

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน CYP21A2 ในผู้ป่วยไทยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATION ANALYSIS OF THE *CYP21A2* GENE IN THAI PATIENTS WITH 21-
HYDROXYLASE DEFICIENCY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน CYP21A2 ในผู้ป่วยไทย ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส
โดย	นายนิธิพัฒน์ ตันตรีภักดิ์ธรรม
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.สุรัสวดี อิศวรรตน์)	

นิพนธ์ ดันดิรักษธรรม : การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยไทยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส. (MUTATION ANALYSIS OF THE *CYP21A2* GENE IN THAI PATIENTS WITH 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ภัทธา ยี่ทอง

โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มโรคต่อมหมวกไตชั้นนอก มากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยโรคนี้มีสาเหตุมาจากภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส โดยถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนออโตโซม ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ที่มีหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ในวิธีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ของฮอร์โมนคอร์ติซอล ยีน *CYP21A2* อยู่ในกลุ่มยีนที่มีโครงสร้างซ้ำซ้อน เนื่องจากยีน *CYP21A2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับยีนเทียม *CYP21A1P* สูงถึงร้อยละ 98 ส่งผลให้เกิดการครอสโอเวอร์ไม่ตรงกันในระหว่างแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส บางแอลลีลมีการขาดหายขนาดใหญ่และได้ผลิตภัณฑ์เป็นยีนลูกผสมกับยีนเทียมที่ไม่สามารถทำงานได้ และบางแอลลีลมียีนคอนเวอร์ชัน ทำให้ส่วนหนึ่งของยีน *CYP21A2* ถูกแทนที่ด้วยส่วนหนึ่งของยีนเทียม *CYP21A1P* ส่วนที่ถูกแทนที่ดังกล่าวจึงได้รับการแปรผันทางพันธุกรรมที่พบบนยีนเทียม *CYP21A1P* มาด้วย การกลายพันธุ์เหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยหลักการของแซงเกอร์หรือเทคนิค MLPA เพียงเทคนิคเดียว การศึกษานี้ใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส (locus-specific PCR) ร่วมกับเทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวตามเวลาจริงแบบสายยาว (long-read single molecule real-time sequencing, long-read SMRT sequencing) ในการหาการกลายพันธุ์ในบริเวณที่ซับซ้อนและสามารถพบการกลายพันธุ์ทั้งหมดในผู้ป่วยไทยจำนวน 49 ราย โดยชนิดของการกลายพันธุ์ที่พบ ได้แก่ การกลายพันธุ์ตำแหน่งตัดเชื่อม การกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนรหัส การกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุด การกลายพันธุ์แบบเลื่อนกรอบ และการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน โดยพบการกลายพันธุ์ตำแหน่ง IVS2-13A/C>G จำนวน 37 แอลลีล เป็นตำแหน่งที่มีความถี่แอลลีลสูงที่สุด มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.378 นอกจากนี้ ยังพบการกลายพันธุ์ใหม่ตำแหน่ง IVS7+1G>T ซึ่งเป็นตำแหน่งที่น่าจะมีผลกระทบต่อตำแหน่งตัดเชื่อม การใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส ร่วมกับเทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวตามเวลาจริงแบบสายยาวนี้ สามารถหาสาเหตุทางพันธุกรรมของยีน *CYP21A2* ที่มีความซับซ้อนได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมแก่ผู้ป่วยและครอบครัวได้

สาขาวิชา พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6171990723 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: single nucleotide real-time (SMRT) sequencing, long-read sequencing,
CYP21A2, 21-hydroxylase deficiency, congenital adrenal hyperplasia

Nithiphut Tantirukdham : MUTATION ANALYSIS OF THE *CYP21A2* GENE IN THAI PATIENTS WITH 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY. Advisor: Asst. Prof. Dr. PATRA YEETONG, Ph.D.

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most common inherited adrenal disorders. More than 90% of the cases are 21-hydroxylase deficiency (21-OHD). It is an autosomal recessive inheritance. CAH is caused by the mutations in *CYP21A2* gene encoding for steroidogenic enzymes that involve in cortisol synthesis. The *CYP21A2* gene is located in a part of a complicated structure which has high degree of sequence homology (98%) between the functional *CYP21A2* gene and the non-functional *CYP21A1P* pseudogene, leading to a high recombination rate of this locus during meiosis and subsequent unequal crossover of sister chromatids. The possible consequences include an allele with a large gene deletion, thereby producing a nonfunctional chimeric pseudogene. Some alleles with a gene conversion cause the part of the *CYP21A2* gene to be replaced by the part of the *CYP21A1P*. The replaced part has the genetic variation found on the *CYP21A1P* gene as well. These mutations cannot investigate by Sanger sequencing or MLPA. In this study, a locus-specific PCR and a long-read single molecule real-time (SMRT) sequencing were performed for investigating the mutations in the complex region. We successfully identified all biallelic *CYP21A2* mutations in 49 Thai patients including splice site mutation, missense mutation, nonsense mutation, frameshift mutation and large gene deletion. The most common mutation, IVS2-13A/C>G, was identified in 37 alleles (allele frequency 0.378). In addition, the newly identified splicing mutation, IVS7+1G>T, affecting a donor splice site disruption was detected. We effectively used combined methods, a locus-specific PCR and a long-read single molecule real-time sequencing, to identify the mutations in *CYP21A2* gene which can use the information to provide genetic counseling appropriate for patients and families.

Field of Study: Genetics

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากท่านผู้มีอุปการคุณ หน่วยงานต่าง ๆ และผู้ป่วยทุกท่านที่เข้าร่วมและอนุเคราะห์ตัวอย่างให้แก่การศึกษาวิจัยในฐานะตัวแทนประชากร ซึ่งมีความสำคัญต่อวิทยานิพนธ์นี้ และเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยด้านเวชพันธุศาสตร์ของประเทศไทย ผู้วิจัยขอบพระคุณไว้ในโอกาสนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง อาจารย์ประจำสาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ให้แนวทางเกี่ยวกับหัวข้อวิทยานิพนธ์ แนะนำวางแผนการเรียนเมตตาธิบดีเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และกรุณาสละเวลาเอาใจใส่ ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ศาสตราจารย์ นพ. วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้กรุณาให้ความรู้ทางด้านเวชพันธุศาสตร์ทุกแง่มุม ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน ทั้งเชิงกว้างและเชิงลึก ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ ชี้แนะวิธีการแก้ปัญหาที่เหมาะสม เป็นต้นแบบและแรงบันดาลใจในการทำงาน

รองศาสตราจารย์ พญ. ธนินี สหกิจรุ่งเรือง ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้กรุณาสับสนุนข้อมูลทางคลินิกและตัวอย่างผู้ป่วยแก่การศึกษาวิจัยนี้

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัสวดี อัครรัตน์ ได้กรุณาให้ความรู้ ความคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และคำแนะนำระหว่างศึกษาวิจัยและทำวิทยานิพนธ์นี้

เจ้าหน้าที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเวชพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์อนุพันธุศาสตร์เพื่อการวินิจฉัยโรค โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่กรุณาช่วยเหลือและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์นี้

ทุนค่าเล่าเรียน วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ และทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการ “สร้างเสริมพลังสุขภาพ ก้าวสู่ศตวรรษที่ 2” จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณประเสริฐ คุณพรรณี ดันตริภักษ์ธรรม บิดามารดาผู้มีพระคุณ ประกอบด้วยพรหมวิหาร 4 เป็นต้นแบบทางกายต้นแบบทางจิตใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณกัลยาณมิตรทุกท่านที่เป็นกำลังใจและช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้

นิธิพัฒน์ ดันตริภักษ์ธรรม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
คำสำคัญ.....	4
คำถามการวิจัย.....	4
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย.....	4
จริยธรรมการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (congenital adrenal hyperplasia, CAH).....	7
ภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD).....	9
วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (steroidogenesis pathway).....	9
ยีน cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2 gene).....	11

ยีนเทียม (pseudogenes).....	12
การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic variant)	14
ลักษณะทางคลินิกของโรคและความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์และจีโนไทป์ (phenotype-genotype correlation).....	16
เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวตามเวลาจริงแบบสายยาว (long-read single molecule real-time sequencing, long-read SMRT sequencing)	18
เทคนิคอื่นที่นิยมใช้ตรวจหาการแปรผันทางพันธุกรรมในโรคนี้.....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	19
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	19
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	20
โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
กลุ่มตัวอย่าง	22
วิธีดำเนินงานวิจัย	22
บทที่ 4 ผลการศึกษา	28
1. กลุ่มตัวอย่าง.....	28
2. การยินยอมเข้าร่วมโครงการ	28
3. ผลการเก็บตัวอย่างเลือด.....	28
4. ผลการสกัดสารพันธุกรรม.....	28
5. ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสและ การวิเคราะห์การเกิดยีนลูกผสมจากขนาดสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	28
6. ผลการเตรียมคลังดีเอ็นเอ สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีหาลำดับ นิวคลีโอไทด์แบบสายยาว.....	32
7. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลหาตำแหน่งการกลายพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว	38
8. วิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วย	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	43

สรุปผลการวิจัย.....	43
อภิปรายผลการวิจัย.....	47
ข้อเสนอแนะ.....	51
บรรณานุกรม.....	52
ภาคผนวก.....	62
ประวัติผู้เขียน.....	78



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับแต่ละโลคัส.....	23
ตารางที่ 2 ส่วนผสมของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบจำเพาะโลคัส	24
ตารางที่ 3 ภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบจำเพาะโลคัส	24
ตารางที่ 4 ผลลัพท์เป้าหมายจากไพรมเมอร์ทั้ง 4 คู่.....	25
ตารางที่ 5 ผลการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสของผู้ป่วยแต่ละราย	31
ตารางที่ 6 การแปรผันพันธุกรรมของผู้ป่วยแต่ละรายจากเทคโนโลยี SMRT sequencing (No amplicon 1 = ตรวจไม่พบยีน CYP21A2).....	39
ตารางที่ 7 ความถี่ของตำแหน่งการแปรผันพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยทั้งหมดด้วยเทคโนโลยี SMRT sequencing ตามเกณฑ์คัดเข้า	40
ตารางที่ 8 การแปรผันทางพันธุกรรมทั้งหมดของผู้ป่วยรายที่ 11	42
ตารางที่ 9 ระดับความรุนแรงของการกลายพันธุ์ต่อโครงสร้างของโปรตีนของผู้ป่วยรายที่ 11 ด้วยโปรแกรม Polyphen-2	42
ตารางที่ 10 ข้อมูลสรุปจีโนไทป์คู่แอลลีลของผู้ป่วยแต่ละราย	46
ตารางที่ 11 ความถี่แอลลีลประชากรชาวไทยในการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้านี้.....	48

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพลักษณะอวัยวะเพศกำกวม (ผู้ป่วยเพศหญิงวัย 2 ขวบ) (Ko & Yeh, 2015).....	8
ภาพที่ 2 วิธีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (Speiser et al., 2018).....	10
ภาพที่ 3 RCCX modules.....	12
ภาพที่ 4 การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค 9 ตำแหน่งที่มาจากยีนเทียม (Wedell, 1998). 16	16
ภาพที่ 5 หลักการและการทำงานของเทคโนโลยี SMRT sequencing.....	20
ภาพที่ 6 เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ 2 ชั้นที่ทับซ้อนกันบางส่วน (Carvalho et al., 2012).....	22
ภาพที่ 7 ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันทั้ง 4 คู่.....	24
ภาพที่ 8 การเตรียมคลังดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเทคโนโลยี SMRT sequencing (Wenger et al., 2019).....	28
ภาพที่ 9 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 1-1.....	32
ภาพที่ 10 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 1-2.....	34
ภาพที่ 11 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 2-1.....	34
ภาพที่ 12 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 2-2.....	35
ภาพที่ 13 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของตัวอย่างควบคุมผลลบ.....	35
ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานของขนาดดีเอ็นเอ.....	36
ภาพที่ 15 ผลอิเล็กทรอนิกส์แสดงขนาดดีเอ็นเอของคลังดีเอ็นเอทั้งหมด.....	37

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (congenital adrenal hyperplasia, CAH) เป็นโรคต่อมหมวกไตผิดปกติที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มโรคต่อมหมวกไตที่ผู้ป่วยมีลักษณะอวัยวะเพศกำกวม (ambiguous genitalia) โดยร้อยละ 90 ถึงร้อยละ 95 มีสาเหตุมาจากภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD) โรค CAH นี้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนอโตโซม (autosomal recessive inheritance) (P. C. White & Speiser, 2000) เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* มีหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase, 21-OH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome ชนิด P450c21 ที่สำคัญต่อกระบวนการไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) (Y. Higashi, Yoshioka, Yamane, Gotoh, & Fujii-Kuriyama, 1986) เอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในวิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (steroidogenesis pathway) ของฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol hormone) และฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน (aldosterone hormone) ของต่อมหมวกไตชั้นนอก (adrenal cortex) (Miller & Auchus, 2011)

ภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จึงทำให้ผู้ป่วยขาดฮอร์โมนคอร์ติซอลและฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน (Speiser et al., 2018) เมื่อเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ส่งผลให้ปฏิกิริยา hydroxylation ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นจาก 17-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (17-hydroxyprogesterone, 17-OHP) ไปเป็น 11-ดีออกซีคอร์ติซอล (11-deoxycortisol) ในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอลลดลงและการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ไปเป็น 11-ดีออกซีคอร์ติโคสเตอโรน (11-deoxycorticosterone, DOC) ในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนแอลโดสเตอโรนก็ลดลงเช่นเดียวกัน จนเกิดการคั่งของสารตั้งต้น ได้แก่ ฮอร์โมน 17-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน ฮอร์โมน 17-ไฮดรอกซีเพรกนิโนโลน (17-hydroxypregnenolone) และฮอร์โมนเพรกนิโนโลน (pregnenolone) สารตั้งต้นเหล่านี้จึงหันไปสู่กระบวนการสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) ของต่อมหมวกไต

ทำให้มีการสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนเพิ่มขึ้น ผู้ป่วยจึงมีปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมากกว่าปกติ (Miller & Auchus, 2011; Speiser et al., 2018; Speiser et al., 2010)

ยีน *CYP21A2* เป็นยีนที่ทำงานได้สำหรับเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ที่หลั่งออกมาจากต่อมหมวกไต ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 6 ตำแหน่ง 21.3 (6p21.3) ใน RCCX module (*RP-C4-CYP21-TNX*) ของกลุ่มยีน human leukocyte antigen (HLA) ซึ่งเป็น major histocompatibility complex (MHC) class III ในมนุษย์ ที่โครงสร้างมีความซับซ้อน (Lee, 2005) ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ ยีน *STK* (serine/threonine nuclear protein kinase, เดิมชื่อยีน *RP*) (Shen et al., 1994) ยีน *complement component C4* ยีน *CYP21* (steroid 21-hydroxylase) และยีน *TNX* (tenascin-X) (Gitelman, Bristow, & Miller, 1992) (Bristow, Tee, Gitelman, Mellon, & Miller, 1993) โดยปกติจะจัดเรียงแบบไบโมดูลาร์ (bimodular) ประกอบด้วย RCCX module จำนวน 2 ชุด ชุดหนึ่งที่มียีนเทียม *CYP21A1P* ส่วนอีกชุดมียีน *CYP21A2* ซึ่งการเรียงตัวของยีนจากเทโลเมียร์ถึงเซนโทรเมียร์คือ *RP1-C4A-CYP21A1P-TNPA-RP2-C4A CYP21A2-TNXB* โดยพบแฮพลไทป์แบบไบโมดูลาร์นี้ที่ร้อยละ 69 ของประชากรชาวคอเคเซียน ในขณะที่แฮพลไทป์แบบโมโนโมดูลาร์ พบประมาณร้อยละ 17 และพบแฮพลไทป์แบบไตรโมดูลาร์ เพียงร้อยละ 14 ของผู้ป่วย (Yang, Mendoza, Welch, Zipf, & Yu, 1999) (Blanchong et al., 2000) โดยยีน *CYP21A2* ห่างจากยีนเทียม *CYP21A1P* ที่ทำงานไม่ได้ประมาณ 30 กิโลเบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP21A2* และยีนเทียม *CYP21A1P* มีความเหมือนกันในระดับที่สูง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนเอกซอนมีความเหมือนกันถึงร้อยละ 98 และร้อยละ 96 ในส่วนอินทรอน (Yang et al., 1999) ซึ่งยีน *CYP21A2* และยีนเทียม *CYP21A1P* ประกอบด้วยสับเอกซอนเท่ากัน แต่ที่ยีนเทียมไม่ทำงานเนื่องจากการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคการมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (sequence homology) เกือบทั้งยีน ทำให้เกิดการเข้าคู่และถ่ายโอนลำดับนิวคลีโอไทด์กันระหว่างยีนจริงและยีนเทียมในกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Balsamo, Baldazzi, Menabo, & Cicognani, 2010) ผ่านกระบวนการครอสโอเวอร์ที่ไม่ตรงกัน (unequal crossover) ทำให้เกิดยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement และยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera ที่มีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน (large gene deletion) (Narasimhan & Khattab, 2019) และสามารถเกิดการกลายพันธุ์แบบคอนเวอร์ชัน (conversion) ที่มีการถ่ายโอนลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนเทียม *CYP21A1P* มาที่ยีน *CYP21A2* อีกด้วย

