัน ดังตารางที่1

ตารางที่4 คุณสมบัติและลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย

	ปากแหว่งอย่างเดียว	ปากแหว่งเพดานโหว่	รวม
จำนวนประชากรเป้าหมาย	37	63	100
Sporadic	31	57	88
Familial	6	6	12
ด้านที่เกิดลักษณะแหว่ง			
ด้านขวา 1 ด้าน	9	15	24
ด้านซ้าย 1 ด้าน	26	32	58
ทั้งสองด้าน	2	16	18
ความรุนแรง			
แหว่งอย่างสมบูรณ์	19	61	80
แหว่งอย่างไม่สมบูรณ์	18	2	20
เพศ			
ชาย	16	42	58
หญิง	21	21	42

<u>ประชากรกลุ่มควบคุม</u>

ประชากรไทยที่ไม่เป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่ และไม่มีประวัติญาติเป็นโรคปากแหว่งเพดานโหว่หรือโรคอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *p63* เช่น EEC syndrome,AEC syndrome,LMS syndrome,ADULT syndrome,SHFM syndrome และ Rapp-Hodgkin syndrome จากผู้บริจาคเลือดที่สภากาชาดจังหวัดกาฬสินธุ์ กำแพงเพชร หนองคาย หนองบัวลำภู และมหาสารคาม จำนวน 500 คน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. Pipette tip : 10 μl, 200μl, 1,000 μl (Elkay, USA)
2. Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (Bio-RAD, Elkay, USA)
3. Polypropylene conical tube : 15 ml (Elkay, USA)
4. Beaker : 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1,000 ml, 2,000 ml (Pyrex)
5. Flask : 250 ml (Pyrex)
6. Reagent bottle : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
7. Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1,000 ml (Witeg, Germany)
8. Glass pipette : 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)
9. Pipette rack (Autopack, USA)
10. Thermometer (Precision, Germany)
11. Parafilm (American National Can, USA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12. Plastic wrap
13. Stirring-magnetic bar
14. Combs
15. Automatic adjustable micropipette : P2 (0.1-2 μl), P10 (0.5-10 μl), P20 (5-20 μl), P100 (20-100 μl), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France/Eppendorf, Germany)
16. Pipette boy (Tecnomara, Switzerland)
17. Vortex (Scientific Industry, USA)
18. pH meter (Eutech Cybernatics)
19. Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
20. Centrifuge (J.P.Selecta, Spain)
21. Microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
22. Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)
23. Thermal cycler (Touch Down, Hybraid USA)
24. Power supply model 250 (Gibco BRL, Scothland)
25. Horizon 11-14 (Gibco BRL, Scothland)
26. Spectronic spectrophotometers (Genesys5, Milon Roy USA)
27. UV Transilluminator (Fotodyne USA)
28. UV-absorbing face shield (Spectronic, USA)
29. Gel doc 1000 (Bio-RAD)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

30. Refrigerator 4 ^{0}C (Misubishi, Japan)

31. Deep freeze -20 ^{0}C, -80 ^{0}C (Revco)

32. Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)

33. Water bath (J.P.Selecta, Spain)

34. Storm 840 and ImageQuaNT software (Molecular dynamics)

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. สารเคมีทั่วไป

    1.1 Absolute ethanol (Merck)

    1.2 Agarose, molecular grade (Promega)

    1.3 Ammonium acetate (Merck)

    1.4 Boric acid (Merck)

    1.5 Bromphenol blue (Pharmacia)

    1.6 Disodium ethylenediamine tetracetic acid : EDTA (Merck)

    1.7 Ethidium bromide (Gibco BRL)

    1.8 Ficoll 400 (Pharmacia)

    1.9 Hydrochloric acid (Merck)

    1.10 Mineral oil (Sigma)

    1.11 Phenol (Sigma)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.12 Chloroform (Merck)

1.13 Isoamyl alcohol (Merck)

1.14 Sodium chloride (Merck)

1.15 Sodium dodecyl sulfate (Sigma)

1.16 Sodium hydroxide (Merck)

1.17 Sucrose (BDH)

1.18 Tris base (USB)

1.19 Triton X-100 (Pharmacia)

1.20 100 base pair DNA ladder (Biolabs)

1.21 25 base pair DNA ladder (Biolabs)

1.22 40%acrylamide/bis solution 19:1 (Bio-RAD)

1.23 GelStar (Camberx)

2. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับเบส

2.1 10X PCR buffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4) (Promega)

2.2 10X PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.8% Nonidet P40) (Fermentas)

2.3 Magnesium chloride (Promega)

2.4 Magnesium chloride (Fermentas)

2.5 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Fermentas)

2.7 Oligonucleotide primers (BSU)

2.8 Oligonucleotide primers (Biogenomed)

2.9 *Taq* DNA polymerase (Promega)

2.10 *Taq* DNA polymerase (Fermentas)

2.11 100% DMSO

2.12 Genomic DNA sample

2.13 ExoSAP-IT (USB, USA)

3. Restriction enzyme

3.1 *BseR* I (Biolabs)

3.2 *Bst N*I (Biolabs)

3.3 Esp3I (Fermentas)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>เก็บตัวอย่างเลือด</u>

1.1 ประชากรเป้าหมาย

1.1.1. คัดกรองผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญและสืบประวัติครอบครัว พร้อมขอคำยินยอมเพื่อทำการเก็บตัวอย่างเลือด

1.1.2. ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร พร้อมครอบครัว

1.2 ประชากรกลุ่มควบคุม

1.2.1. ซักประวัติผู้บริจาคเลือด พร้อมขอคำยินยอมเพื่อทำการเก็บตัวอย่างเลือด

1.2.2. ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยปริมาตร 5-3 มิลลิลิตร

2. <u>เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ</u> เพื่อส่งตรวจหาการกลายพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol chloroform extraction

2.1 นำเลือดปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.2 ย้ายส่วนเม็ดเลือดขาวเก็บในหลอด polypropylene

2.3 เติม lysis buffer I ที่แช่เย็นรวมกับเม็ดเลือดขาวจนมีปริมาตรเป็น 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.4 เติม lysis buffer I ที่แช่เย็นรวมกับเม็ดเลือดขาวจนมีปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.5 เติม lysis buffer II 900 ไมโครลิตร สารละลาย protinase K 10 ไมโครลิตร และ 10% SDS 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.6 เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ12-16 ชั่วโมง

2.7 เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol 500ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.8 เก็บส่วนบนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร

2.9 เติม 7.5 M ammonium acetate 250 ไมโครลิตร และ %100 ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20-15 นาที จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวใสที่ก้นหลอด เทส่วนบนทิ้ง

2.10 เติม %70 ethanol แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง ทิ้งให้แห้ง