เทคนิคเซาเทิร์นบลอตไฮบริไดเซชัน (southern blot hybridization) เป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมนำมาใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่มีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีนและการกลายพันธุ์แบบคอนเวอร์ชัน แต่มีข้อจำกัดมากเกี่ยวกับใช้เวลาปฏิบัติการนาน อาศัยทักษะทางห้องปฏิบัติการ ใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และต้องใช้สารพันธุกรรมตั้งต้นปริมาณมาก และยังมีข้อจำกัดในการตรวจหายีนลูกผสม (Lee, Lee, & Chao, 2010) ต่อมาเทคนิค multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลสำหรับวินิจฉัยภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งได้รับการพัฒนาเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดข้างต้นให้สามารถทำได้ง่ายขึ้น รวดเร็วขึ้น และได้ข้อมูลที่ต้องการมากยิ่งขึ้น (Sorensen et al., 2008; Vrzalova, Hrabincova, Fajkusova, Vseticka, & Kozak, 2008) (Concolino et al., 2009) เมื่อไม่นานมานี้มีการนำเทคนิค MLPA มาใช้ควบคู่กับการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส (locus-specific PCR) ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease analysis) เพื่อตรวจหายีนลูกผสมที่มีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน และใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยหลักการของแซงเกอร์ (Sanger sequencing) สำหรับการตรวจหาคอนเวอร์ชันด้วย (Ma et al., 2014)

อย่างไรก็ตาม เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง ยังคงมีข้อจำกัด ใช้เวลานาน มีความยุ่งยากและจำเป็นต้องใช้โพรเมอร์จำนวนหลายคู่ ในปัจจุบัน วิธีการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสได้รับการพัฒนาเรื่อยมา เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่มีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีนที่มีความจำเพาะกับยีนโดยตรง ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือ (Ma et al., 2014) ทั้งนี้ ผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ต้องมีการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ทั้งสองแอลลีล เนื่องจากโรคนี้มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อย ดังนั้น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ของ *CYP21A2* ทั้งสองแอลลีล และผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) หรือเฮมิไซกัส (hemizygous) ของยีน *CYP21A2* เพียงหนึ่งแอลลีล ส่วนอีกแอลลีล อาจจะมีการกลายพันธุ์แบบคอนเวอร์ชันในยีน *CYP21A2* เช่น การกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ได้แก่ การแทนที่ (substitution) และการสอดแทรก (insertion) เป็นต้น ซึ่งต้องใช้วิธีการอื่นในการช่วยวิเคราะห์เพื่อระบุการกลายพันธุ์ เช่น เทคนิค MLPA เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยหลักการของแซงเกอร์ หรือเทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ (next-generation sequencing, NGS) แบบสายยาว (long-read) เป็นต้น

เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบัน ก้าวเข้าสู่เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ ที่สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอได้พร้อม ๆ กัน จำนวนมากในเวลาเดียวกัน (massively parallel sequencing) ดังนั้น ผู้ศึกษาจึงใช้วิธีการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสร่วมกับเทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวตามเวลาจริงแบบสายยาว (long-read single molecule real-time sequencing, long-read SMRT sequencing) เพื่อตรวจหาคำแหน่งกลายพันธุ์ในผู้ป่วยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติ ตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ในประเทศไทย จำนวน 49 ราย ซึ่งมีประโยชน์ในการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมต่อผู้ป่วยและครอบครัวได้

คำสำคัญ

congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase deficiency, *CYP21A2* gene, locus-specific PCR, long-read SMRT sequencing

คำถามการวิจัย

ชนิดของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยไทยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จำนวน 49 ราย

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาชนิดของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยไทยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จำนวน 49 ราย

ขอบเขตการวิจัย

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยที่ได้รับการจำแนกลักษณะทางคลินิก เข้าได้กับโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญแผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 49 ราย ด้วยวิธี locus-specific PCR ร่วมกับ long-read SMRT sequencing

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการรับรอง (รหัสอนุมัติ IRB no. 954/2016) จากที่ประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลจากการศึกษานี้ช่วยให้แพทย์มีการวินิจฉัยโรคที่ชัดเจน เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาและได้รับคำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมตั้งแต่แรกวินิจฉัยได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้ มีดำเนินการด้วยขั้นตอนการวิจัย 8 ขั้นตอน ดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่าง กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ผู้วิจัยรับผู้ป่วยเข้าศึกษาในโครงการ ก็ต่อเมื่อ ผู้ป่วยและครอบครัวยินยอมเข้าร่วมโครงการ โดยการศึกษานี้จะวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน CYP21A2

2. การยินยอมเข้าร่วมโครงการ ผู้ป่วยหรือผู้ปกครองจะต้องลงนามยินยอมในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย และโครงการวิจัยต้องผ่านการพิจารณาและได้รับการรับรองจากที่ประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เก็บตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เพื่อนำมาสกัดสารพันธุกรรม

4. สกัดสารพันธุกรรม สารพันธุกรรมจะถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยทุกรายที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ด้วยวิธีการของ Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

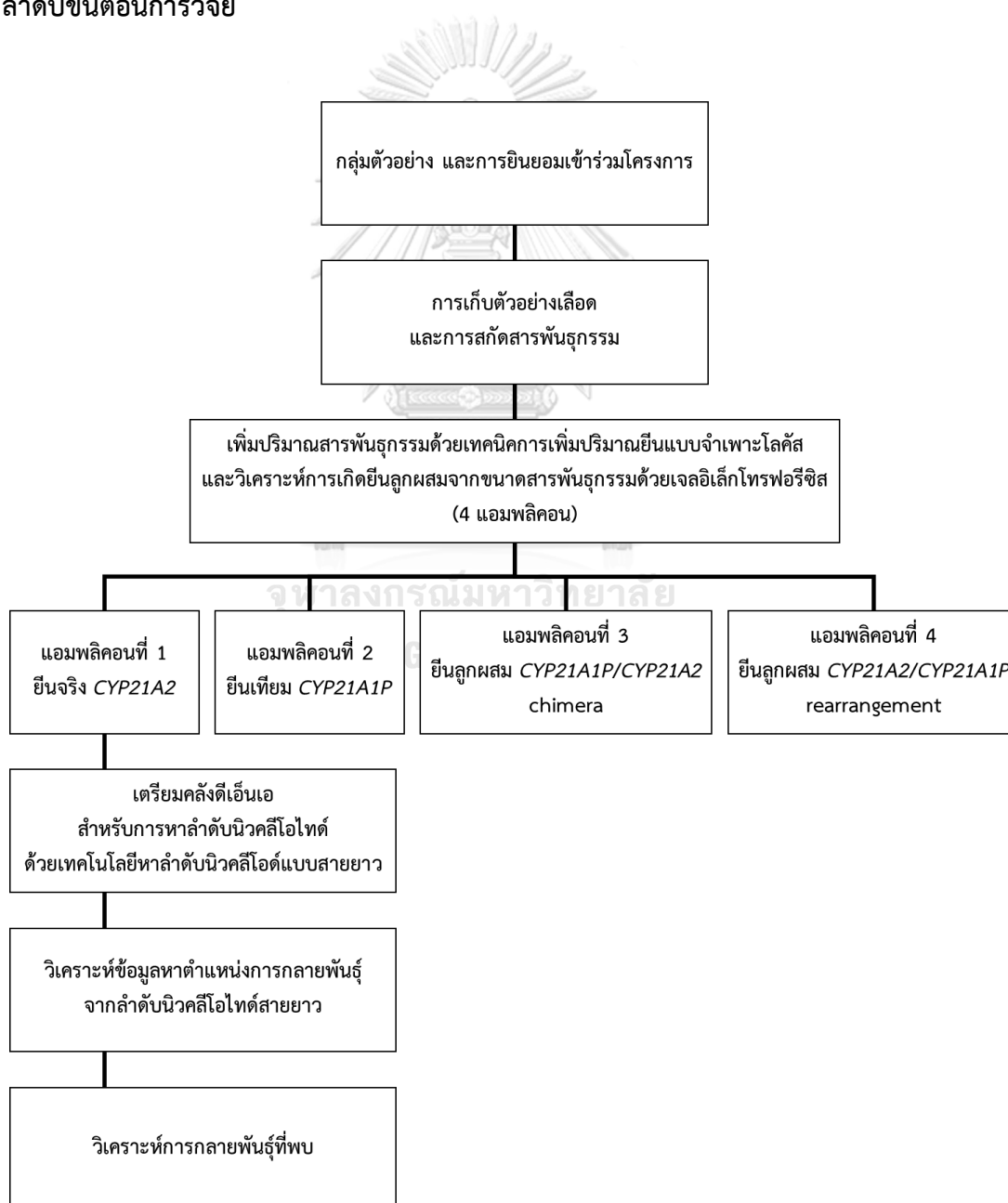
5. เพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี locus-specific PCR และวิเคราะห์การเกิดยีนลูกผสมจากขนาดของสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

6. เตรียมคลังแอมพลิคอน (amplicon library preparation) สำหรับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี long-read SMRT sequencing

7. วิเคราะห์ข้อมูลหาตำแหน่งการกลายพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวด้วยโปรแกรม GenomeBrowse ของบริษัท Golden Helix, Montana, USA

8. วิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วย (mutation prediction analysis) ด้วยโปรแกรม Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) เพื่อทำนายความรุนแรงของการกลายพันธุ์ต่อโครงสร้างของโปรตีน

ลำดับขั้นตอนการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (congenital adrenal hyperplasia, CAH)
- ภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD)
- วิธีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (steroidogenesis pathway)
- ยีน cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (*CYP21A2* gene)
- ยีนเทียม (pseudogene)
- การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิด (pathogenic variant)
- ลักษณะทางคลินิกของโรคและความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์และจีโนไทป์ (phenotype-genotype correlation)
- เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวตามเวลาจริงแบบสายยาว (long-read Single Molecule Real-Time sequencing, long-read SMRT sequencing)
- เทคนิคอื่นที่นิยมใช้ตรวจหาการแปรผันทางพันธุกรรมในโรคนี้

โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (congenital adrenal hyperplasia, CAH)

โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลุ่มฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) กลุ่มฮอร์โมนมินเนอราโลคอร์ติคอยด์ (mineralocorticoids) และกลุ่มฮอร์โมนเพศ (sex steroid) จากสารตั้งต้นกลุ่มโคเลสเตอรอล (cholesterol) โดยต่อมหมวกไต (adrenal glands) โรคนี้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบยีนด้อยบนออโตโซม ผู้ป่วยในกลุ่มโรคนี้ ส่วนใหญ่จะมีความผิดปกติเกี่ยวกับการผลิตฮอร์โมนเพศที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไป ทำให้ผู้ป่วยมีพัฒนาการทางเพศผิดไปจากปกติ เช่น ภาวะลักษณะ

อวัยวะเพศกำกวม (รูปที่ 1) ซึ่งพบได้ทั้งในวัยทารก วัยเด็ก และวัยผู้ใหญ่ (Jayakrishnan, Lao, Adams, Ward, & Merke, 2019) (Al-Mendalawi, 2018) (Gondim, Teles, & Barroso Jr, 2018) และในผู้ป่วยบางรายมีภาวะพร่องฮอร์โมนมินเนอราโลคอร์ติคอยด์ (mineralocorticoids hormone) ที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของน้ำและเกลือแร่ ฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ ฮอร์โมนคอร์ติซอลและฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน ซึ่งควบคุมการดูดกลับโซเดียมและคลอไรด์ของไต หากผู้ป่วยขาดฮอร์โมนคอร์ติซอลหรือฮอร์โมนแอลโดสเตอโรนจะทำให้ร่างกายผู้ป่วยสูญเสียน้ำและโซเดียมไปทางปัสสาวะ ส่งผลให้ปริมาตรเลือดในร่างกายลดลงจนความดันเลือดต่ำลง เกิดภาวะสูญเสียน้ำเกลืออย่างรุนแรง (severe salt-wasting) และนำไปสู่การเสียชีวิตได้ ทั้งนี้ ในหลายประเทศมีการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด (newborn screening) สำหรับโรคนี้ เพื่อประกอบการวินิจฉัยและการรักษาอาการเบื้องต้น (Speiser et al., 2018) อาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติ ได้แก่

1. Mineralocorticoids Inadequacy มีอาการอาเจียน เนื่องจากการสูญเสียน้ำเกลือแร่ นำไปสู่ภาวะขาดน้ำ (dehydration) ภาวะของเหลวในร่างกายพร่อง (hypovolemic) ภาวะหมดสติ และเสียชีวิต
2. Excess Androgens ในเพศชาย มีขนบนใบหน้ามากกว่าปกติ อวัยวะเพศพัฒนาเร็ว องคชาติมีขนาดใหญ่กว่าปกติ แต่ลูกอัณฑะเล็กและไม่มีสุจิ ในเพศหญิง อวัยวะเพศมีลักษณะกำกวม ประจำเดือนผิดปกติ เกิดภาวะมีบุตรยาก คลิตอริสมีขนาดใหญ่ แต่ช่องคลอดตัน
3. มีขนที่อวัยวะเพศก่อนวัย ในเด็กมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปกติ



ภาพที่ 1 ภาวะลักษณะอวัยวะเพศกำกวม (ผู้ป่วยเพศหญิงวัย 2 ขวบ) (Ko & Yeh, 2015)

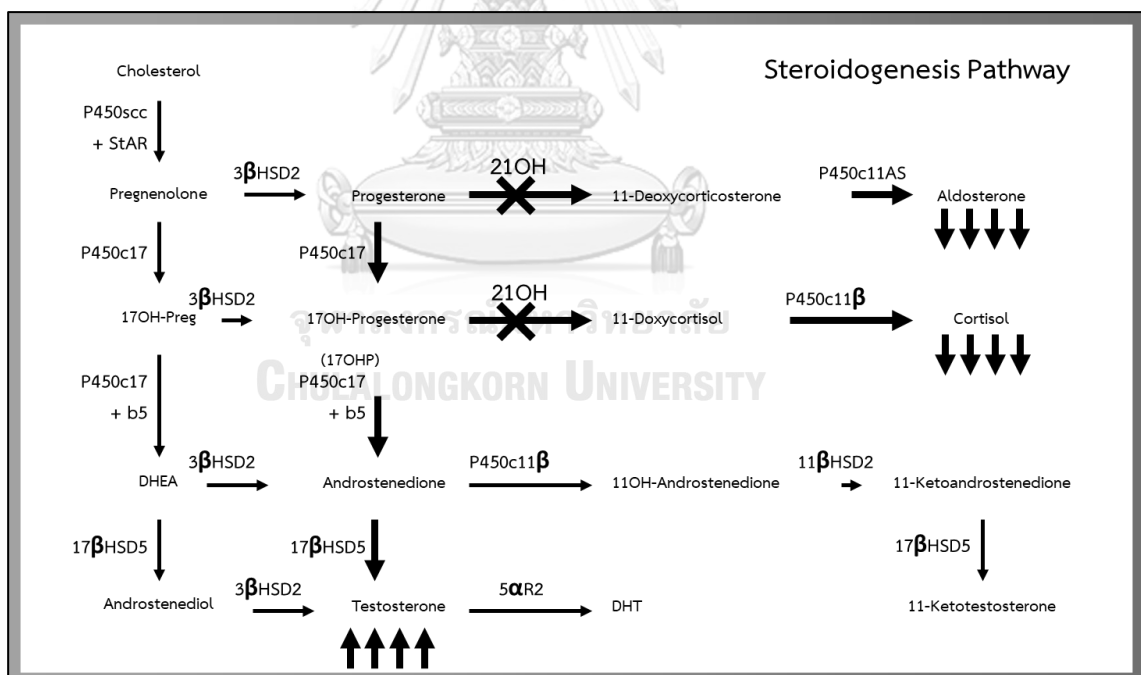
ภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD)

โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์แบบ ยีนคอนเวอร์ชันและการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน *CYP21A2* การกลายพันธุ์เช่นนี้ทำให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งพบได้ร้อยละ 90 ถึงร้อยละ 95 ของจำนวนผู้ป่วยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติ การกลายพันธุ์ดังกล่าวสามารถพบได้มาก โดยมีความชุกของโรค (prevalence) เป็น 1 ใน 60 ของประชากรทั่วไป และความชุกจะเพิ่มขึ้นเป็น 1 ใน 3 ของประชากรที่มีขนาดเล็ก โดยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส สามารถพบได้ในทุกประชากรทั่วโลก ในขณะที่โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 11-เบต้าไฮดรอกซิเลส (11-beta-hydroxylase) พบเพียงในประชากรที่มีเชื้อสายอิหร่าน (Iranian) ยิว (Jewish) และโมร็อกโก (Moroccan) (Apóstolos et al., 2018) (Speiser et al., 2018) ส่วนระดับความรุนแรงของโรคและการแสดงลักษณะฟีโนไทป์ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการกลายพันธุ์ หรือขนาดของการขาดหายของยีน (Neocleous, Fanis, Phylactou, & Skordis, 2018) และมีการพบผู้ป่วยโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติจำนวนมากในกลุ่มคนอเมริกันพื้นเมือง (Native Americans) และกลุ่มคนเอสกีโม (Eskimos) สำหรับกลุ่มคนอเมริกันผิวขาว (White American) อุบัติการณ์ของโรคประมาณ 1 ใน 15000 (Milyani, Al-Agha, & Al-Zanbagi, 2018) และเคยมีรายงานการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยชาวไทยโรคนี้จำนวน 72 ราย (Robert C Wilson et al., 2007)

วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (steroidogenesis pathway)

วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ มีเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ เอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส เอนไซม์ 11-เบต้าไฮดรอกซิเลส และ 17-แอลฟาไฮดรอกซิเลส (17-alpha-hydroxylase) ซึ่งเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสมีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับวิถีที่จะเปลี่ยนสารตั้งต้นไปสู่สารผลิตภัณฑ์กลุ่มฮอร์โมนสเตียรอยด์ทั้งหมด เนื่องจากเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสทำหน้าที่เปลี่ยนฮอร์โมน 17-ไฮดรอกซีโพรเจสเตอโรนให้กลายเป็น 11-ดีออกซีคอร์ติซอลที่จะเป็นสารตั้งต้นสำหรับฮอร์โมนคอร์ติซอล และเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสยังทำหน้าที่เปลี่ยนฮอร์โมนโพรเจสเตอโรนให้กลายเป็น 11-ดีออกซีคortiโคสเตอโรนที่จะเป็นสารตั้งต้นสำหรับฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน ในขณะที่เอนไซม์ 11-เบต้าไฮดรอกซิเลสมีความสำคัญในการสร้างฮอร์โมนคอร์ติซอลและฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) ชนิดดีไฮโดร

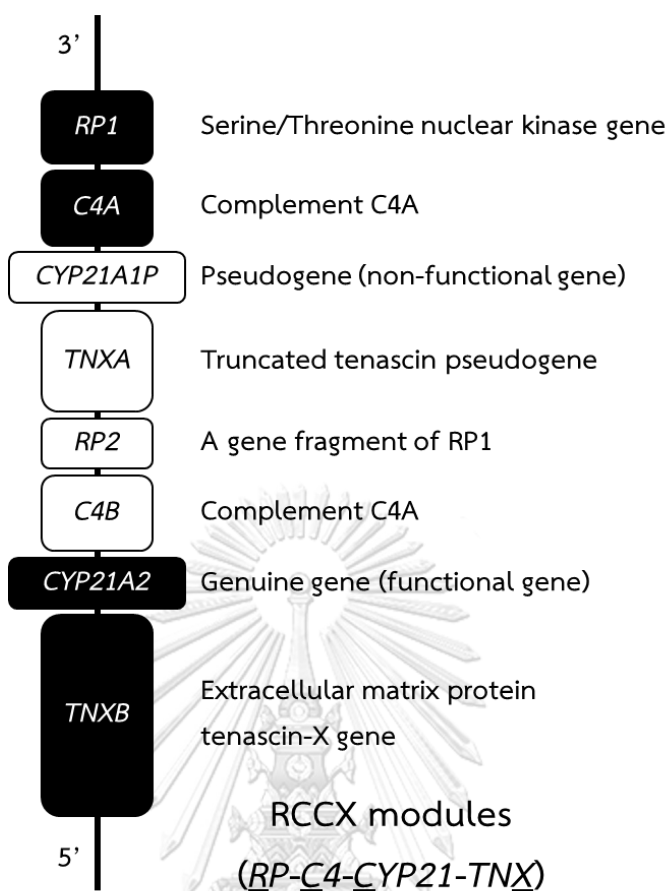
อีพีแอนโดรสเตอโรน (dehydroepiandrosterone, DHEA) (รูปที่ 2) (Speiser et al., 2018) ดังนั้น ภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสจึงทำให้ผู้ป่วยขาดฮอร์โมนคอร์ติซอลและฮอร์โมนแอลโดสเทอโรน (Speiser et al., 2018) เมื่อเกิดภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสในปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของฮอร์โมนโพเรเจสเทอโรนในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นจาก 17-ไฮดรอกซีโพเรเจสเทอโรนไปเป็น 11-ดีออกซีคอร์ติซอลในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอล และการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นจากฮอร์โมนโพเรเจสเทอโรนไปเป็น 11-ดีออกซีคอร์ติโคสเตอโรนในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนแอลโดสเทอโรน จึงเกิดการคั่งของสารตั้งต้น ได้แก่ ฮอร์โมน 17-ไฮดรอกซีโพเรเจสเทอโรน ฮอร์โมน 17-ไฮดรอกซีเพรกนิโนโลน ฮอร์โมนเพรกนิโนโลน และฮอร์โมนโพเรเจสเทอโรนเพิ่มมากขึ้น สารตั้งต้นเหล่านี้จึงหันไปสู่วิถีการสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนของต่อมหมวกไต ทำให้มีการสร้างฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพิ่มขึ้นกว่าปกติ (Miller & Auchus, 2011; Speiser et al., 2018; Speiser et al., 2010)



ภาพที่ 2 วิธีกำรสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ (Speiser et al., 2018)

ยีน cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (*CYP21A2* gene)

ส่วนใหญ่โรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส โดยกว่าร้อยละ 95 ของจำนวนผู้ป่วย มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติหรือการกลายพันธุ์ที่อยู่ในยีน *CYP21A2* ซึ่งถอดรหัสและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ยีน *CYP21A2* อยู่ใน RCCX module (รูปที่ 3) ของกลุ่มยีน major histocompatibility complex (MHC) class III บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 6 ตำแหน่ง 21.3 (6p21.3) ที่โครงสร้างมีความซับซ้อน (Lee, 2005) ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ ยีน *STK* (serine/threonine nuclear protein kinase, เดิมชื่อยีน *RP*) (Shen et al., 1994) ยีน *complement component C4* ยีน *CYP21* (steroid 21-hydroxylase) และยีน *TNX* (tenascin-X) (Bristow et al., 1993; Gitelman et al., 1992) โดยปกติจะจัดเรียงแบบไบโมดูลาร์ (bimodular) ประกอบด้วย RCCX module จำนวน 2 ชุด ชุดหนึ่งที่มียีนเทียม *CYP21A1P* ส่วนอีกชุดมียีน *CYP21A2* ซึ่งการเรียงตัวของยีนจากเทโลเมียร์ถึงเซนโทรเมียร์คือ *RP1-C4A-CYP21A1P-TNPA-RP2-C4A CYP21A2-TNXB* (Blanchong et al., 2000; Yang et al., 1999) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโครงสร้างนี้มีความยาวทั้งสิ้น 30,000 เบส เนื่องจากยีน *CYP21* ในโครงสร้างดังกล่าว มีทั้งยีน *CYP21A2* ซึ่งเป็นยีนจริง (genuine gene) ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันกับยีน *CYP21A1P* ซึ่งเป็นยีนเทียม (pseudogene) สูงถึงร้อยละ 98 ในส่วนเอกซอน และร้อยละ 96 ในส่วนอินทรอน (Yang et al., 1999) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบไมโครคอนเวอร์ชันที่มีการถ่ายโอนลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนเทียม *CYP21A1P* มายังยีน *CYP21A2* เป็นผลเนื่องมาจากการมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันเกือบทั้งยีน ทำให้เกิดโอกาสการเข้าสู่และถ่ายโอนลำดับนิวคลีโอไทด์กันระหว่างยีนจริงและยีนเทียมในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) (Balsamo et al., 2010) และเกิดการขาดหายขนาดใหญ่ตั้งแต่ชิ้นส่วนฝั่ง 3' ของยีน *CYP21A1P* ยีน *C4B* ทั้งหมด และชิ้นส่วนฝั่ง 5' ของยีน *CYP21A2* ซึ่งส่วนที่ขาดหายไปมีความยาว 26 หรือ 32 กิโลเบส ขึ้นอยู่กับความยาวของยีน *C4B* ทำให้เกิดยีนลูกผสม chimera ที่ไม่สามารถทำงานได้ ประกอบด้วยชิ้นส่วนฝั่ง 5' ของยีน *CYP21A1P* และชิ้นส่วนฝั่ง 3' ของยีน *CYP21A2* (Concolino et al., 2009; L'Allemand et al., 2000; Lee, 2004; Lee et al., 2003; Perrin C White, New, & Dupont, 1984)



ภาพที่ 3 RCCX modules

ยีนเทียม (pseudogenes) พาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยีนเทียมโดยส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการเพิ่มซ้ำยีน (gene duplication) หรือเรโทรทรานส์โพสิชัน (retrotransposition) ถึงแม้ยีนเทียมจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เกือบทั้งหมดเหมือนกันกับยีนจริงที่ทำงานได้ (functional gene) แต่ก็ไม่สามารถสร้างโปรตีนที่ทำงานได้ (functional proteins) (D'Errico, Gadaleta, & Saccone, 2004) ข้อมูลจากโครงการ GENCODE รายงานว่าจีโนมมนุษย์มียีนเทียมมากกว่า 14,000 โคลด์ส (Pei et al., 2012) ซึ่งมีหลายโคลด์สที่เกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกของผู้ป่วย เช่น *PMS2*, *CYP2D6*, *CHEK2*, *SMN1* และ *PKD1* และมีลักษณะที่สำคัญคือลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันสูง (high sequence homology) ระหว่างยีนเทียมกับยีนจริง (Mandelker et al., 2016) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกันสูงนี้ มีผลกระทบต่อการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการระบุการแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความ

ผิดพลาดอย่างรุนแรงของยีนเทียมในยีนจริงที่เป็นคู่เหมือนกัน ซึ่งอาจจะดูน่าเชื่อถือ (Claes & De Leeneer, 2014) แต่ข้อมูลดังกล่าวอาจจะนำไปสู่ผลการวินิจฉัยที่ผิดพลาด (Bardaro et al., 2003) กล่าวคือ อาจจะได้ผลบวกปลอม (false positive) เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่แบบสายสั้น (short-read next-generation sequencing, SR-NGS) เป็นวิธีการเดิมที่อาจตรวจพบลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนเทียมที่ไม่ได้อยู่ในยีนจริงที่ก่อให้เกิดข้อผิดพลาด ได้แก่ ความผิดพลาดในการเทียบแผนที่ยีน (gene mapping error) อัตราการตรวจพบการแปรผันทางพันธุกรรมต่ำ (low variant detection rate) และผลบวกปลอมสูง (Claes & De Leeneer, 2014) ส่วนประเด็นปัญหาอื่น ๆ เกิดจากข้อเท็จจริงเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนเทียมที่ยังไม่เคยพบในจีโนมอ้างอิงของมนุษย์ (human reference genome) อาจทำให้เกิดปัญหาในการเทียบแผนที่ยีนสำหรับ SR-NGS ดังนั้น การวิเคราะห์บนหลักการของ SR-NGS จึงไม่น่าเชื่อถือสำหรับการตรวจสอบยีนจริงที่มีความเหมือนกันสูงกับยีนเทียม ปัจจุบันมีหลายการศึกษาที่ใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่แบบสายยาว (long-read next-generation sequencing, LR-NGS) เพื่อตรวจสอบความผิดพลาดของยีนจริงที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับยีนเทียมซึ่งเกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกของผู้ป่วย การศึกษาข้างต้นส่วนใหญ่อาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยพีซีอาร์แบบสายยาว (long-range PCR, LR-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ตรงกัน (rare mismatch site) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของยีนจริงที่สนใจออกจากยีนเทียมได้ (Frans et al., 2018) ทั้งนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวสามารถหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดที่เกิดจากบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความซับซ้อนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำ ๆ กันในจีโนมอ้างอิงได้ (Borràs et al., 2017) การศึกษาตัวอย่าง เช่น ยีน *Polycystin (PKD1)* ที่มีหน้าที่เกี่ยวกับโรคถุงน้ำในไตชนิดที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนเด่นบนออโตโซม (autosomal dominant polycystic kidney disease) ซึ่งมีความท้าทายในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ หรือเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยหลักการของแซงเกอร์ เนื่องจากยีนมีบริเวณเบส GC สูง (high GC-content) ยีนมีขนาดใหญ่ และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันกับยีนเทียม (Tan et al., 2014) การศึกษาของ Borràs และคณะ ในปี 2017 แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคโนโลยี LR-PCR ด้วย long-read SMRT sequencing ของบริษัท Pacific Biosciences (PacBio) สามารถกำจัดสิ่งรบกวนจากยีนเทียมของ *PKD1* ในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและกำจัดความคลุมเครือในการวางเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

(alignment ambiguity) จึงสามารถระบุการแปรผันทางพันธุกรรมนิวคลีโอไทด์เดี่ยว (single-nucleotide variants, SVs) ได้ นอกจากนี้ อีกหลายการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของ long-read SMRT sequencing สำหรับการระบุจีโนไทป์ (genotyping) และระบุเฟส (phasing) ของยีน *CYP2D6* หนึ่งในยีนที่สำคัญของระบบเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับยารักษาโรค ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีทั่วไปได้ยาก เนื่องจากยีนมีความเหมือนกันกับยีนเทียมสูงมากและยีนเกิดการจัดเรียงใหม่อย่างซับซ้อน (gene rearrangement) (Ammar, Paton, Torti, Shlien, & Bader, 2015; Buermans et al., 2017; Qiao et al., 2016; Seo et al., 2016) ข้อมูลความถี่ของการแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรที่น่าเชื่อถือมีความสำคัญต่องานวิจัยด้านเวชพันธุศาสตร์ในแง่การประเมินความเป็นไปได้ของการเป็นสาเหตุของโรค (pathogenicity) (Ashley, 2016) ซึ่งมักจะใช้ฐานข้อมูล ExAC และ GnomAD (Lek et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ชุดข้อมูลอ้างอิงที่ได้มาจาก SR-NGS อาจเป็นปัญหาสำหรับยีนที่มีความเหมือนกันกับยีนเทียมสูง ปัญหาส่วนใหญ่ ได้แก่ การแปรผันทางพันธุกรรมที่พบในยีนจริงอาจถ่ายโอนมาจากยีนเทียม การตรวจไม่พบการแปรผันทางพันธุกรรมที่มีอยู่จริง หรือยีนจริงที่สนใจอาจจะถูกคลุมเครือด้วยข้อมูลจากยีนเทียม (Mandelker et al., 2016) จึงสามารถใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวปรับปรุงการให้คำอธิบายประกอบ (annotation) ของบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเนื่องจากการแปรผันทางพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากยีนกำเนิดเดียวกัน (paralogous sequence variant) ได้ (Dougherty et al., 2018) ดังนั้น นอกเหนือจากการแยกแยะยีนจริงออกจากยีนเทียมได้อย่างน่าเชื่อถือมากขึ้นแล้ว long-read SMRT sequencing ยังสามารถใช้ในการสร้างชุดข้อมูลอ้างอิงและการให้คำอธิบายประกอบที่มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้นสำหรับยีนที่มีความน่าสนใจอีกจำนวนมาก และช่วยปรับปรุงการตีความผลเพื่อระบุการแปรผันทางพันธุกรรมที่พบต่อไป

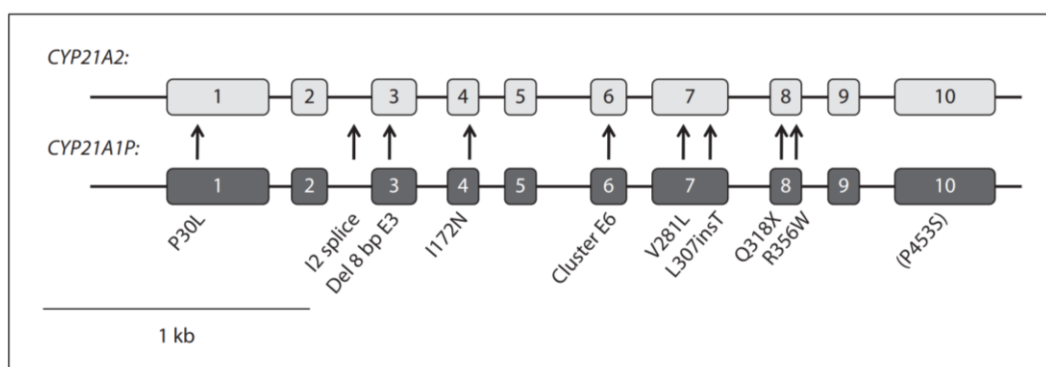
การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic variant)