2.11 เติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

2.12 วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของประชากรเป้าหมายและประชากรกลุ่มควบคุม โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยออกแบบ Primer ให้ครอบคลุมแต่ละ exons (ตารางที่ 5) สารเคมี และอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงในตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 primers สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละ exons

Exon	ลำดับเบสของ primers สำหรับทำ PCR 5' to 3'		Product size (bp)
	Forward	Reverse	
1	CCCTATTGCTTTTAGCCTCC	ACTGTGCTGACTAAACAAGG	281
2	CTACATATATACCTGCATGG	AAAAACATGCCCTAGTAAGC	344
3	AGCCTTGCTGACTTTGAAGC	CACATGACTGAAAAGACAGG	317
3'	CATATTGTAAGGGTCTCAGAGG	GACCGAGAACCGCAAATACG	223
4	ATGCATTCACCCATGGATGC	GAATCGCTAAACTGGGAAGG	437
5	GTAAACAGGCAGCATGCAGC	AGTCTGAATCAGGTAGGTGG	401
6	CACCAACATCCTGTTCATGC	GCTAGAAACATCCCTGTTGC	296
7	AGAGGGAAGAACTGAGAAGG	CAGCCACGATTTCACTTTGC	256
8	GGAAGTGGTAGATCTTCAGG	GCAGCTTCTCCAATATCACC	294
9	GTGTTGCTGGTACTACTGTC	GACTAAGACACCTCCTTTCC	334
10	ACTTCTAACAGTTCTACAGC	CTCATCAATCACCCTATTG	275
11	CCATGTTTTAAACAGAGAC	CCACAGAGTCTTGTCCTAAGC	313
12	TTAACCAGACAAGATGGACC	CCCTTCCAACTGTTTTATGG	321
13	CTTATCTCGCCAATGCAGTT	TACAAGGCGGTTGTCATCAG	238
14	GGAATGATAGGATGCTGTGG	GCAGGAGTGCGCAGGAGTGC	450
15	CAGGCACTCTATTCTGTCTA	GGAAATACAACACACACACT	280

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารเคมี	**ความเข้มข้น**	**ปริมาณ)μl(**
10X PCR buffer	1X	2.0
25 mM Magnesium chloride	1.5 mM	1.2
10 mM Deoxynucleotide triphosphates	0.2 mM	0.4
10 μM Oligonucleotide primers	0.2 μM	0.4
5U/μl *Taq* DNA polymerase	0.5 U	0.1
50 ng/μl Genomic DNA sample	50 ng	2
dH_2O	-	13.5
Total		20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 อุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอน / Exons	จำนวนรอบ (อุณหภูมิ/เวลา)				
	Initiation (C^0/5min)	Denaturing (C^0/ 30sec)	Annealing (C^0/ 30sec)	Extension (C^0/30sec)	Final extension (C^0/10min)
1	94	94	55	72	72
2	94	94	52	72	72
3	94	94	55	72	72
3’	94	94	62	72	72
4	94	94	55	72	72
5	94	94	55	72	72
6	94	94	55	72	72
7	94	94	55	72	72
8	94	94	55	72	72
9	94	94	55	72	72
10	94	94	52	72	72
11	94	94	52	72	72
12	94	94	52	72	72
13	94	94	62	72	72
14	94	94	55	72	72
15	94	94	62	72	72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 ตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธี sequencing analysis

ตรวจหาการกลายพันธุ์ในประชากรเป้าหมายทั้งหมด 100 คน ในการ sequencing จะใช้ primers เส้น Forward ของแต่ละ Exon ดังตารางที่2 โดย sequencing ทำโดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี จากนั้นตรวจหาการกลายพันธุ์โดยโปรแกรม Sequencher 4.2

3 วิเคราะห์การกลายพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากการ Sequencing จะนำมาศึกษาต่อ ดังนี้

3.8 ทำการยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสนั้นมีอยู่จริง โดย

3.1 Restriction enzyme digestion

3.2 ทำการพิสูจน์ว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเป็นสาเหตุของการเกิดโรค pathogenic variant หรือเป็นโพลิมอร์ฟิซึม ดูจาก

3.2.1 ตรวจสอบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส พบครั้งแรกในตัวประชากรเป้าหมายที่เรียกว่า "*de novo*" ตรวจสอบโดย Restriction enzyme digestion ดังตารางที่5 เปรียบเทียบกับบิดามารดา

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในประชากรกลุ่มควบคุม โดย Restriction enzyme digestion ดังตารางที่ 8 ในประชากรกลุ่มควบคุม 500 ราย

3.2.3 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น(Protien sequence comparison) เพื่อหา conserve region โดยใช้โปรแกรม ClustalX

3.2.4 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

3.2.5 Functional domain เพื่อดูว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเกิดที่ตำแหน่งสำคัญของยีน

3.2.6 ศึกษาหน้าที่ โดยใช้โปรแกรม PolyPhen

ตารางที่ 8 เอนไซม์ตัดจำเพาะ และชนิดและเปอร์เซ็นต์ของ gel

การกลายพันธุ์	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของ gel
S90L	*Bse*RI	2% agarose
R313G	*Esp*3I	2 %agarose
D564H	*Bst* NI	2% agarose

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์การกลายพันธุ์

จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในประชากรเป้าหมายทั้งหมด 100 ราย รายละ 16 exons พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังตารางที่ 9

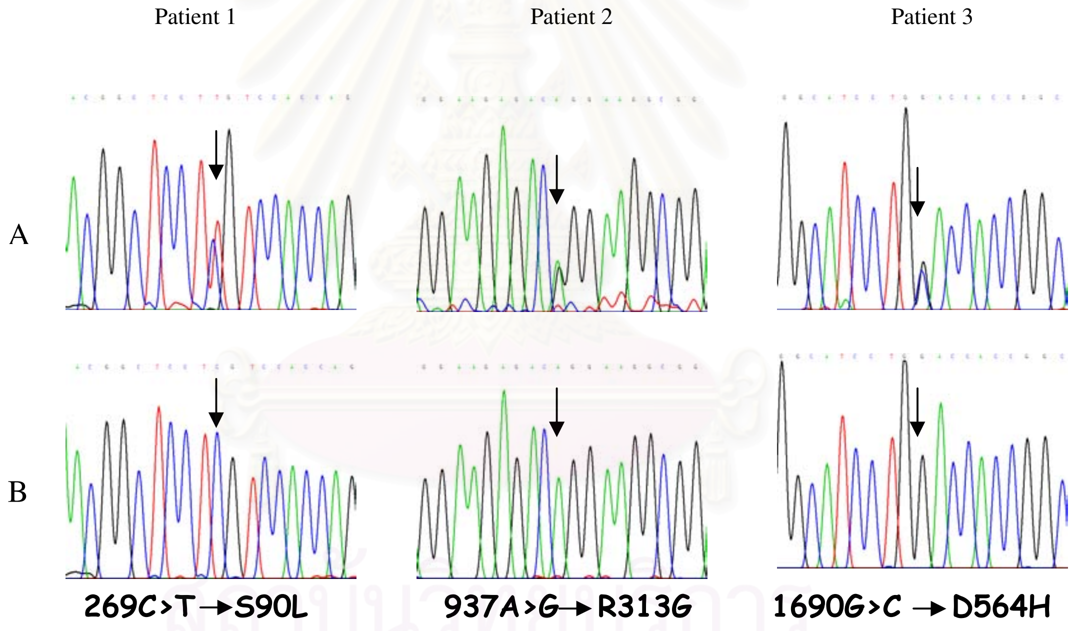
ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์