ยีน *CYP21A2* และยีนเทียม *CYP21A1P* ปรากฏอยู่ในบริเวณที่มีการจัดเรียงใหม่ของยีนหลายยีนเป็นชุดซ้ำกัน ซึ่งเกิดจากกระบวนการเพิ่มซ้ำของยีน (gene duplication) การจัดเรียงใหม่ และการเพิ่มซ้ำนี้เพิ่มโอกาสให้เกิดกระบวนการรีคอมบิเนชัน (recombination) เข้าคู่และแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมกันระหว่างบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในยีนที่เป็นชุดซ้ำกัน กระบวนการรีคอมบิเนชันที่เกิดขึ้นนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค

ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซีเลสในโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิด ผลจากการเกิดรีคอมบิเนชันผ่านการครอสโอเวอร์ไม่ตรงกัน (unequal crossover) ระหว่างยีน *CYP21A2* และยีนเทียม *CYP21A1P* ซึ่งเป็นฮอโมโลกัสกัน สามารถส่งผลให้เกิดการขาดหายหรือการเพิ่มซ้ำของยีน *CYP21A2* ทั้งนี้ ความเหมือนกันมากของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *CYP21A2* และยีนเทียม *CYP21A1P* เป็นการเพิ่มโอกาสให้เกิดยีนคอนเวอร์ชันมากขึ้น (Yujiro Higashi, Tanae, Inoue, Hiromasa, & Fujii-Kuriyama, 1988; Tusie-Luna & White, 1995; Wedell, 1998) ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่มีส่วนหนึ่งของยีน *CYP21A2* ถูกแทนที่ด้วยอีกส่วนหนึ่งของยีนเทียม *CYP21A1P* ดังนั้น ส่วนหนึ่งของยีนเทียม *CYP21A1P* ดังกล่าวซึ่งมีการแปรผันทางพันธุกรรมที่พบได้ทั่วไปบนยีนเทียม จึงถูกถ่ายโอนมาอยู่บนยีนจริงด้วย การแปรผันทางพันธุกรรมเหล่านี้เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค และยับยั้งการทำงานของยีนจริง ยีนจริงจึงไม่สามารถแสดงออกหรือแปลรหัสเป็นโปรตีนปกติได้

สำหรับการเกิดยีนคอนเวอร์ชันขนาดเล็ก (small-scale gene conversion) เป็นที่มาของการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคที่พบได้ทั่วไป เช่น p.P31L, IVS2-13A/C>G, และ p.G111Δ8nt สามารถพบบนแอลลีลเดียวกันและตรวจสอบได้ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส ส่วนการเกิดยีนคอนเวอร์ชันขนาดใหญ่ (large-scale gene conversion) ก็เกิดขึ้นได้เช่นกัน ซึ่งตรวจสอบได้ด้วยวิธีการที่สามารถครอบคลุมบริเวณที่เกิดยีนคอนเวอร์ชันทั้งหมดได้ เช่น เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่แบบสายยาว ทั้งนี้ ประมาณร้อยละ 20 ถึงร้อยละ 30 ของแอลลีลที่มีกลายพันธุ์เป็นผลมาจากการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในยีนที่เป็นชุดซ้ำกันระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส นำไปสู่การขาดหายขนาด 30 กิโลเบส ครอบคลุมตั้งแต่ชิ้นส่วนฝั่งปลาย 3' ของยีนเทียม *CYP21A1P* ยีน *C4B* ทั้งหมด และชิ้นส่วนฝั่งปลาย 5' ของยีน *CYP21A2* ได้ผลิตภัณฑ์เป็นยีนลูกผสมกับยีนเทียมที่ไม่สามารถทำงานได้ (nonfunctional chimeric pseudogene) (Perrin C White, Vitek, Dupont, & New, 1988) การแปรผันทางพันธุกรรมอื่นที่ก่อให้เกิดโรคอย่าง IVS2-13A>G หรือ IVS2-13C>G ปรากฏความถี่แอลลีลที่ร้อยละ 20 ถึงร้อยละ 30 นำไปสู่การตัดเชื่อม (splicing) ตัดส่วนอินทรอนและเชื่อมส่วนเอ็กซอนที่ผิดปกติ ทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนมีขนาดเล็กหรือผิดปกติไป นอกจากนี้ยังมีการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค 9 ตำแหน่งที่อยู่ในยีนเทียม *CYP21A1P* มาส่งผลยับยั้งการทำงานของยีน *CYP21A2* เมื่อมีการถ่ายโอนการแปรผันทางพันธุกรรมดังกล่าวจากยีนเทียม

CYP21A1P ไปยังยีน *CYP21A2* ผ่านการเกิดยีนคอนเวอร์ชัน โดยการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค 9 ตำแหน่งนี้ เกิดร่วมกันระหว่างการขาดหายของยีน *CYP21A2* กับการเกิดยีนคอนเวอร์ชัน คิดเป็นร้อยละ 95 ของแอลลีลบนยีน *CYP21* ทั้งหมดที่เป็นสาเหตุของโรค (รูปที่ 4) (Wedell, 1998) ในปัจจุบัน การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค ทั้งที่เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมนิวคลีโอไทด์เดี่ยว (single-nucleotide variant) การขาดหายขนาดเล็ก (small deletion) การสอดแทรก (insertion) และการจัดเรียงใหม่ของยีนที่ซับซ้อน (complex rearrangement) ได้รับการค้นพบและอธิบายแล้ว มากกว่า 100 ตำแหน่ง ซึ่งผลิตภัณฑ์จากยีนที่ปกติ โดยผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสนั้นประกอบด้วยกรดแอมิโน 494 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน ส่วนผลิตภัณฑ์จากยีนที่ผิดปกติ ความผิดปกติของผลิตภัณฑ์โปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค



ภาพที่ 4 การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค 9 ตำแหน่งที่มาจากยีนเทียม (Wedell, 1998)

ลักษณะทางคลินิกของโรคและความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์และจีโนไทป์ (phenotype-genotype correlation)

ผู้ป่วยโรค CAH ที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส มีอาการและอาการแสดงแบ่งตามลักษณะทางคลินิกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ชนิดไม่รุนแรง (non-classic type, NC) และชนิดรุนแรง (classic type) ซึ่งชนิดรุนแรงแบ่งเป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ชนิดย่อย simple virilizing (SV) และชนิดย่อย salt wasting (SW) ซึ่งผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเป็นชนิดย่อย SW คิดเป็นร้อยละ 75 ของผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกชนิดรุนแรง มีอาการและอาการแสดงสำคัญคือ อวัยวะเพศ

มีลักษณะกำกวมเฉพาะทารกเพศหญิงที่มีโครโมโซมเป็น 46, XX แต่อวัยวะเพศของทารกเพศชายที่มีโครโมโซมเป็น 46, XY มีลักษณะไม่กำกวม เด็กทารกที่อวัยวะเพศมีลักษณะกำกวมและผลการตรวจร่างกายไม่พบต่อมเพศจะได้รับการจำแนกลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรค CAH จนกว่าจะมีการพิสูจน์เป็นโรคอื่น เนื่องจากภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสเป็นสาเหตุที่พบได้บ่อยที่สุดของ female pseudo-hermaphroditism หรือ 46, XX disorder of sex development (DSD) ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกชนิดย่อย SW จะเริ่มมีอาการจากการสูญเสียเกลือตั้งแต่อายุ 5 ถึง 15 วัน หลังจากคลอด หรือทารกบางรายอาจนาน 1 ถึง 2 เดือน โดยทารกจะมีอาการอาเจียน ถ่ายอุจจาระเหลว น้ำหนักตัวไม่เพิ่มขึ้น บางรายมีอาการซึมและชัก เนื่องจากปริมาณโซเดียมในกระแสเลือดมีระดับต่ำมาก และอาจมีปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือดต่ำร่วมด้วย เมื่อตรวจร่างกายจะพบอาการแสดงของภาวะขาดน้ำ ชีพจรเต้นเร็ว ความดันเลือดต่ำ และผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการหัวใจเต้นผิดจังหวะเนื่องจากปริมาณโพแทสเซียมในกระแสเลือดสูงกว่าปกติ อาการหอบจากภาวะเลือดเป็นกรด ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาตั้งแต่แรกวินิจฉัยอาจถึงแก่ชีวิตได้ การตรวจวินิจฉัยที่มีความถูกต้องและรวดเร็วจึงมีความสำคัญต่อผู้ป่วยเป็นอย่างมาก

จีโนไทป์ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยเป็นแบบ compound heterozygous หรือเรียกอีกอย่างว่า ทรานส์ (trans) ที่แอลลีลทั้งสองมีการกลายพันธุ์ต่างตำแหน่งกันตั้งแต่สองตำแหน่งขึ้นไป ซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นกับระดับกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ซึ่งเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์แต่ละตำแหน่ง แบ่งกลุ่มด้วยจีโนไทป์ซึ่งสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ที่ได้จากผลการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่ม null (group null) จีโนไทป์ปรากฏการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรง (severe mutation) แบบ null ทั้งสองแอลลีล ซึ่งทำให้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ (0%, no enzyme activity) การกลายพันธุ์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ การขาดหายขนาดใหญ่ Cluster E6 (p.I237N p.V238E p.M240L) p.V306Ffs p.Q319X p.R357W

2. กลุ่ม A (group A) จีโนไทป์ปรากฏการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรง ได้แก่ การกลายพันธุ์ตำแหน่งตัดเชื่อม IVS2-13A/C>G ทั้งสองแอลลีล หรือหนึ่งแอลลีลคู่กับการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรงในกลุ่ม null อีกแอลลีลหนึ่ง ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ในระดับต่ำที่สุด (<1%, minimal residual enzyme activity)

3. กลุ่ม B (group B) จีโนไทป์ปรากฏการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรง p.I173N ทั้งสองแอลลีล หรือหนึ่งแอลลีลคู่กับการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรงในกลุ่ม null หรือกลุ่ม A อีกแอลลีลหนึ่ง ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียงร้อยละ 2 ถึง 11 (2-11% residual enzyme activity)

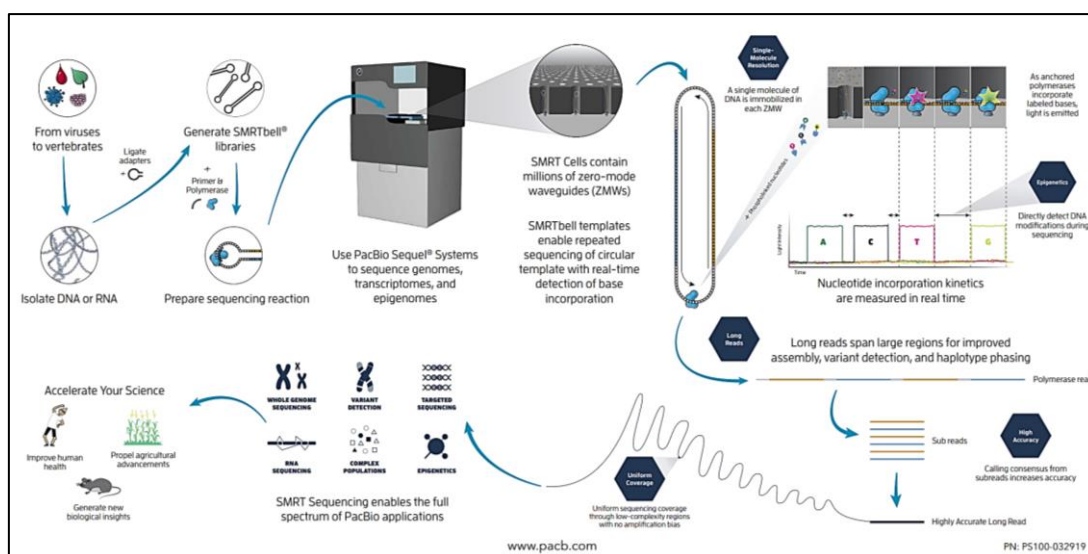
4. กลุ่ม C (group C) จีโนไทป์ปรากฏการกลายพันธุ์ชนิดไม่รุนแรง (mild mutation) ได้แก่ p.P31L p.V282L p.P454S อย่างน้อยหนึ่งแอลลีลคู่กับการกลายพันธุ์ชนิดรุนแรงในกลุ่ม null กลุ่ม A หรือกลุ่ม B อีกแอลลีลหนึ่ง ซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ร้อยละ 20 ถึง 50 (20-50% residual enzyme activity)

โดยจีโนไทป์กลุ่ม null พบในผู้ป่วยกลุ่ม SW เป็นส่วนใหญ่ จีโนไทป์กลุ่ม A และกลุ่ม B พบในผู้ป่วยกลุ่ม SV เป็นส่วนใหญ่ และจีโนไทป์กลุ่ม C พบในผู้ป่วยกลุ่ม NC เป็นส่วนใหญ่ (Nimkarn, Gangishetti, Yau, & New, 2016; Wedell, 1998; Xu et al., 2019)

เทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวตามเวลาจริงแบบสายยาว (long-read single molecule real-time sequencing, long-read SMRT sequencing)

เทคโนโลยี LRS ที่แพร่หลายในเชิงพาณิชย์ในปัจจุบัน ได้แก่ SMRT sequencing ของบริษัท Pacific Biosciences (PacBio) และเทคโนโลยีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่านช่องระดับนาโนเมตร (nanopore sequencing) ของบริษัท Oxford Nanopore Technologies Inc. (ONT) (Clarke et al., 2009; Eid et al., 2009) ซึ่ง SMRT sequencing ของบริษัท PacBio เป็นฐานระบบ (platform) ในเชิงพาณิชย์รายแรกของเทคโนโลยี LRS โดยบริษัท PacBio เปิดตัว RS sequencer ในปี 2011 ตามมาด้วย RSII และ Sequel เปิดตัวในปี 2013 และปี 2015 ตามลำดับ เทคโนโลยี long-read SMRT sequencing มีหลักการทำงานพื้นฐานมาจากเทคนิคการไหลเซลล์ (flow cells) โดยดีเอ็นเอโมเลกุลเดี่ยวซึ่งเป็นดีเอ็นเอต้นแบบผ่านเข้าไปในหลุมขนาดพิโคลิตรและกันหลุมมีลักษณะโปร่งใส แต่ละหลุมประกอบด้วยสิ่งที่เรียกว่า zero mode waveguides (ZMW) ที่มีเอนไซม์พอลิเมอเรสโมเลกุลเดี่ยวตรึงอยู่ที่กันหลุม (Ardui, Ameer, Vermeesch, & Hestand, 2018; Levene et al., 2003) ซึ่งช่วยให้ดีเอ็นเอโมเลกุลเดี่ยวที่ถูกทำให้เป็นวงกลมในขั้นตอนการเตรียมคลังดีเอ็นเอ (เช่น SMRTbell) ผ่านเข้าสู่กระบวนการต่อสายนิวคลีโอไทด์โดยเอนไซม์พอลิเมอเรสด้วยเบสที่ติดฉลากเรืองแสง แตกต่างกับวิธีลงบนดีเอ็นเอต้นแบบ

การต่อสายสายนิวคลีโอไทด์ด้วยเบสที่ติดฉลากเรืองแสง ทำให้เกิดการเรืองแสงที่ถูกตรวจจับด้วย ZMW ผ่านกันหลุมที่มีลักษณะโปร่งใส และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ตามเวลาจริง (Ardui et al., 2018; Levene et al., 2003; Pollard, Gurdasani, Mentzer, Porter, & Sandhu, 2018) (รูปที่ 5) ความยาวเฉลี่ยของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ (read) สำหรับ long-read SMRT sequencing นั้น อ่านได้ตั้งแต่ 1.5 กิโลเบส โดยประมาณ และมีรายงานอัตราความผิดพลาดสูงถึงร้อยละ 13 โดยประมาณ จากการเติมเบสที่ไม่ถูกต้อง (Carneiro et al., 2012; Quail et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ความผิดพลาดดังกล่าวมีการกระจายแบบสุ่มอยู่ทั่วทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ (Eid et al., 2009) และความลึกของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่าน (read depth) ที่มากเพียงพอ ทำให้สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ข้อมูลมีความสอดคล้องกันสูง (high consensus sequences) ได้ (Hebert et al., 2018; Roberts, Carneiro, & Schatz, 2013) สำหรับดีเอ็นเอโมเลกุลเดี่ยวที่มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 10 กิโลเบส นิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งของดีเอ็นเอโมเลกุลเดี่ยวแต่ละแอมพลีคอนจะได้รับการอ่านประมาณ 10 รอบต่อ 1 กิโลเบส โดยใช้วิธี circular consensus sequence (CCS) ดังนั้น การอ่านซ้ำหลาย ๆ รอบ จึงทำให้ความผิดพลาดที่เกิดขึ้นแบบสุ่มเป็นไปได้้น้อยมาก (Hestand, Van Houdt, Cristofoli, & Vermeesch, 2016; Travers, Chin, Rank, Eid, & Turner, 2010) สำหรับอัตราค่าใช้จ่ายที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณข้อมูลที่ได้ และข้อจำกัดที่ต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูงปริมาณมากเพื่อเป็นสารตั้งต้น ยังคงเป็นข้อจำกัดของเทคโนโลยีนี้ (Ardui et al., 2018; van Dijk, Jaszczyszyn, Naquin, & Thermes, 2018)



ภาพที่ 5 หลักการและการทำงานของเทคโนโลยี SMRT sequencing

(https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Infographic_SMRT-Sequencing-How-it-Works.pdf)

เทคนิคอื่นที่นิยมใช้ตรวจหาการแปรผันทางพันธุกรรมในโรคนี้

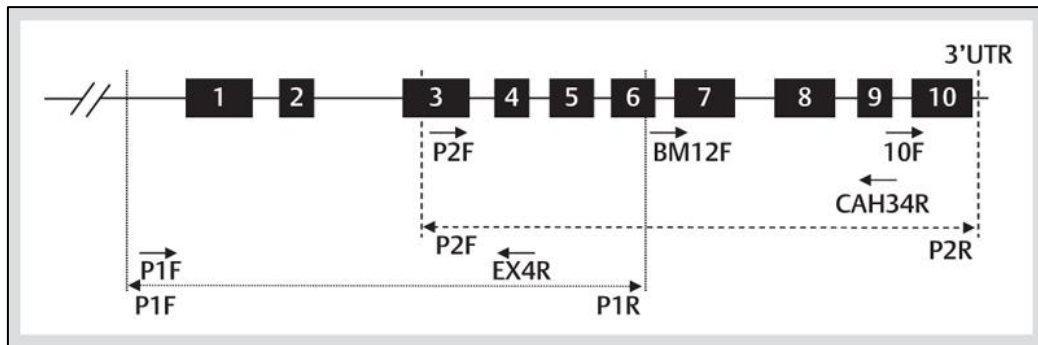
เขาเทิร์นบลอตไฮบริดเซชันเป็นเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ตัวตรวจจับที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมาย เริ่มจากการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิลีกโทรฟอรีซิสและซับหรือเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่ได้จากแผ่นเจลไปสู่แผ่นกรอง แล้วตรวจสอบด้วยตัวตรวจจับที่มีการติดฉลาก โดยปกติจะใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomics DNA) ที่ผ่านการย่อยเป็นชิ้นสั้น ๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบจำนวนชุดของยีน (gene copies) ในจีโนม แต่เนื่องจากเขาเทิร์นบลอตไฮบริดเซชันเป็นวิธีที่ใช้เวลานานและมีความยากลำบากในการปฏิบัติการ ซึ่งต้องใช้ไพรอบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และจำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอจำนวนมาก วิธีนี้จึงถูกแทนที่ด้วยเทคนิคอื่น ๆ (L'Allemand et al., 2000; Morel et al., 1989)

เทคนิค MLPA เป็นเทคนิคที่ช่วยให้สามารถตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมแบบจำนวนชุดของยีนในมนุษย์ ด้วยความสามารถนี้ เทคนิค MLPA จึงสามารถถูกนำไปใช้ในการวินิจฉัยระดับโมเลกุลของโรคทางพันธุกรรมหลายโรคที่มีสาเหตุของการเกิดโรคเกี่ยวข้องกับการขาดหายของยีนหรือการเพิ่มซ้ำของยีนที่มีความจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ เทคนิค MLPA ยังสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยระดับโมเลกุลของโรคทางพันธุกรรมที่มีลักษณะผิดปกติของกระบวนการเติมหมู่เมทิลใน

ดีเอ็นเอ (DNA methylation) เนื่องจากยีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนมากสามารถวิเคราะห์พร้อมกันได้ด้วยเทคนิค MLPA เพียงเทคนิคเดียว เทคนิค MLPA จึงแสดงถึงการเป็นวิธีมาตรฐานสูงสุด (gold standard) สำหรับการวิเคราะห์ระดับโมเลกุลของสาเหตุการเกิดโรคทั้งหมดที่เกิดจากการแปรผันทางพันธุกรรมแบบจำนวนชุดของยีน (gene copy number variation) เทคนิค MLPA สำหรับการตรวจสอบการขาดหายและการเพิ่มซ้ำของยีน *CYP21A2* และยีนเทียม *CYP21A1P* ในปัจจุบัน นิยมใช้ชุดตรวจ P050-CAH Kit ของบริษัท MRC-Holland ซึ่งเป็นชุดตรวจที่มีความละเอียดสูง ใช้ตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมแบบจำนวนชุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมด้วยไพรเมอร์สำหรับ PCR ที่มีความจำเพาะเจาะจงเพียงคู่เดียว และความจำเพาะเจาะจงดังกล่าวอาศัยการใช้โพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์จำนวนหลายชิ้นที่สามารถต่อสายให้ยาวขึ้น เพื่อสร้างแอมพลิคอนแบบจำเพาะโลคัสในบริเวณที่มีการเพิ่มขนาด ซึ่งแยกขนาดได้ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบรูปแบบของค่าสูงสุด (peak pattern) กับค่าที่ได้จากตัวอย่างอ้างอิง ซึ่งตรวจสอบโพรบหรือโลคัสที่แสดงจำนวนชุดของยีนที่ผิดปกติได้ (Krone & Arlt, 2009; Schouten et al., 2002) อย่างไรก็ตามเทคนิค MLPA ยังคงมีความยุ่งยากและใช้เวลาในการปฏิบัติการนานเช่นกัน

แม้ในปัจจุบันนี้ โรงพยาบาลหลายแห่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนได้ด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยหลักการของแซงเกอร์ ร่วมกับเทคนิค MLPA ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *CYP21A2* ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส วิธีการร่วมนี้เป็นวิธีการที่ถูกเลือกใช้เพื่อตรวจหาการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคได้โดยไม่ต้องผ่านการคัดกรองด้วยการวิเคราะห์เป้าหมาย (targeted analysis) และยังสามารถใช้ตรวจหาการแปรผันทางพันธุกรรมพบใหม่ (novel sequence variant) ได้ ซึ่งปกติจะครอบคลุมบริเวณที่มีการถอดรหัสและแปลรหัส (coding region) และบริเวณ flanking intron-exon ของยีน การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *CYP21A2* อาจจะใช้วิธีการคัดเลือก (isolate) ยีน *CYP21A2* โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ 2 ชิ้นที่ทับซ้อนกันบางส่วน ได้แก่ ชิ้นส่วน P1 และชิ้นส่วน P2 ประกอบด้วยชิ้นส่วนขนาด 1517 เบส และชิ้นส่วน 2214 เบส ตามลำดับ เพื่อหลีกเลี่ยงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรวมของยีนเทียม *CYP21A1P* (รูปที่ 6) (Loidi et al., 2006) ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมายและผ่านการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์แล้ว ผลิตภัณฑ์ PCR จะได้รับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยหลักการของแซงเกอร์ โดยใช้

ไพรเมอร์ภายใน (internal primer) ที่ครอบคลุมยีน *CYP21A2* ทั้งหมด ซึ่งต้องออกแบบไพรเมอร์เป็นจำนวนมาก (Carvalho et al., 2012)



ภาพที่ 6 เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ผลิตภัณฑ์ 2 ชั้นที่ทับซ้อนกันบางส่วน (Carvalho et al., 2012)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ไมโครปิเปต P2 ขนาด 0.1-2 ไมโครลิตร
2. ไมโครปิเปต P10 ขนาด 1-10 ไมโครลิตร
3. ไมโครปิเปต P20 ขนาด 2-20 ไมโครลิตร
4. ไมโครปิเปต P100 ขนาด 10-100 ไมโครลิตร
5. ไมโครปิเปต P200 ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
6. ไมโครปิเปต P1000 ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
7. ไมโครปิเปตทิป ขนาด 10 ไมโครลิตร
8. ไมโครปิเปตทิป ขนาด 100 ไมโครลิตร
9. ไมโครปิเปตทิป ขนาด 200 ไมโครลิตร
10. ไมโครปิเปตทิป ขนาด 1000 ไมโครลิตร
11. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
12. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 0.6 มิลลิลิตร
13. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
14. หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร
15. หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
16. กระจกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
17. กระจกตวง ขนาด 1000 มิลลิลิตร
18. ที่วางหลอดทดลอง
19. ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
20. ขวดแก้วดูแรน ขนาด 50 มิลลิลิตร
21. ขวดแก้วดูแรน ขนาด 100 มิลลิลิตร
22. ขวดแก้วดูแรน ขนาด 500 มิลลิลิตร

23. ขวดแก้วดูแรน ขนาด 1000 มิลลิลิตร
24. พาราฟิล์ม
25. แผ่นอลูมิเนียมฟอยด์
26. ถาดเตรียมเจลและหวีเตรียมเจล
27. กล่องควบคุมอุณหภูมิ
28. ซ้อนตักสาร
29. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
30. เครื่องซั่งสารเคมีแบบดิจิทัล
31. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์โทรฟอรีซิส
32. เครื่องถ่ายภาพรูเจล
33. เตามาโครเวฟ
34. เครื่องอบฆ่าเชื้อ
35. เครื่องผสมสารเคมี
36. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
37. เครื่องปั่นเหวี่ยง
38. เครื่องผลิตน้ำ
39. ตู้ทำความเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
40. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
41. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Absolute ethanol
2. Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
3. 1 กิโลเบส DNA ladder
4. Tris-base
5. Boric acid

6. Disodium ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)
7. Agarose gel
8. Gel staining solution
9. Distilled water
10. 10X LA PCR Buffer (Mg²⁺ free)
11. 25 mM MgCl₂
12. dNTP mixture (2.5 mM each)
13. Forward primer
14. Reverse primer
15. 5 U/uL LA *Taq* DNA polymerase
16. 20000 U/mL *Eco*RI restriction enzyme (New England BioLabs, UK)
17. Cutsmart Buffer (New England BioLabs, UK)
18. SMRTbell Barcoded Adapter Complete Prep Kit – 96
19. SMRTbell DNA Damage Repair Kit
20. DNA/Polymerase Binding Kit
21. AMPure[®] PB Kit
22. DNA Sequencing Kit
23. SMRT Cells for standard sequencing

โปรแกรมที่ใช้ในงานวิจัย

1. โปรแกรม Quantity One ของบริษัท Bio-rad, California, USA
2. โปรแกรม GenomeBrowse ของบริษัท Golden Helix, Montana, USA
3. โปรแกรม DNA 7500 Assay ของบริษัท Agilent Technologies, California, USA

USA

กลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยจำนวน 49 รายที่ได้รับการจำแนกลักษณะทางคลินิกเข้ากันได้กับโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ผ่านการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจวัดระดับสารอิเล็กโทรไลต์ และข้อมูลฮอร์โมนจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่ได้รับการจำแนกลักษณะทางคลินิกเข้ากันได้กับโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลสที่มาเข้ารับการรักษาที่แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ผ่านการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจวัดระดับสารอิเล็กโทรไลต์ และข้อมูลฮอร์โมนจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ และผู้วิจัยรับผู้ป่วยเข้าโครงการวิจัยก็ต่อเมื่อผู้ป่วยหรือผู้ปกครองยินยอม โดยโครงการวิจัยนี้จะศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน CYP21A2 ในกลุ่มตัวอย่าง

2. การยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ผู้ป่วยหรือผู้ปกครองจะต้องลงนามยินยอมในเอกสารยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย และโครงการวิจัยต้องผ่านการพิจารณาและได้รับการรับรองจากที่ประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยปริมาตรรายละ 3 - 5 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เพื่อนำมาสกัดสารพันธุกรรม

4. สกัดสารพันธุกรรม

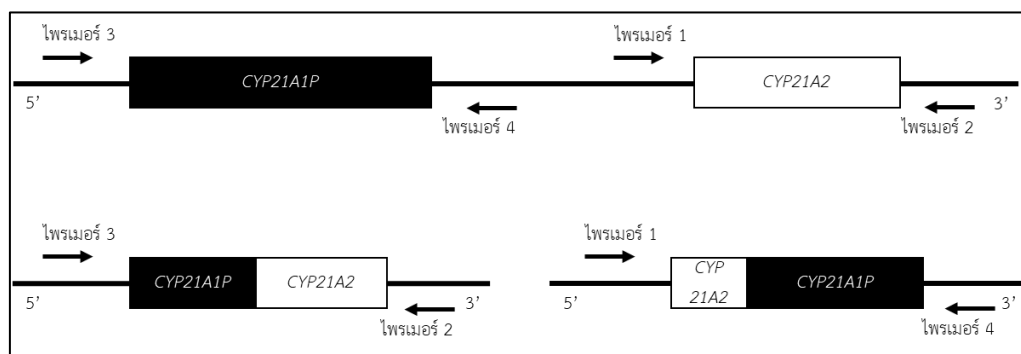
จีโนมิกส์ดีเอ็นเอจะถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยทุกรายที่เข้าร่วมโครงการวิจัย ด้วยวิธีการของ Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) และวัดความเข้มข้นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามวิธีการของเครื่องมือ NanoDrop 1000 spectrophotometry (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

5. เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส (locus-specific PCR) และวิเคราะห์การเกิดยีนลูกผสมจากขนาดสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองจากดีเอ็นเอทั้ง 49 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส โดยใช้เอนไซม์ *LA Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Dalian, China) ตามวิธีของ Ma et al., 2014 ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะโลคัส จำนวน 4 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) และจับคู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันจำนวน 4 คู่ เพื่อตรวจสอบการเกิดยีนลูกผสมซึ่งมีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีนจาก 4 แอมพลิคอน (รูปที่ 7) แต่ละปฏิกิริยามีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 100 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 เท่า dNTP 0.4 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ไปข้างหน้า (forward primer) และไพรเมอร์ย้อนกลับ (reverse primer) อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ และ *LA Taq* DNA polymerase 2.5 หน่วย (ตารางที่ 2) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบเป็นรอบสุดท้าย (ตารางที่ 3)

ไพรเมอร์	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์	บริเวณจำเพาะของไพรเมอร์
ไพรเมอร์ 1	5'-GCTTCTTGATGGGTGATCAAT-3'	ยีนจริง <i>CYP21A2</i>
ไพรเมอร์ 2	5'-CCTCAATCCTCTGCAGCG-3'	ยีนจริง <i>CYP21A2</i>
ไพรเมอร์ 3	5'-TCCCAATCCTTACTTTTTGTC-3'	ยีนเทียม <i>CYP21A1P</i>
ไพรเมอร์ 4	5'-CCTCAATCCTCTGCGCA-3'	ยีนเทียม <i>CYP21A1P</i>

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแต่ละโลคัส



ภาพที่ 7 ตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันทั้ง 4 คู่

รายการ	สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
1	DW	-	21.5
2	10X LA PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1X	5
3	25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5
4	dNTP mixture (2.5 mM each)	0.4 mM	8
5	Forward primer	0.4 uM	2
6	Reverse primer	0.4 uM	2
7	5 U/uL LA Taq DNA polymerase	2.5 U	0.5
8	50 ng/uL DNA template	300 ng	6
ปริมาตรสุทธิ			50

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบจำเพาะโลคัส

ภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส		
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35 รอบ
62 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1 รอบ

ตารางที่ 3 ภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบจำเพาะโลคัส

ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน จำนวน 4 คู่ ที่ใช้ตรวจสอบ 4 แอมพลิคอน ได้แก่ แอมพลิคอน ที่ 1 ยีนจริง *CYP21A2* ใช้ไพรเมอร์ 1 (forward primer ME0008 (Keen-Kim et al., 2005)) และไพรเมอร์ 2 (reverse primer ME0066 (Keen-Kim et al., 2005; Lee, Chao, Ng, & Choo, 1996)) ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 3385 เบส แอมพลิคอนที่ 2 ยีนเทียม *CYP21A1P* ใช้ไพรเมอร์ 3 (forward primer ME0059 (Keen-Kim et al., 2005)) และไพรเมอร์ 4 (reverse primer ME0067 (Keen-Kim et al., 2005; Lee et al., 1996)) ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 4008 เบส แอมพลิคอนที่ 3 ยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera ใช้ไพรเมอร์ 3 (forward primer ME0059) และไพรเมอร์ 2 (reverse primer ME0066) และแอมพลิคอนที่ 4 ยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement ใช้ไพรเมอร์ 1 (forward primer ME0008) และไพรเมอร์ 4 (reverse primer ME0067) (Ma et al., 2014) โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ขึ้นกับตำแหน่งของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) (ตารางที่ 4) จากนั้น วิเคราะห์ขนาดสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจล agarose เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ใช้ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ระยะเวลา 60 นาที