Nucleotide position	Exon/introne	Nucleotide change	Expected amino acid change	Frequencies of heterozygotes	Frequencies of homozygotes
261	Exon4	C>T	N87N	1	0
269	Exon4	C>T	S90L	1	0
462+39	Intron4	T>A	-	6	0
463-49	Intron4	T>A	-	1	0
463-42	Intron4	G>A	-	1	0
463-41	Intron4	G>A	-	1	0
463-40	Intron4	T>A	-	1	0
649+42	Intron5	G>A	-	9	0
742	Exon6	C>T	L248L	7	0
875+51	Intron7	G>A	-	1	0
937	Exon8	A>G	R313G	1	0
1013-22	Intron8	A>G	-	23	1
1095+79	Intron9	A>G	-	41	11
1218	Exon10	C>T	H406H	1	0
1232+25	Intron10	A>T	-	1	0
1232+26	Intron10	G>C	-	1	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1232+40	Intron10	G>C	-	39	10
1232+41	Intron10	G>A	-	24	2
1233-23	Intron10	T>C	-	42	35
1629+22	Intron13	C>T	-	1	0
1690	Exon14	G>C	D564H	1	0

จากตารางพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ non-synonymous คือ การเปลี่ยนเบสแล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป อยู่ 3 ตำแหน่ง คือ S90L R313G และ D564H ในประชากรเป้าหมาย 3 จังหวัด คือ กาฬสินธุ์ สระแก้ว และ หนองคาย ตามลำดับ



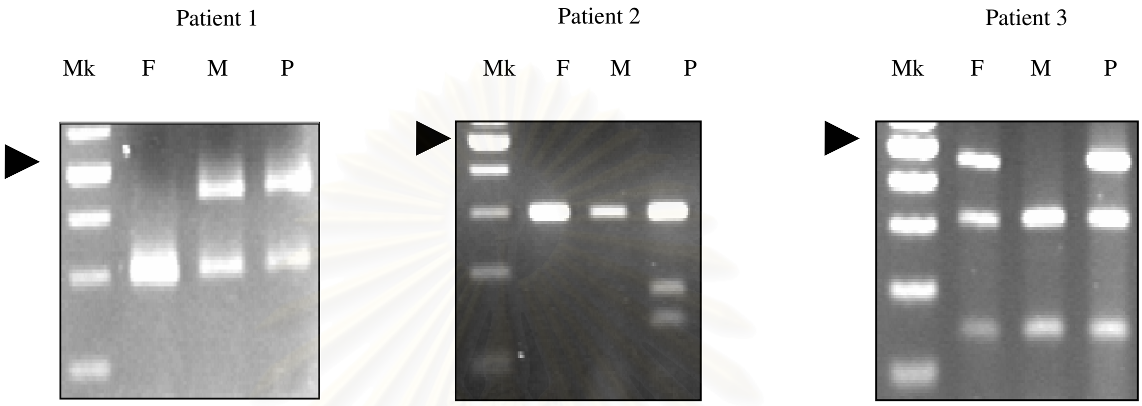
รูปที่ 5 แสดง Chromatogram ของ non-synonymous ทั้ง 3 ตำแหน่ง

A แสดง Chromatogram ของประชากรเป้าหมายที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงแบบ non-synonymous

B แสดง Chromatogram ของประชากรเป้าหมาย ที่ลำดับเบสไม่เปลี่ยน

2. **ผลการ** Restriction enzyme digestion **ของ** non-synonymous **ทั้ง** 3 **ตำแหน่ง**

2.1 เปรียบเทียบในแต่ละครอบครัว ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงผล Restriction enzyme digestion

Mk =marker, F=บิดา, M=มารดา, P=คนไข้

จากรูป

ครอบครัวคนไข้ที่ 1 : คนไข้มีรูปแบบของ band เหมือนกับแม่ แสดงว่าคนไข้ได้รับอัลลีลที่ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงจากแม่

ครอบครัวคนไข้ที่ 2 : คนไข้มีรูปแบบของ band ไม่เหมือนกับพ่อและแม่ นั่นแสดงว่าลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นครั้งแรกในตัวคนไข้ ซึ่งเรียกว่า *de novo*

ครอบครัวคนไข้ที่ 3 : คนไข้มีรูปแบบของ band เหมือนกับพ่อ แสดงว่าคนไข้ได้รับอัลลีลที่ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงจากพ่อ