แอมพลิคอน	คู่ไพรเมอร์	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดหวัง
แอมพลิคอน 1	ไพรเมอร์ 1 และไพรเมอร์ 2	ยีนจริง <i>CYP21A2</i>
แอมพลิคอน 2	ไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 4	ยีนเทียม <i>CYP21A1P</i>
แอมพลิคอน 3	ไพรเมอร์ 3 และไพรเมอร์ 2	ยีนลูกผสม <i>CYP21A1P/CYP21A2</i>
แอมพลิคอน 4	ไพรเมอร์ 1 และไพรเมอร์ 4	ยีนลูกผสม <i>CYP21A2/CYP21A1P</i>

ตารางที่ 4 ผลิตภัณฑ์เป้าหมายจากไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่

6. เตรียมคลังแอมพลิคอน (amplicon library preparation) สำหรับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี long-read SMRT sequencing

เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปัจจุบันได้ก้าวเข้าสู่เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ที่สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอได้พร้อมกันจำนวนมากในเวลาเดียวกัน (massively parallel sequencing) จากคลังดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่เตรียมได้จากปฏิกิริยา PCR ทำให้ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว

ในการทำงานเดียวกัน การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี long-read SMRT Sequencing หลังจากที่ได้ผลิตผลิตภัณฑ์จาก PCR ในรูปดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) แล้ว ต้องเชื่อมต่อกับ (ligation) ดีเอ็นเอสายคู่เข้ากับ barcoded adapter เรียกว่าขั้นตอนการเตรียม คัดดีเอ็นเอ ก่อนจะนำดีเอ็นเอสายคู่ที่ต่อกับ barcoded adapter เรียบร้อยแล้วเข้าสู่ขั้นตอน การจับกับไพรเมอร์และดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (anneal primer and DNA polymerase binding) และขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ตามลำดับ เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ สอดคล้องกัน (consensus read) ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในท้ายที่สุด (รูปที่ 8)

การเตรียมคัดดีเอ็นเอ (amplicon libraries) สำหรับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคโนโลยี long-read SMRT Sequencing โดยใช้ PacBio® Barcoded Adapters เตรียมคัด ดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ PCR แอมพลิคอนที่ 1 ซึ่งสารพันธุกรรมเป้าหมายของยีน *CYP21A2* ที่มีปริมาณเพียงพอสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสายยาว (มากกว่า 1 ไมโครกรัม) สำหรับ หากการกลายพันธุ์ในยีน *CYP21A2* แล้ววิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี long-read SMRT Sequencing ตามวิธีการของบริษัท PacBio, California, USA ซึ่งปฏิบัติตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

1. One-Step End-Repair and Ligation ขั้นตอนการซ่อมปลายของดีเอ็นเอต้นแบบ และเชื่อมต่อกับปลายดีเอ็นเอต้นแบบทั้งสองฝั่งเข้ากับ barcoded adapters ที่แตกต่างกันในแต่ละ ตัวอย่าง เนื่องจากการทำ long-read SMRT sequencing ต้องรวมตัวอย่างทุกตัวอย่างลงใน หลอดทดลองเดียวกัน การเชื่อมต่อกับ barcoded adapters จึงช่วยให้สามารถจำแนกโมเลกุล ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างออกจากกันได้

2. Pool Samples ขั้นตอนการรวมดีเอ็นเอต้นแบบที่เชื่อมต่อกับ barcoded adapters แล้วทุกตัวอย่างลงในหลอดทดลองเดียวกัน

3. DNA Damage Repair ขั้นตอนการซ่อมแซมดีเอ็นเอต้นแบบที่เชื่อมต่อกับ barcoded adapters แล้วที่ยังคงมีความผิดพลาดโดยการเติมนิวคลีโอไทด์และเชื่อมต่อกับ barcoded adapters อย่างสมบูรณ์

4. EXO III and VII Digestion ขั้นตอนการกำจัดดีเอ็นเอต้นแบบที่เชื่อมต่อกับ barcoded adapters ไม่สมบูรณ์ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่ม exonuclease ได้แก่ เอนไซม์ *ExoIII* และเอนไซม์ *ExoVII*

5. Two AMPure® PB Bead Washes ขั้นตอนการทำให้คลังดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (library purification) โดยการชะล้างด้วย AMPure® PB Bead ด้วยหลักการการจับกันของดีเอ็นเอต้นแบบ กับ magnetic beads แล้วดูดสารละลายที่เหลือทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 70 และทำละลายตะกอนดีเอ็นเอต้นแบบด้วย elution buffer ทำซ้ำขั้นตอนทั้งหมด 2 รอบ

6. Annealing, binding and sequencing ขั้นตอนการจับกับไพรเมอร์และดีเอ็นเอพอร์เมอเรสของคลังดีเอ็นเอ และขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

7. วิเคราะห์ข้อมูลหาตำแหน่งการกลายพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว

ระบุตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการแปรผันทางพันธุกรรม (variants) ซึ่งแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequence) โดยใช้โปรแกรม GenomeBrowse ของบริษัท Golden Helix, Montana, USA แล้วให้คำอธิบายประกอบการแปรผัน (variant annotation) และการกรองการแปรผัน (variant filtering) ด้วยเกณฑ์ ดังนี้

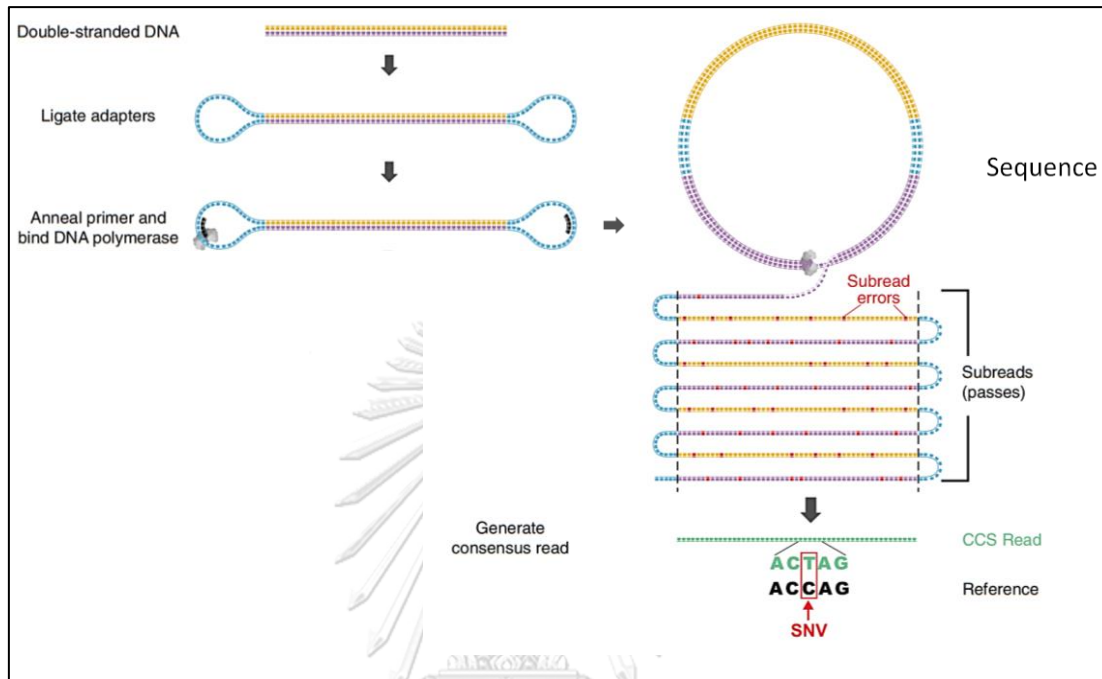
1. ตำแหน่งการแปรผันนั้นต้องมีผลกระทบที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตำแหน่งตัดเชื่อม การกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนรหัส การกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุด และการกลายพันธุ์แบบเลื่อนกรอบ

2. ตำแหน่งการแปรผันนั้นต้องไม่เป็นภาวะพหุสัณฐานนิวคลีโอไทด์เดี่ยว (single nucleotide polymorphism, SNP) ในประชากรจากฐานข้อมูล dbSNP, gnomAD, ExAC, 1000genomes และ In house Thai Exome ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของประชากรไทยที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม

8. วิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วย

สำหรับการกลายแบบเปลี่ยนรหัส ทำนายความรุนแรงผลของการกลายพันธุ์ต่อโครงสร้างของโปรตีน (mutation prediction analysis) ด้วยโปรแกรม Polymorphism Phenotyping version 2, Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ซึ่งเป็นเครื่องมือสำหรับทำนายโอกาสที่เป็นไปได้ สำหรับการเกิดการกลายพันธุ์จากการแทนที่กรดแอมิโน (amino acid substitution) ที่มีเป็นภาวะพหุสัณฐานนิวคลีโอไทด์เดี่ยวที่ก่อให้เกิดการกลายแบบไม่พ้อง (nonsynonymous SNPs) ซึ่งเป็นารกลายที่ทำให้รหัสของกรดแอมิโนชนิดหนึ่งเปลี่ยนไปเป็น

กรดแอมิโนอีกชนิดหนึ่งหรือเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด ส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่โปรตีนในมนุษย์เทียบกับข้อมูลปกติจากกลุ่มประชากรอ้างอิง



ภาพที่ 8 การเตรียมคลังดีเอ็นเอและการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเทคโนโลยี

SMRT sequencing (Wenger et al., 2019)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง
2. การยินยอมเข้าร่วมโครงการ
3. ผลการเก็บตัวอย่างเลือด
4. ผลการสกัดสารพันธุกรรม

ผลการศึกษาขั้นตอนที่ 1 ถึงขั้นตอนที่ 4 แพทย์ผู้เชี่ยวชาญประเมินผู้ป่วยที่มาเข้ารับการดูแลรักษาที่แผนกกุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับโรคต่อมหมวกไตชั้นนอกโตผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จำนวน 49 ราย ที่สามารถใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ และผู้ป่วยทั้ง 49 รายยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยผู้ป่วยหรือผู้ปกครองของผู้ป่วยลงนามไว้ในเอกสารยินยอมทุกราย ซึ่งโครงการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณารับรองจากที่ประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รหัสอนุมัติ IRB no. 954/2016) และเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยทุกรายในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA รายละเอียด 3 – 5 มิลลิลิตร ได้ครบทุกราย เพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) และวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามวิธีการของเครื่องมือ NanoDrop 1000 spectrophotometry (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยแต่ละรายมีคุณภาพและความเข้มข้นเพียงพอที่จะใช้เป็นสารพันธุกรรมตั้งต้นสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสในขั้นตอนถัดไป

5. ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสและการวิเคราะห์การเกิดยีนลูกผสมจากขนาดสารพันธุกรรมด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสของผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จำนวน 49 ราย จากการศึกษาพบแอมพลิคอนที่ 1 ยีนจริง *CYP21A2* จำนวน 43 ราย และไม่พบแอมพลิคอนที่ 1 ซึ่งมีการขาดหายของยีน *CYP21A2* ทั้งยีน (entire *CYP21A2* gene deletion)

จำนวน 7 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 8 ผู้ป่วยรายที่ 13 ผู้ป่วยรายที่ 23 ผู้ป่วยรายที่ 28 ผู้ป่วยรายที่ 48 และผู้ป่วยรายที่ 49 คิดเป็น 7 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.071 (ร้อยละ 7.1 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) (ภาพภาคผนวกที่ 1-1 – ภาพภาคผนวกที่ 1-13) แอมพลิคอนที่ 2 ยีนเทียม *CYP21A1P* จำนวน 49 ราย (ภาพภาคผนวกที่ 2-1 – ภาพภาคผนวกที่ 2-6) แอมพลิคอนที่ 3 ยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2 chimera* ซึ่งมีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน *CYP21A2* (large *CYP21A2* gene deletion) จำนวน 16 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 2 ผู้ป่วยรายที่ 3 ผู้ป่วยรายที่ 6 ผู้ป่วยรายที่ 8 ผู้ป่วยรายที่ 9 ผู้ป่วยรายที่ 12 ผู้ป่วยรายที่ 13 ผู้ป่วยรายที่ 17 ผู้ป่วยรายที่ 18 ผู้ป่วยรายที่ 23 ผู้ป่วยรายที่ 30 ผู้ป่วยรายที่ 38 ผู้ป่วยรายที่ 44 ผู้ป่วยรายที่ 47 ผู้ป่วยรายที่ 48 และผู้ป่วยรายที่ 49 คิดเป็น 16 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.163 (ร้อยละ 16.3 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) (ภาพภาคผนวกที่ 3-1 – ภาพภาคผนวกที่ 3-5) และแอมพลิคอนที่ 4 ยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P rearrangement* จำนวน 3 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 15 ผู้ป่วยรายที่ 28 และผู้ป่วยรายที่ 49 คิดเป็น 3 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.031 (ร้อยละ 3.1 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) (ภาพภาคผนวกที่ 4-1 – ภาพภาคผนวกที่ 4-5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในผู้ป่วยทั้งหมดนี้พบแอลลีลที่มีการขาดหายของยีน *CYP21A2* ทั้งยีน คือไม่พบแอมพลิคอนที่ 1 และแอลลีลที่มีการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน *CYP21A2* คือพบแอมพลิคอนที่ 3 คิดเป็น 23 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.235 (ร้อยละ 23.5 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) หากจำแนกตามรูปแบบจีโนไทป์พบทั้งหมด 6 รูปแบบ ได้แก่

จีโนไทป์รูปแบบที่ 1 เป็นโฮโมไซกัสของยีน *CYP21A2* ทั้งสองแอลลีล พบในผู้ป่วยจำนวน 31 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 1 ผู้ป่วยรายที่ 4 ผู้ป่วยรายที่ 5 ผู้ป่วยรายที่ 7 ผู้ป่วยรายที่ 10 ผู้ป่วยรายที่ 11 ผู้ป่วยรายที่ 14 ผู้ป่วยรายที่ 16 ผู้ป่วยรายที่ 19 ผู้ป่วยรายที่ 20 ผู้ป่วยรายที่ 21 ผู้ป่วยรายที่ 22 ผู้ป่วยรายที่ 24 ผู้ป่วยรายที่ 25 ผู้ป่วยรายที่ 26 ผู้ป่วยรายที่ 27 ผู้ป่วยรายที่ 29 ผู้ป่วยรายที่ 31 ผู้ป่วยรายที่ 32 ผู้ป่วยรายที่ 33 34 ผู้ป่วยรายที่ 35 ผู้ป่วยรายที่ 36 ผู้ป่วยรายที่ 37 ผู้ป่วยรายที่ 39 ผู้ป่วยรายที่ 40 ผู้ป่วยรายที่ 41 ผู้ป่วยรายที่ 42 ผู้ป่วยรายที่ 43 ผู้ป่วยรายที่ 45 และผู้ป่วยรายที่ 46

จีโนไทป์รูปแบบที่ 2 เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีน *CYP21A2* กับยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2 chimera* จำนวน 11 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 2 ผู้ป่วยรายที่ 3 ผู้ป่วยรายที่ 6

ผู้ป่วยรายที่ 9 ผู้ป่วยรายที่ 12 ผู้ป่วยรายที่ 17 ผู้ป่วยรายที่ 18 ผู้ป่วยรายที่ 30 ผู้ป่วยรายที่ 38 ผู้ป่วยรายที่ 44 และผู้ป่วยรายที่ 47

จีโนไทป์รูปแบบที่ 3 เป็นเฮมิไซกัสของยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera โดยไม่พบยีน *CYP21A2* จำนวน 4 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 8 ผู้ป่วยรายที่ 13 ผู้ป่วยรายที่ 23 และผู้ป่วยรายที่ 48

จีโนไทป์รูปแบบที่ 4 เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีน *CYP21A2* กับยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement จำนวน 1 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 15

จีโนไทป์รูปแบบที่ 5 เป็นเฮมิไซกัสของยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement โดยไม่พบยีน *CYP21A2* จำนวน 1 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 28

และจีโนไทป์รูปแบบที่ 7 เป็นเฮมิไซกัสของยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera กับยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement โดยไม่พบยีน *CYP21A2* จำนวน 1 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 49 ดังตารางที่ 5

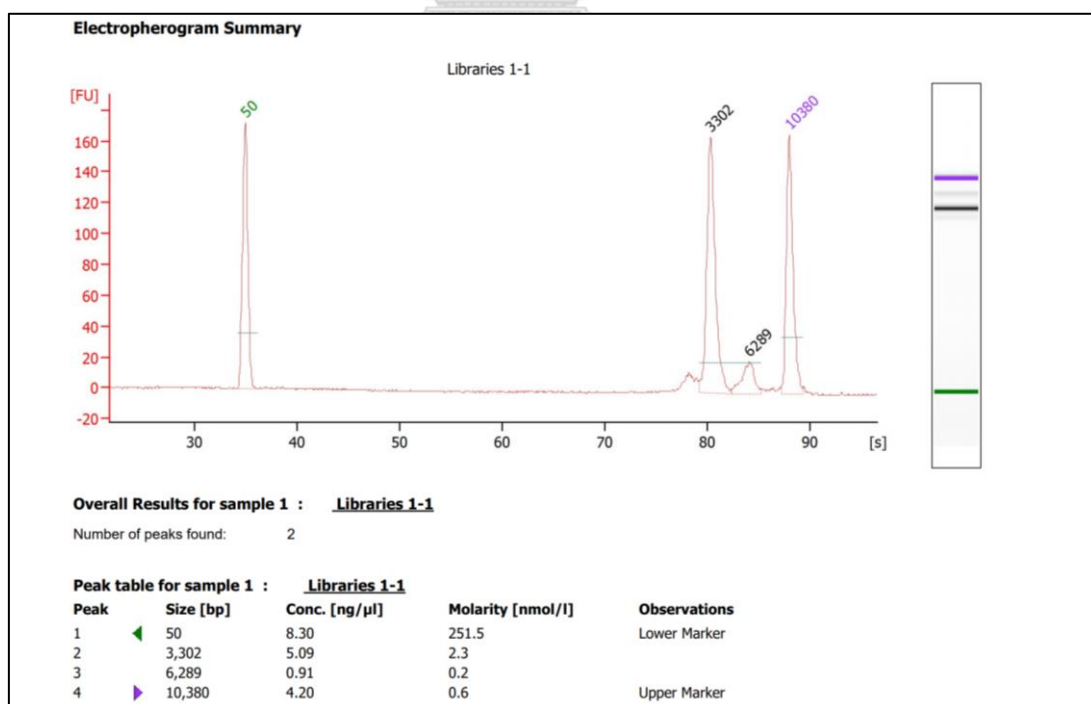
ผู้ป่วย	เพศ	การเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส (แอมพลิคอนที่)			
		1	2	3	4
1	หญิง	+	+	-	-
2	ชาย	+	+	+	-
3	หญิง	+	+	+	-
4	หญิง	+	+	-	-
5	หญิง	+	+	-	-
6	หญิง	+	+	+	-
7	หญิง	+	+	-	-
8	หญิง	-	+	+	-
9	หญิง	+	+	+	-
10	หญิง	+	+	-	-
11	หญิง	+	+	-	-
12	หญิง	+	+	+	-
13	ชาย	-	+	+	-
14	หญิง	+	+	-	-
15	หญิง	+	+	-	+
16	หญิง	+	+	-	-
17	ชาย	+	+	+	-
18	หญิง	+	+	+	-
19	หญิง	+	+	-	-
20	หญิง	+	+	-	-
21	หญิง	+	+	-	-
22	ชาย	+	+	-	-
23	หญิง	-	+	+	-
24	หญิง	+	+	-	-
25	หญิง	+	+	-	-
26	ชาย	+	+	-	-
27	หญิง	+	+	-	-
28	ชาย	-	+	-	+
29	หญิง	+	+	-	-
30	ชาย	+	+	+	-
31	หญิง	+	+	-	-
32	ชาย	+	+	-	-
33	หญิง	+	+	-	-
34	หญิง	+	+	-	-
35	หญิง	+	+	-	-
36	หญิง	+	+	-	-
37	ชาย	+	+	-	-
38	หญิง	+	+	+	-
39	หญิง	+	+	-	-
40	ชาย	+	+	-	-
41	ชาย	+	+	-	-
42	ชาย	+	+	-	-
43	หญิง	+	+	-	-
44	หญิง	+	+	+	-
45	ชาย	+	+	-	-
46	ชาย	+	+	-	-
47	ชาย	+	+	+	-
48	หญิง	-	+	+	-
49	หญิง	-	+	+	+

ตารางที่ 5 ผลการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสของผู้ป่วยแต่ละราย
(1 = ยีน CYP21A2, 2 = ยีนเทียม CYP21A1P, 3 = ยีนลูกผสม chimera,
4 = ยีนลูกผสม rearrangement, แรเงา = พบการกลายพันธุ์)

6. ผลการเตรียมคลังดีเอ็นเอ สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสายยาว

ผลการเตรียมคลังดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จาก PCR ของแอมพลิคอนที่ 1 ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมเป้าหมายของยีน *CYP21A2* ขนาด 3385 เบส จำนวน 49 ตัวอย่าง รวมเป็นคลังดีเอ็นเอเดี่ยว ซึ่งแสดงคุณภาพของคลังดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากขั้นตอนข้างต้น ด้วยผลการวิเคราะห์คุณภาพวิธี DNA 7500 assay ตามวิธีการของบริษัท Agilent Technologies, California, USA โดยแบ่งคลังดีเอ็นเอออกเป็น 2 คลัง ได้แก่ Libraries 1 และ Libraries 2 ทำซ้ำคลังละ 2 ครั้ง และกำหนดชื่อเป็น Libraries 1-1, Libraries 1-2, Libraries 2-1 และ Libraries 2-2 ดังนี้

ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ Libraries 1-1 (รูปที่ 9) เทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 14) ปรากฏขนาดของคลังดีเอ็นเอที่ 3302 เบส ใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอต้นแบบ มีความเข้มข้น 5.09 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพียงพอสำหรับการทำ long-read SMRT sequencing และมีดีเอ็นเอปนเปื้อนขนาด 6289 เบส มีความเข้มข้น 0.91 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณคลังดีเอ็นเอ



ภาพที่ 9 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ Libraries 1-1

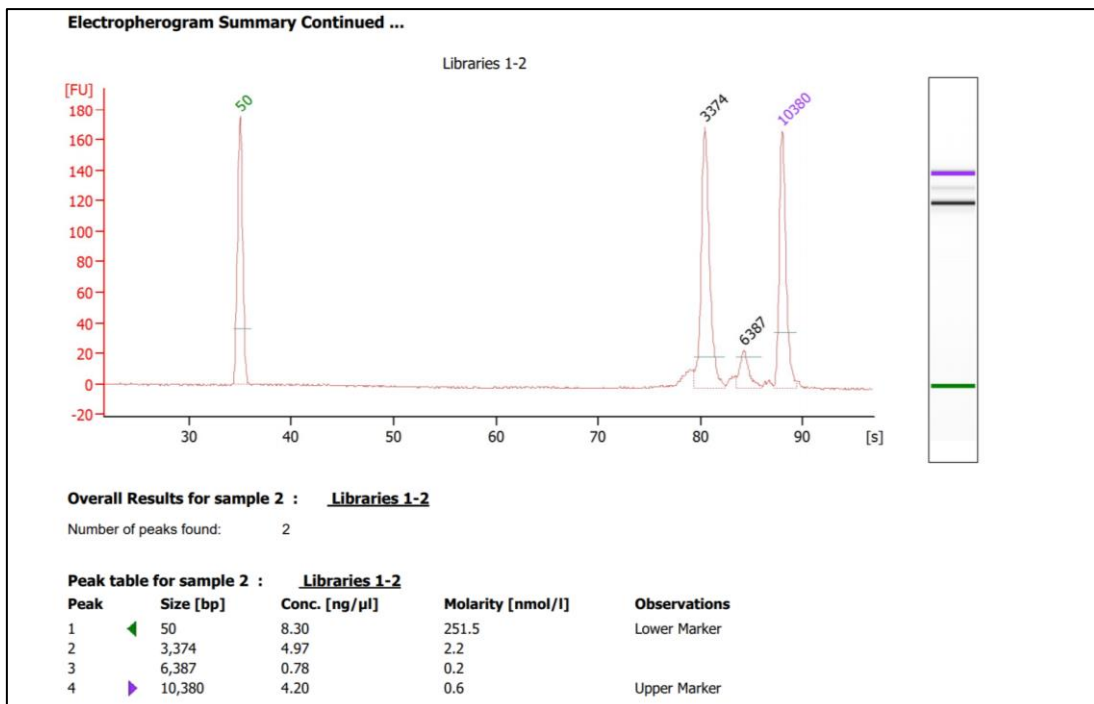
ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 1-2 (รูปที่ 10) เทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 14) ปรากฏขนาดของคลังดีเอ็นเอที่ 3374 เบส ใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอต้นแบบ มีความเข้มข้น 4.97 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพียงพอสำหรับการทำ long-read SMRT sequencing และมีดีเอ็นเอปนเปื้อนขนาด 6387 เบส มีความเข้มข้น 0.78 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณคลังดีเอ็นเอ

ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 2-1 (รูปที่ 11) เทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 14) ปรากฏขนาดของคลังดีเอ็นเอที่ 3442 เบส ใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอต้นแบบ มีความเข้มข้น 5.81 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพียงพอสำหรับการทำ long-read SMRT sequencing และมีดีเอ็นเอปนเปื้อนขนาด 6695 เบส มีความเข้มข้น 0.77 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณคลังดีเอ็นเอ

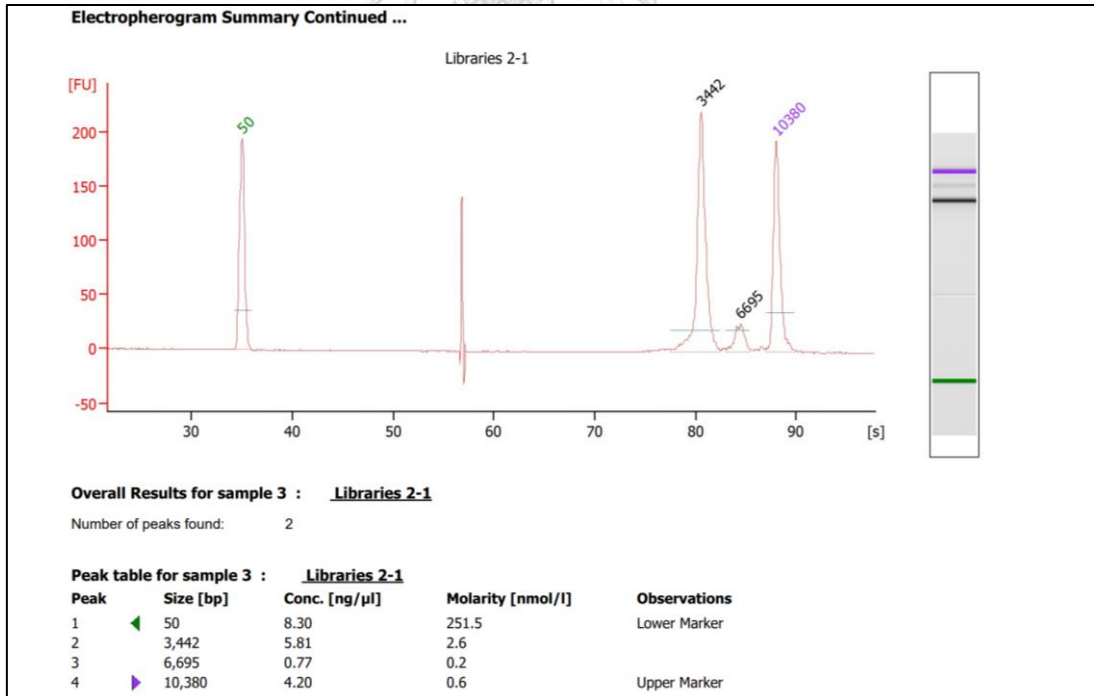
ผลอิเล็กทรอนิกส์ของ Libraries 2-2 (รูปที่ 12) เทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 14) ปรากฏขนาดของคลังดีเอ็นเอที่ 3489 เบส ใกล้เคียงกับขนาดของดีเอ็นเอต้นแบบ มีความเข้มข้น 5.93 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพียงพอสำหรับการทำ long-read SMRT sequencing และมีดีเอ็นเอปนเปื้อนขนาด 6560 เบส มีความเข้มข้น 0.82 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณคลังดีเอ็นเอ

ทั้งนี้ การวิเคราะห์คุณภาพคลังดีเอ็นเอผลอิเล็กทรอนิกส์ของตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control) ไม่ปรากฏการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ (รูปที่ 13) ปรากฏเพียง ladder ที่ lower Marker ขนาด 50 เบส และ upper Marker ขนาด 10380 เบส โดยทราบขนาดดีเอ็นเอได้จากการเทียบกราฟมาตรฐานดังรูปที่ 14 และแสดงขนาดดีเอ็นเอของคลังดีเอ็นเอทั้งหมดดังรูปที่ 15

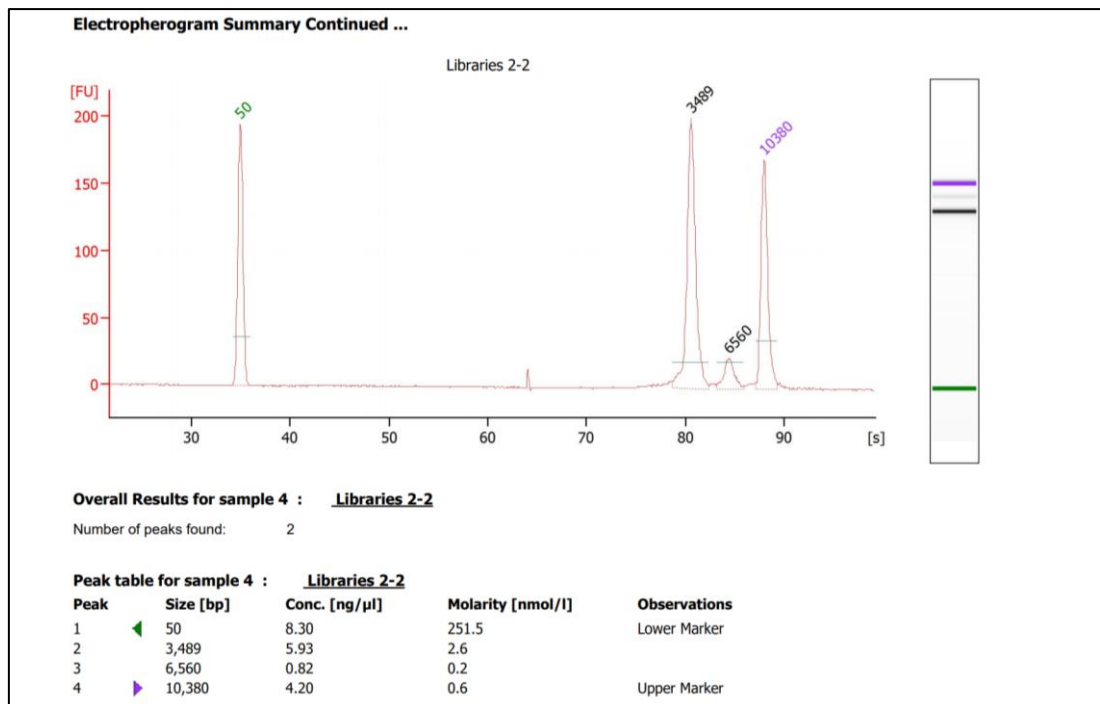
คลังดีเอ็นเอ Libraries 1 และ Libraries 2 ที่เชื่อมต่อกับ barcoded adapters สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับกระบวนการ long-read SMRT sequencing ในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CYP21A2 จำนวน 49 ตัวอย่างได้



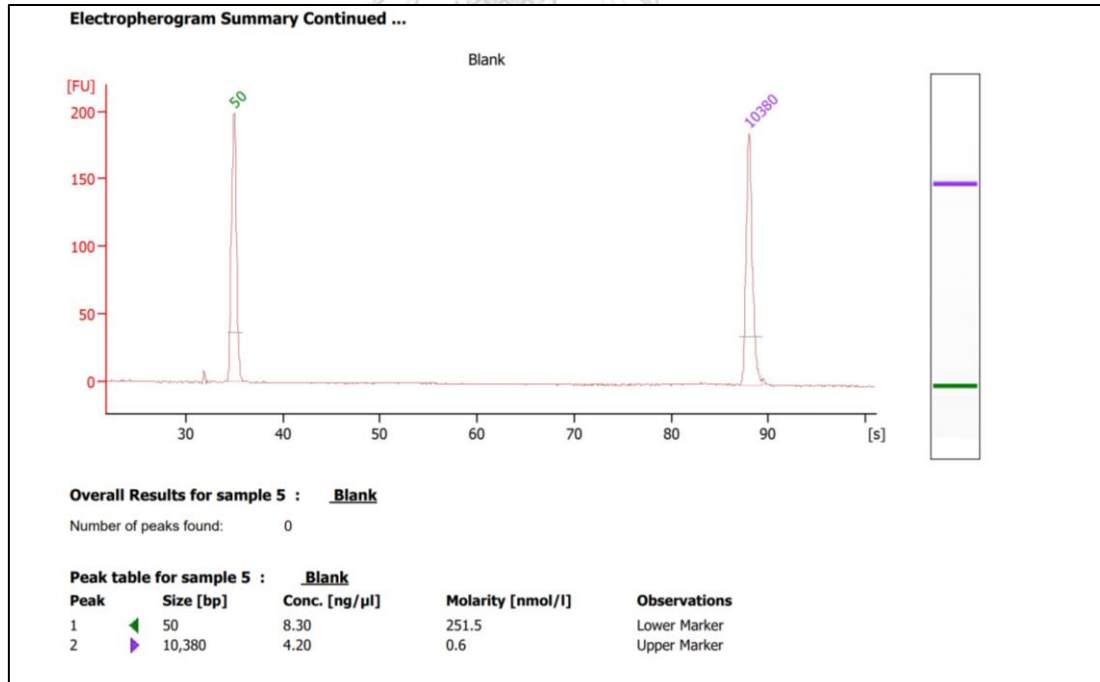
ภาพที่ 10 ผลอิเล็กโทรฟอร์สิสของ Libraries 1-2