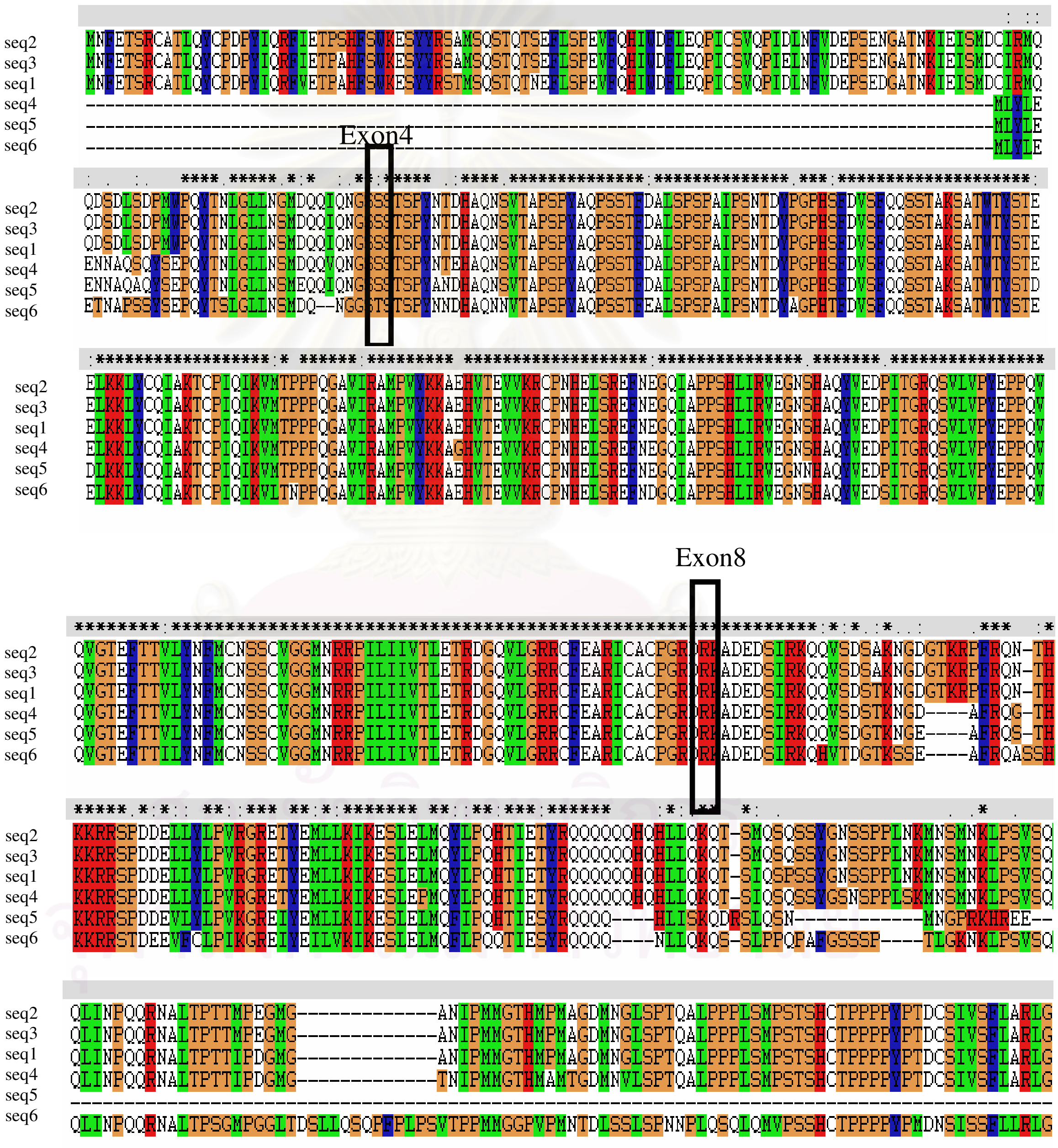
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

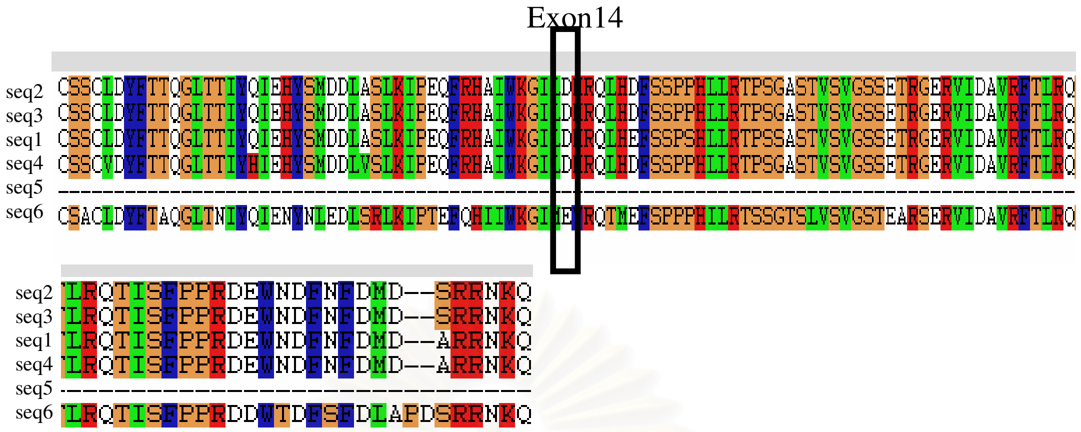
2.2 ผลการหาลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงทั้ง 3 ตำแหน่ง ในประชากรกลุ่มควบคุม 500 ราย

- ในตำแหน่ง S90L และ R313G ลำดับเบสที่เปลี่ยนในคนไข้คนที่ 1และ2 ตามลำดับ ไม่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในประชากรกลุ่มควบคุม แต่ในตำแหน่ง D564H พบในประชากรกลุ่มควบคุม 1 ราย

3. เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ในการศึกษานี้เปรียบเทียบทั้งหมด 5 ชนิด คือ Norway rat(accession NP_062094), house mouse(accession AAP87982),Chicken(accessionNP_989682), African clawed frog(accession AAK15622) และ zabrafish(accession NP_694518) ดังรูปที่ 7





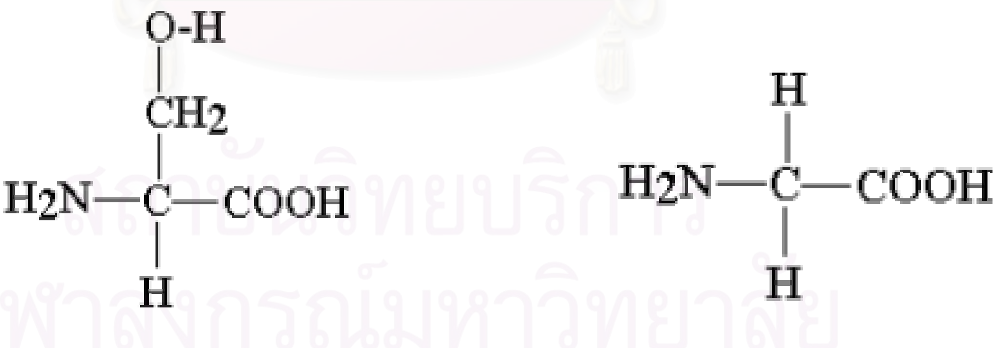
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในมนุษย์กับสิ่งมีชีวิตอื่น

seq1=Homo sapiens,seq2= Norway rat,seq3= house mouse,seq4= Chicken ,seq5=African clawed frog seq6=zabrafish

4. **การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน**

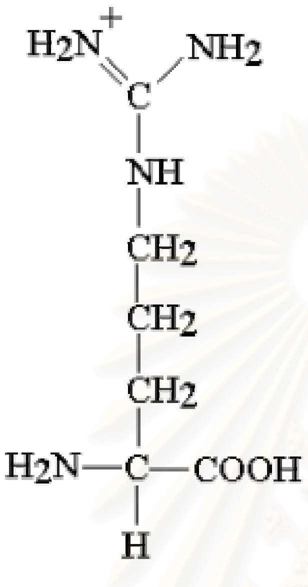
4.1 ตำแหน่ง S90L

กรดอะมิโน Serine ซึ่งมีขั้ว แต่ไม่มีประจุ เปลี่ยนเป็น Leucine ซึ่งไม่มีขั้ว

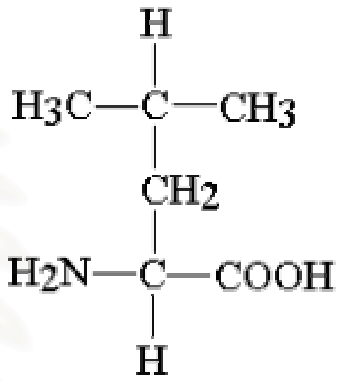


serine glycine

4.2 ตำแหน่ง R313G กรดอะมิโน Arginine ซึ่ง มีขั้วและประจุบวก เปลี่ยนเป็น Glycine ซึ่งไม่ขั้ว



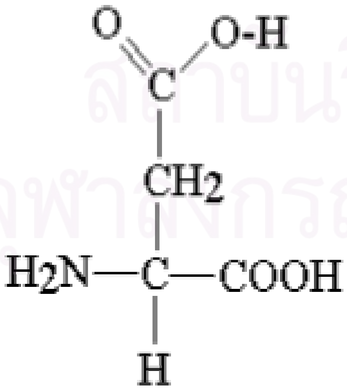
arginine



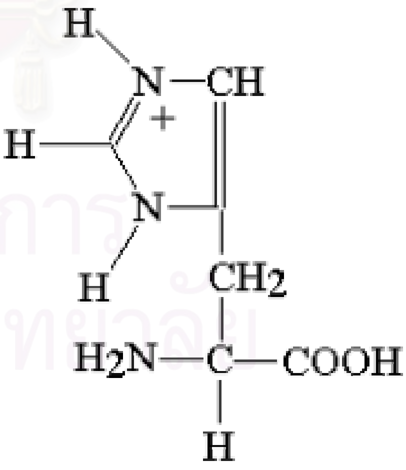
leucine

4.3 ตำแหน่ง D564H

กรดอะมิโน Aspartic acid มีขั้วและประจุลบ เปลี่ยนเป็น Histidine ซึ่งไม่ขั้ว



Aspartic acid



histidine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

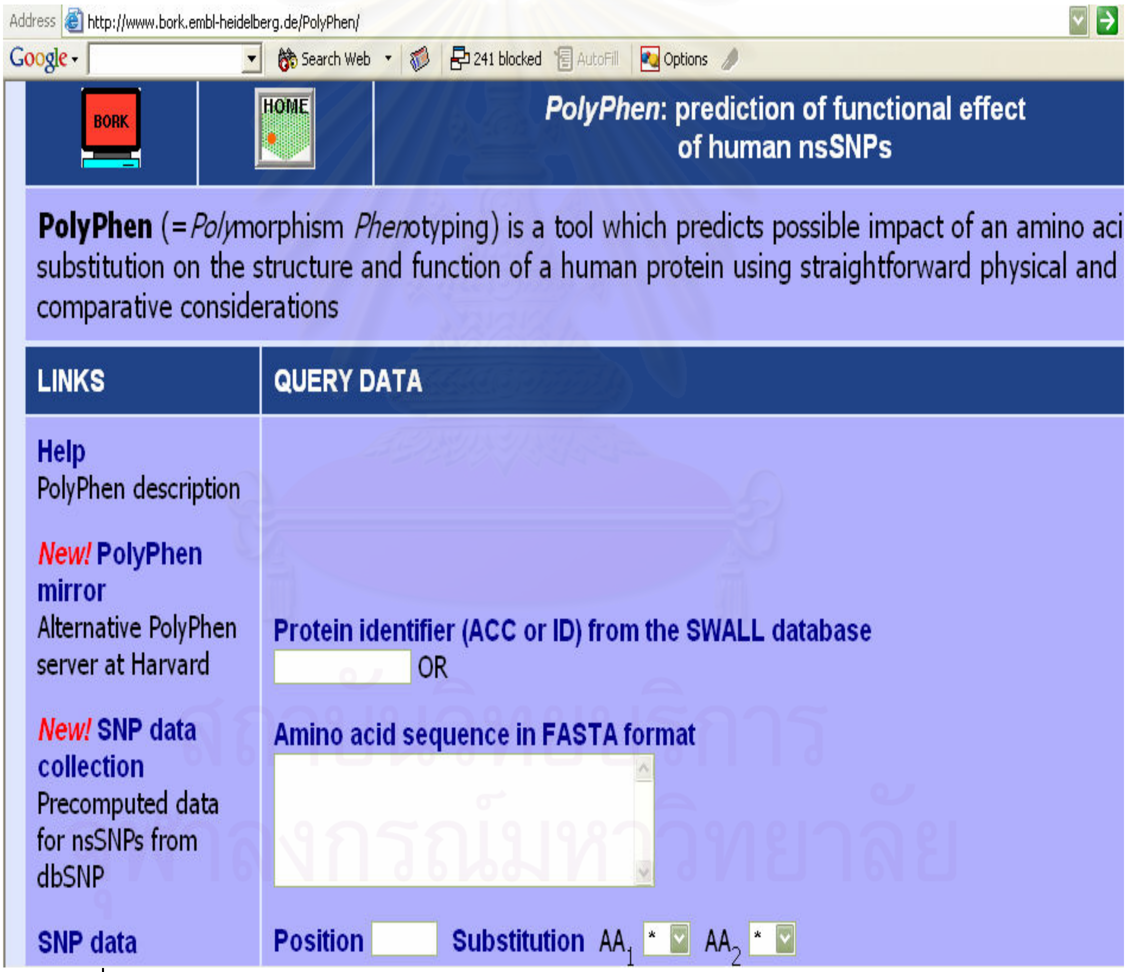
5. Functional domain

5.1 S90L ไม่ใช่ตำแหน่งของ domain ที่สำคัญ

5.2 R313G เป็นตำแหน่งของ DB domain

5.3 D564H เป็นตำแหน่งของ SAM domain

6. **ศึกษาหน้าที่โดยใช้โปรแกรม** PolyPhen (44)



รูปที่ 8 แสดงโปรแกรม PolyPhen

เมื่อใส่ข้อมูลตามที่โปรแกรมต้องการได้ผลดัง รูปที่ 9,10 และ 11 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.1 S90L (S129L/ Swall database)

Query

Acc number	Position	AA_1	AA_2	Description
Q9H3D4	129	S	L	TA p63 alpha (Tumor protein p73-like). LENGTH: 680 AA

Prediction

This variant is predicted to be benign

Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.276

รูปที่ 9 แสดงผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีน *tp63* ที่ตำแหน่ง S90L

6.2 R313G (R352G / Swall database)

Query

Acc number	Position	AA_1	AA_2	Description
Q9H3D4	352	R	G	TA p63 alpha (Tumor protein p73-like). LENGTH: 680 AA

Prediction

This variant is predicted to be probably damaging

Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	alignment structure	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.429

Remarks
Hydrophobicity change at buried site; normed accessibility: 0.15, hydrophobicity change: 0.91
Cavity creation at buried site; normed accessibility: 0.15, volume change: -113
Charge change at buried site: substitution R -> G, normed accessibility: 0.15

รูปที่ 10 แสดงผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีน *tp63* ที่ตำแหน่ง R313G