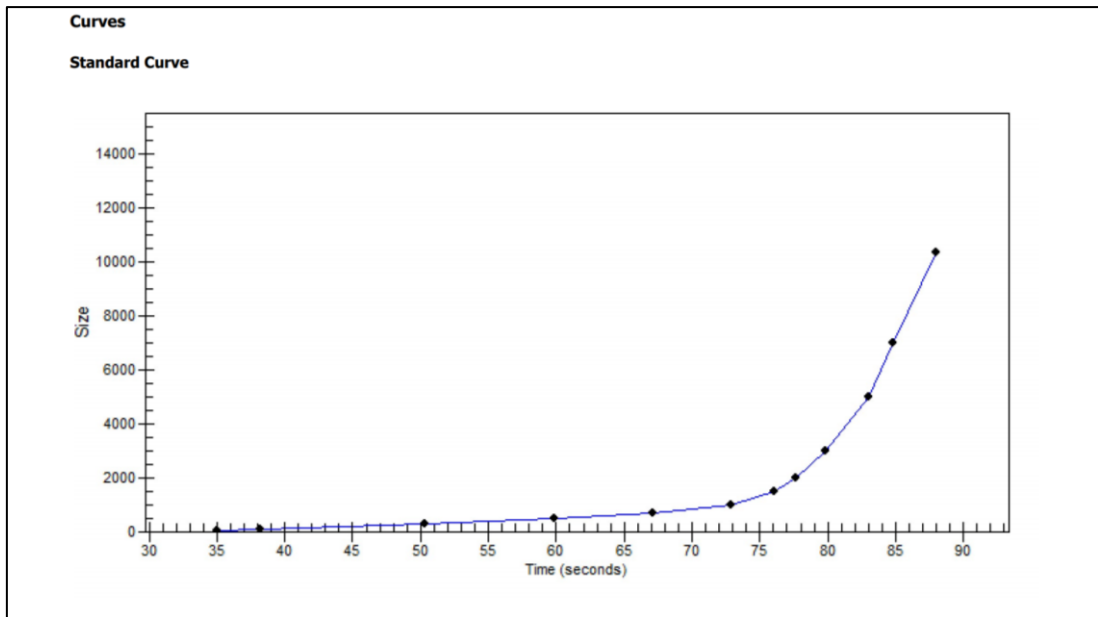
ภาพที่ 11 ผลอิเล็กโทรฟอร์สิสของ Libraries 2-1



ภาพที่ 12 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ Libraries 2-2

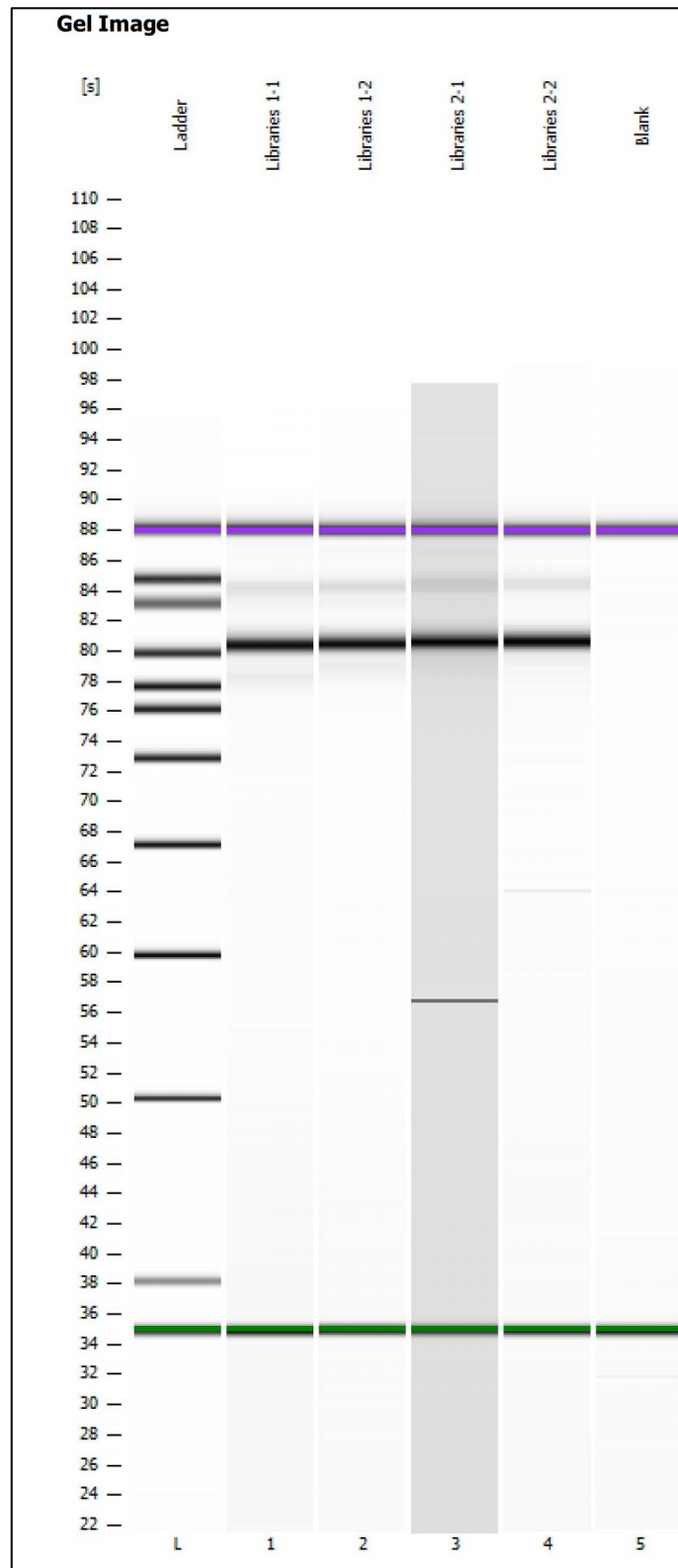


ภาพที่ 13 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของตัวอย่างควบคุมผลลบ



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานของขนาดดีเอ็นเอ





ภาพที่ 15 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงขนาดดีเอ็นเอของคลังดีเอ็นเอทั้งหมด
(แถบสีม่วง = upper marker แถบสีเขียว = lower marker)

7. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลหาตำแหน่งการกลายพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว

ผลการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวกับแผนที่โครโมโซมแห่งที่ 6 ได้ข้อมูลตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการแปรผันทางพันธุกรรมบนยีน *CYP21A2* ทั้งหมด อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม GenomeBrowse ของบริษัท Golden Helix, Montana, USA สามารถให้คำอธิบายประกอบความความแปรผันได้ และกรองความแปรผันด้วยเกณฑ์คัดเข้า เมื่อการแปรผันนั้นที่ไม่เป็น SNP ในประชากรจากฐานข้อมูล dbSNP, gnomAD, 1000genomes, ExAc และ In house Thai Exome ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของประชากรไทยที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม และเมื่อมีผลกระทบที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตำแหน่งตัดเชื่อม การกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนรหัส การกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุด การกลายพันธุ์แบบเลื่อนกรอบ และการขาดหายทั้งยีน สำหรับการกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนรหัส ทำนายความรุนแรงด้วยโปรแกรม Polyphen-2 ทั้งนี้การกลายพันธุ์ของผู้ป่วยแต่ละรายที่เป็นไปตามเกณฑ์คัดเข้า แสดงดังตารางที่ 6 โดยการวิเคราะห์ข้อมูลหาตำแหน่งการกลายพันธุ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว ในผู้ป่วยทั้งหมด 49 ราย พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง ได้แก่ IVS2-13A/C>G, p.I173N, p.I237N, p.V238E, p.V282L, p.G293D, p.V306Ffs, IVS7+1G>T, p.R317X, p.Q319X, p.R357W, p.R484P และ p.S494N โดยตำแหน่ง IVS2-13A/C>G เป็นตำแหน่งที่มีความถี่แอลลีลสูงที่สุด (ความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.378 คิดเป็นร้อยละ 37.8 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) รองลงมาเป็นตำแหน่ง p.S494N (ความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.194 คิดเป็นร้อยละ 19.4 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) และตำแหน่ง p.I173N (ความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.122 คิดเป็นร้อยละ 12.2 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) ตามลำดับ และตำแหน่ง IVS7+1G>T เป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยพบมาก่อน (ตารางที่ 7)

ผู้ป่วย	เพศ	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสายยาว
1	หญิง	c.293-13A/C>G, c.518T>A
2	ชาย	c.293-13A/C>G
3	หญิง	c.518T>A
4	หญิง	c.518T>A
5	หญิง	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
6	หญิง	c.1066C>T
7	หญิง	c.293-13A/C>G, c.518T>A
8	หญิง	No amplicon 1
9	หญิง	c.293-13A/C>G
10	หญิง	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
11	หญิง	c.1066C>T, c.[518T>A; 710T>A; 713T>A; 844G>T; 924insT; 952C>T; 1066C>T; 1489G>A]
12	หญิง	c.293-13A/C>G
13	ชาย	No amplicon 1
14	หญิง	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
15	หญิง	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
16	หญิง	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
17	ชาย	c.293-13A/C>G
18	หญิง	c.[952C>T; 1066C>T]
19	หญิง	c.293-13A/C>G, c.518T>A
20	หญิง	c.936+1G>T
21	หญิง	c.952C>T, c.[1448G>C;1489G>A]
22	ชาย	c.952C>T
23	หญิง	No amplicon 1
24	หญิง	c.293-13A/C>G
25	หญิง	c.293-13A/C>G
26	ชาย	c.1066C>T, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
27	หญิง	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
28	ชาย	No amplicon 1
29	หญิง	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
30	ชาย	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
31	หญิง	c.293-13A/C>G, c.518T>A
32	ชาย	c.293-13A/C>G, c.518T>A
33	หญิง	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
34	หญิง	c.1489G>A
35	หญิง	c.1489G>A
36	หญิง	c.518T>A, c.952C>T
37	ชาย	c.518T>A, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
38	หญิง	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
39	หญิง	c.518T>A
40	ชาย	c.293-13A/C>G, c.952C>T
41	ชาย	c.293-13A/C>G, c.1066C>T
42	ชาย	c.293-13A/C>G, c.878G>A
43	หญิง	c.946C>T
44	หญิง	c.[293-13A/C>G;1489G>A]
45	ชาย	c.936+1G>T
46	ชาย	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
47	ชาย	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]
48	หญิง	No amplicon 1
49	หญิง	No amplicon 1

ตารางที่ 6 การแปรผันพันธุกรรมของผู้ป่วยแต่ละรายจากเทคโนโลยี SMRT sequencing

(No amplicon 1 = ตรวจไม่พบยีน CYP21A2)

ตำแหน่ง บนโครโมโซม	การกลายพันธุ์		จำนวนแอลลีล	ความถี่แอลลีล	ร้อยละ
	ระดับดีเอ็นเอ	ระดับโปรตีน			
Intron 2	c.293-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	37	0.378	37.8
Exon 4	c.518T>A	p.I173N	12	0.122	12.2
Exon 6	c.710T>A	I237N	1	0.010	1.0
Exon 6	c.713T>A	V238E	1	0.010	1.0
Exon 7	c.844G>T	V282L	1	0.010	1.0
Exon 7	c.878G>A	p.G293D	1	0.010	1.0
Exon 8	c.924insT	V306Ffs	1	0.010	1.0
Intron 7	c.936+1G>T	IVS7+1G>T	2	0.020	2.0
Exon 8	c.946C>T	p.R317X	1	0.010	1.0
Exon 8	c.952C>T	p.Q319X	6	0.061	6.1
Exon 8	c.1066C>T	p.R357W	6	0.061	6.1
Exon 10	c.1448G>C	p.R484P	1	0.010	1.0
Exon 10	c.1489G>A	p.S494N	19	0.194	19.4

ตารางที่ 7 ความถี่ของตำแหน่งการแปรผันพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยทั้งหมดด้วยเทคโนโลยี SMRT sequencing ตามเกณฑ์คัดเข้า

8. วิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วย

ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลของผู้ป่วยรายที่ 11 เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวกับแผนที่โครโมโซมแท่งที่ 6 ได้ข้อมูลตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการแปรผันทางพันธุกรรมบนยีน *CYP21A2* ทั้งหมด 28 ตำแหน่ง เมื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม GenomeBrowse สามารถให้คำอธิบายประกอบการแปรผันได้ เมื่อกรองข้อมูลพบการแปรผันที่ไม่เป็น SNP จำนวน 13 ตำแหน่ง ได้แก่ 32006277, 32006317, 32006337, 32007203, 32007579, 32007584, 32007587, 32007887, 32007959, 32008198, 32008312, 32008896 และ 32008904 ประกอบด้วยการกลายแบบเงียบ (silent mutation) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ 32006277, 32006317, 32006337, 32007579 และ 32008896 การกลายแบบเปลี่ยนรหัส จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ 32007203, 32007584, 32007587, 32007887, 32008312 และ 32008904 การกลายแบบเลื่อนกรอบ จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่

32007959 และการกลายเป็นรหัสหยุด จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่ 32008198 ซึ่งตำแหน่งการแปรผันทางพันธุกรรมที่น่าจะก่อให้เกิดโรคคือ การกลายแบบเปลี่ยนรหัส ได้แก่ p.I173N, p.I237N, p.V238E, p.V282L, p.R357W และ p.S494N การกลายแบบเลื่อนกรอบ ได้แก่ p.V306Ffs และการกลายเป็นรหัสหยุด ได้แก่ p.Q319X รวมทั้งหมด 8 ตำแหน่ง เป็นไปตามเกณฑ์คัดเข้า (ตารางที่ 8)

ตำแหน่งการกลายแบบเปลี่ยนรหัส ที่เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่น่าจะก่อให้เกิดโรค ทั้ง 6 ตำแหน่ง เพื่อทำนายโอกาสที่เป็นไปได้ สำหรับการเกิดการกลายพันธุ์ที่เป็นภาวะพหุสัญญาณ นิวคลีโอไทด์เดี่ยวที่ก่อให้เกิดการกลายแบบไม่พ้อง ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่โปรตีนในมนุษย์ ด้วยโปรแกรม Polyphen-2 พบว่าผลของการกลายพันธุ์ต่อโครงสร้างของโปรตีนมีระดับความรุนแรง เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ p.I173N, p.I237N, p.V238E, p.V282L และ p.R357W การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคชนิดไม่รุนแรง จำนวน 1 ตำแหน่ง ได้แก่ p.S494N (ตารางที่ 9)

ผู้ป่วยรายที่	โครโมโซม	ตำแหน่ง	นิวคลีโอไทด์		ข้อมูลประกอบความแปรผัน	การกลายพันธุ์	
			อ้างอิง	เปลี่ยนแปลง		ระดับดีเอ็นเอ	ระดับโปรตีน
11	6	32006227	C	T	silent	CTG>TTG	p.L10L
11	6	32006317	C	T	silent	CTG>TTG	p.L40L
11	6	32006337	C	A	silent	CCC>CCA	p.P46P
11	6	32006597	C	T	SNPs rs6462		
11	6	32006621	A	C	SNPs rs6463		
11	6	32006655	C	T	SNPs rs6449		
11	6	32006760	TG	T	SNPs rs369651496, rs578235636		
11	6	32006858	C	A	SNPs rs6467		
11	6	32006886	G	A	SNPs rs6474		
11	6	32007203	T	A	missense	ATC>AAC	p.I173N
11	6	32007308	C	A	SNPs rs1040312		
11	6	32007325	C	G	SNPs rs397515531		
11	6	32007459	A	G	SNPs rs12525076		
11	6	32007579	T	C	silent	GAT>GAC	p.D235D
11	6	32007584	T	A	missense	ATC>AAC	p.I237N
11	6	32007587	T	A	missense	GTG>GAG	p.V238E
11	6	32007593	T	A	SNPs rs6476		
11	6	32007624	A	G	SNPs rs6458		
11	6	32007625	C	T	SNPs rs6459		
11	6	32007790	C	G	SNPs rs6477		
11	6	32007887	G	T	missense	GTG>TTG	p.V282L
11	6	32007959	G	GT	frameshift	c.924dupT	306+T
11	6	32007993	G	C	SNPs rs6442		
11	6	32