6.3 D564H (D603H/Swall database)

Query

Acc number	Position	AA_1	AA_2	Description
Q9H3D4	603	D	H	TA p63 alpha (Tumor protein p73-like). LENGTH: 680 AA

Prediction

This variant is predicted to be possibly damaging

Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
possibly damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.774

รูปที่ 11 แสดงผลการทดสอบหน้าที่ของโปรตีน *tp63* ที่ตำแหน่ง D564H

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการตรวจหาการกลายพันธุ์

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *p63* สามารถสรุปผลการเปลี่ยนแปลงออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. **การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ไม่ผลิตโปรตีน** (non-coding region) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่มีผลต่อลำดับกรดอะมิโน เรียกว่า **พอลิมอฟิซึ่ม** (polymorphism)โดยพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ 1 โมเลกุล ทั้งหมด 15 แบบ 15 ตำแหน่ง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่พบเป็นจำนวนมาก เช่น 1095+79 1232+40 1233-23 พบในคนไข้รวมทั้งแบบ heterozygotes และ homozygotes จำนวน 55 49 77 ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 ในบทที่ 4 ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า การเปลี่ยนแปลง ดังกล่าวเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ เฉพาะในคนไทย

2. **การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ผลิตโปรตีน** (coding region) สำหรับงานวิจัยนี้พบ 2 แบบ คือ

   2.1 การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 โมเลกุล แล้วไม่ส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโน เรียกว่า synonymous mutation

   2.1.1 N87N เกิดในตำแหน่งที่ไม่มีหน้าที่ที่สำคัญ

   2.1.2 L248L เกิดในตำแหน่งที่อยู่ในส่วนของ DB domain (ลำดับกรดอะมิโน 131-323)

   2.1.3 H406H เกิดในตำแหน่งที่ไม่มีหน้าที่ที่สำคัญ

   2.2 การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 โมเลกุล แล้วส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโน เรียกว่า nonsynonymous mutation

2.2.1 S90L เปลี่ยนจาก Serine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนมีขั้ว เป็น Leucine ซึ่งไม่มีขั้ว เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้กับสิ่งมีชีวิตอื่น5 ชนิด(Norway rat, house mouse,Chicken, African clawed frog และ zabrafish) พบว่าเป็นกรดอะมิโน Serine เช่นกัน ยกเว้นใน zabrafis จะเป็น threonine แต่มีคุณสมบัติเหมือนกับ Serine คือ เป็นกรดอะมิโนมีขั้ว นั่นแสดงว่าที่ตำแหน่งนี้เป็นบริเวณ conserve region โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่พบในประชากรกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตาม S90L ยังไม่สามารถสรุปว่าเป็น การเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลให้เกิดโรค(Pathogenic mutation) ได้เนื่องจากว่า การเปลี่ยนแปลง S90L เกิดในส่วนของยีนที่ไม่มีหน้าที่สำคัญ(Functional domain) และ คนไข้ได้รับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวถ่ายทอดมาจากมารดา จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ โดยมารดาแสดงลักษณะปกติ ไม่มีอาการปากแหว่งเพดานโหว่ หรืออาการที่เกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน *p63* เช่น นิ้วมือนิ้วเท้า ผิวหนัง ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่า 1. การไม่แสดงออก(non-penetrance) ในแม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแต่ไม่แสดงออก ของลักษณะปากแหว่งเพดานโหว่ ซึ่งการแสดงออก(penetrance) ของลักษณะหนึ่งสำหรับจีโนไทป์หนึ่งๆ หมายถึงสัดส่วนที่บุคคลซึ่งมีจีโนไทป์นั้นจะแสดงออกมา โดยนิยามของลักษณะเด่น บุคคลที่เป็น heterozygote ต้องแสดงลักษณะนั้นออกมา ดังในกรณีนี้มารดาควรแสดงลักษณะของอาการปากแหว่งเพดานโหว่ออกมา นั่นคือการแสดงออกของลักษณะที่เป็นลักษณะเด่นควรเป็นร้อยละ100 ซึ่งโดยทั่วไปการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของจีโนไทป์หนึ่งๆ ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ที่ยีนตำแหน่งนั้น แต่ยีนอื่นและปัจจัยสิ่งแวดล้อมอาจทำให้บุคคลหนึ่งไม่แสดงลักษณะนั้นออกมา (45) 2. มีการแสดงออกที่หลากหลาย เรียกว่า variable expression ดังตัวอย่างของครอบครัวที่เป็นโรค EEC syndrome พบว่าลูกได้รับการกลายพันธุ์ของยีน *p63* จากมารดา แต่การแสดงออกของโรคแตกต่างกันคือ ลูกแสดงออกครบทั้ง 3 อาการ คือ Ectrodactyly, Ectodermal dysplasis และclefting ส่วนในแม่ไม่แสดงอาการ clefting (38) ซึ่งสาเหตุของการแสดงออกที่หลากหลายนี้เหมือนกับสาเหตุของการแสดงออก(penetrance) ได้แก่ ยีนอื่นและปัจจัยสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะต่างๆ (46) และจากการทดสอบหน้าที่จากโปรแกรม PolyPhen พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของโปรตีน *p63*

2.2.2 D564H เป็นการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Aspartic acid ซึ่งเป็นกรดอะมิโนมีขั้ว ประจุลบ เป็น Histidine ซึ่งไม่มีขั้ว เปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้กับสิ่งมีชีวิตอื่น5 ชนิด(Norway rat, house

mouse,Chicken, African clawed frog และ zabrafish) พบว่าที่ตำแหน่งนี้ เป็นกรดอะมิโน Aspartic acid เช่นกัน ยกเว้นใน zabrafish จะเป็น Glutamic acid แต่ก็เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ Aspartic acid คือ กรดอะมิโนมีขั้ว ประจุลบ นั่นแสดงว่าที่ตำแหน่งนี้เป็นบริเวณ conserve region และเป็นส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญคือ SAM domain(ลำดับกรดอะมิโน 502-568) จากข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้ D564H ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลให้เกิดโรค(Pathogenic mutation) ได้เนื่องจากว่าเปลี่ยนแปลงที่ได้รับถ่ายทอดจากบิดา ซึ่งบิดาแสดงลักษณะปกติ ไม่มีอาการปากแหว่งเพดานโหว่ หรืออาการที่เกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน *p63* เช่น นิ้วมือนิ้วเท้า ผิวหนัง ซึ่งอาจอธิบายได้ดังในกรณี S90L นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลง D564H ในประชากรกลุ่มควบคุม 1 ราย จาก 500 ราย(1,000 โครโมโซม) ซึ่งคิดเป็น 0.1 % (พอลิมอฟิซึ่ม>1%) และจากการทดสอบหน้าที่ด้วยโปรแกรม PolyPhen พบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจส่งผลต่อหน้าที่ของโปรตีน *p63*

แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง S90L และ D564H มากกว่านี้

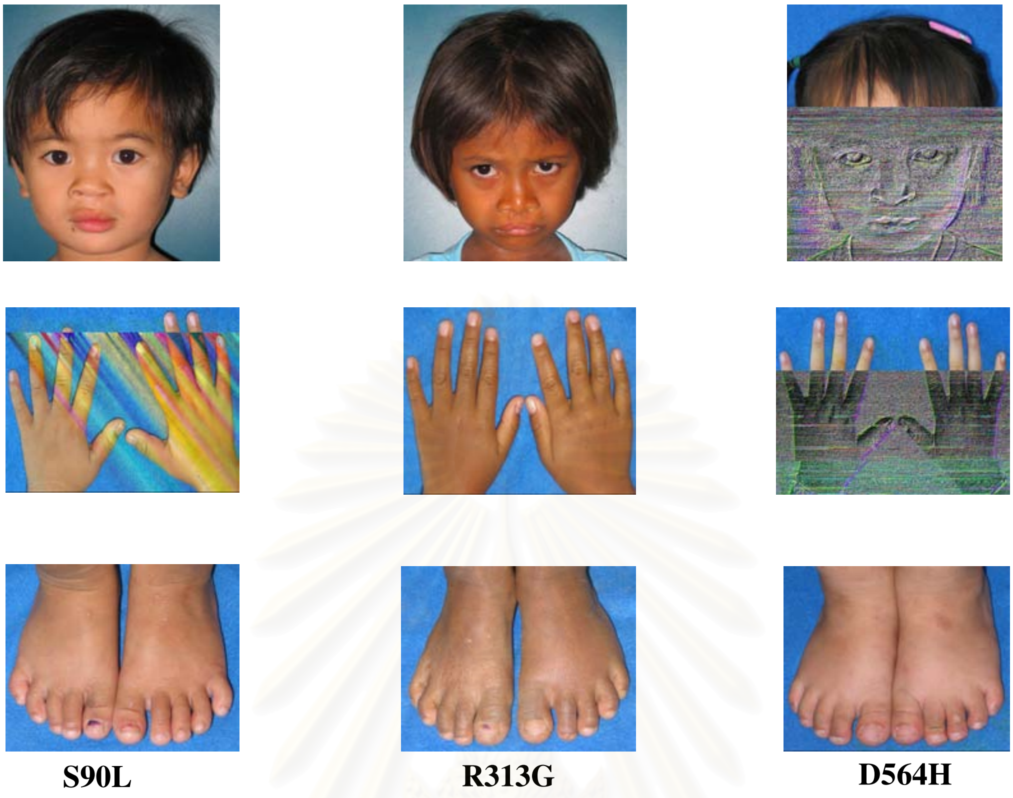
2.2.3 R313G เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Arginin ซึ่งมีขั้ว และประจุบวก ไปเป็น Glycine ซึ่งไม่มีขั้ว การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งนี้อยู่ในบริเวณ conserved region จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตอื่น นั่นคือ Norway rat, house mouse,Chicken, African clawed frog และ zabrafish ซึ่งการเปลี่ยนแปลง R313G เป็นส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญ คือ DB domain(ลำดับกรดอะมิโน 131-323) จากการตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะเปรียบเทียบกับบิดามารดาและประชากรกลุ่มควบคุม พบว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นครั้งแรกในตัวคนไข้ ที่เรียกว่า *de novo* และไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในประชากรกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผลจากการทดสอบหน้าที่โดยโปรแกรม PolyPhen พบว่า R313G รบกวนการทำงานของโปรตีน *p63*

ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ บ่งชี้ว่า การกลายพันธุ์ของยีน *p63* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 สรุปการพิสูจน์การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อการเกิดโรค (Pathogenic mutation)

การศึกษา	S90L	R313G	D564H
1. กลุ่มของกรดอะมิโน	มีขั้ว → ไม่มีขั้ว	มีขั้ว ประจุบวก →ไม่มีขั้ว	มีขั้ว ประจุลบ→ไม่มีขั้ว
2. บริเวณ conserved region	conserved region	conserved region	conserved region
3. *de novo*	ได้รับการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ S90L จากมารดา	*de novo*	ได้รับการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ D564H จากบิดา
4. ประชากรกลุ่มควบคุม 500 ราย	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ S90L ในประชากรกลุ่มควบคุม	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ R313G ในประชากรกลุ่มควบคุม	พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ D564H ในประชากรกลุ่มควบคุม 1 ราย
5.ส่วนที่สำคัญของโปรตีน	ไม่อยู่ในส่วนที่ทำหน้าที่สำคัญ	เกิดในส่วน DB domain	เกิดในส่วน SAM domain
6. ทดสอบหน้าที่	ไม่ส่งผลต่อหน้าที่ของโปรตีน *p63*	รบกวนการทำงานของโปรตีน *p63*	อาจจะส่งผลต่อหน้าที่ของโปรตีน *p63*



รูปที่ 12 แสดงคนไข้ปากแหว่งเพดานโหว่ที่ไม่มีความพิการอื่นร่วมด้วย ที่มีการ เปลี่ยนแปลงตำแหน่ง S90L R313G D564H ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofac J*,33,5(1996):406-417.
2. Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet*,2,6(2001):458-468.
3. Moore KaPT. the developing human. *Saunders* (1993):216-221.
4. TV MKaP. the developing human and the branchial or pharyngeal apparatus. *Saunders* (1993):216-221.
5. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*,61,4(2002):248-256.
6. Jones MC. Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *Cleft Palate J*,25,1(1988):16-20.
7. Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum SE, Gorlin R, et al. Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet*,39,8(2002):559-566.
8. Spritz RA. The genetics and epigenetics of orofacial clefts. *Curr Opin Pediatr*,13,6(2001):556-560.
9. Chuangsuwanich A, Aojanepong C, Muangsombut S, Tongpiew P. Epidemiology of cleft lip and palate in Thailand. *Ann Plast Surg*,41,1(1998):7-10.
10. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med*,341,20(1999):1509-1519.
11. Moore KL. The Developing Human. 3 *rd end.WB Saunders Philadelphin* (1988):197-213.
12. Ferguson MW. Palate development. *Development*,103 Suppl(1988):41-60.
13. Mogass M, Bringas P, Jr., Shuler CF. Characterization of desmosomal component expression during palatogenesis. *Int J Dev Biol*,44,3(2000):317-322.
14. Greene RM, Pratt RM. Developmental aspects of secondary palate formation. *J Embryol Exp Morphol*,36,2(1976):225-245.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15. Sun D, Baur S, Hay ED. Epithelial-mesenchymal transformation is the mechanism for fusion of the craniofacial primordia involved in morphogenesis of the chicken lip. *Dev Biol*,228,2(2000):337-349.

16. Curtis EJ FF WD. Congenital cleft lip and palate. *Am.J.Dis.Child*,102(1961):853-857.

17. Shotelersuk V, Ittiwut C, Siriwan P, Angspatt A. Maternal 677CT/1298AC genotype of the MTHFR gene as a risk factor for cleft lip. *J Med Genet*,40,5(2003):e64.

18. Chung KC, Kowalski CP, Kim HM, Buchman SR. Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast Reconstr Surg*,105,2(2000):485-491.

19. Khoury MJ, Gomez-Farias M, Mulinare J. Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring? *Am J Dis Child*,143,3(1989):333-337.

20. Ericson A, Kallen B, Westerholm P. Cigarette smoking as an etiologic factor in cleft lip and palate. *Am J Obstet Gynecol*,135,3(1979):348-351.

21. Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology*,59,1(1999):39-50.

22. Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*,54,1(1996):27-33.

23. Padmanabhan R, Pallot DJ. Aspirin-alcohol interaction in the production of cleft palate and limb malformations in the TO mouse. *Teratology*,51,6(1995):404-417.

24. Bienengraber V, Malek FA, Moritz KU, Fanghanel J, Gundlach KK, Weingartner J. Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. *Cleft Palate Craniofac J*,38,4(2001):393-398.

25. Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CM, van der Put NM, Gaytant MA, Eskes TK, et al. Homocysteine metabolism and effects of folic acid supplementation in patients affected with spina bifida. *Neuropediatrics*,31,6(2000):298-302.

26. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet*,346,8972(1995):393-396.

27. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology*,51,2(1995):71-78.

28. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*,313,14(1985):837-841.

29. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*,3,5(2002):391-397.

30. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*,13 Spec No 1(2004):R73-81.

31. Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*,40,6(2003):399-407.

32. Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, et al. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med*,6,3(2004):117-125.

33. Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med*,351,8(2004):769-780.

34. Shotelersuk V, Janklat S, Siriwan P, Tongkobpetch S. De novo missense mutation, S541Y, in the p63 gene underlying Rapp-Hodgkin ectodermal dysplasia syndrome. *Clin Exp Dermatol*,30,3(2005):282-285.

35. van Bokhoven H, Brunner HG. Splitting p63. *Am J Hum Genet*,71,1(2002):1-13.

36. van bokhoven HaHCJ. p63 Gene mutationa in EE syndrome, Limb-Mammary Syndrome, and Isolated Split Hand-Split Foot Malformation Suggest a Genotype-Phenotype Correlation. *Am.J.Hum.Genet*,69(2001):481-492.

37. Kuster W, Majewski F, Meinecke P. EEC syndrome without ectrodactyly? Report of 8 cases. *Clin Genet*,28,2(1985):130-135.

38. Penchaszadeh VB, de Negrotti TC. Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting (EEC) syndrome: dominant inheritance and variable expression. *J Med Genet*,13,4(1976):281-284.

39. Little NA, Jochemsen AG. p63. *Int J Biochem Cell Biol*,34,1(2002):6-9.

40.The Universal Protein resource. *UniProt* [Oline]. Available from: www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.

41. Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res*,59,17(1999):4165-4169.

42. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*,2,3(1998):305-316.

43. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*,398,6729(1999):714-718.

44. European Molecular Biology Laboratory.*PolyPhen* [Online]. Available from: www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen.

45. Everett ET, Britto DA, Ward RE, Hartsfield JK, Jr. A novel FGFR2 gene mutation in Crouzon syndrome associated with apparent nonpenetrance. *Cleft Palate Craniofac J*,36,6(1999):533-541.

46. Asher JH, Jr., Harrison RW, Morell R, Carey ML, Friedman TB. Effects of Pax3 modifier genes on craniofacial morphology, pigmentation, and viability: a murine model of Waardenburg syndrome variation. *Genomics*,34,3(1996):285-298.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สารละลายและบัฟเฟอร์

1. 2% Agarose gel (w/v)

Agarose	1.6	g
1X TBE	80	ml

Dissolve by heating in microwave oven and occasional mix until no granules of agarose are visible.

2. 7.5 M Ammonium acetate (CH_3COONH_4)

Ammonium acetate	57.81	g
Distilled water	80	ml

Adjust volume to 100 ml with distilled water and sterilize by autoclaving.

3. 0.5 M EDTA (pH 8)

Disodium ethylenediamine tetraacetate.$2H_2O$	186.12	g

Dissolve in distilled water and adjust pH to 8.0 with NaOH

Distilled water to	1,000	ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at room temperature.

4. Ethedium bromide

Ethedium bromide	10	mg
Distilled water	1	ml

Mix the solution and store at 4° C.

5. 6x loading dye

Bromphenol blue	0.25	g
Xylene cyanol	0.25	g
Glycerol	50	ml
1 M Tris (pH 8.0)	1	ml
Distilled water to	100	ml

Mixed and store at 4° C.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. Lysis Buffer I

Sucrose	109.54	g
1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	10	ml
1.0 M $MgCl_2$	5	ml
Triton X –100 (pure)	10	ml
Distilled water to	1,000	ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at 4° C.

7. Lysis Buffer II

5.0 m NaCl	15	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	48	ml
Distilled water to	1,000	ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at room temperature.

8. 1.0 M $MgCl_2$ solution

Magnesium chloride.6H_2O	20.33	g
Distilled water to	100	ml

Dispense the solution into aliquot and sterilize by autoclaving.

9. 25:24:1 (v/v) Phenol-chloroform-isoamyl alcohol

Phenol	25	volume
Chloroform	24	volume
Isoamyl alcohol	1	volume

Mix the reagent and store in a sterile bottle kept in a refrigerater.

10. 5 M NaCl solution

Sodium chloride	29.25	g
Distilled water to	100	ml

Dispense the solution into aliquot and sterilize by autoclaving.

11. 20 mg/ml Proteinase K

Proteinase K	2	mg
Distilled water to	1	ml

Mix the solution and store at -20° C.

12. 10% SDS Solution

Sodium dodecyl sulfate	10	g
Distilled water to	100	ml

Mix the solution and store at room temperature.

13. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

Tris-base	108	g
Boric acid	55	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	ml

Adjust volume to 1,000 ml with distilled water. The solution was mixed and store at room temperature.

14. TE buffer

1.0 M Tris-HCl	5	ml
0.5 M EDTA	1	ml

Adjust volume to 500 ml with distilled water. The solution was mixed and store at room temperature.

15. 1.0 M Tris-HCl

Tris base	12.11	g

Dissolve in distilled water and adjusted pH to 7.5 with HCl

Distilled water to	100	ml

Sterilize the solution by autoclaving and store at room temperature.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเพชรรัตน์ เลยกลาง เกิดเมื่อวันที่ 25 มิถุนายน พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดนครราชสีมา พ.ศ. 2545 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีในสาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ พ.ศ. 2546 เข้าศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย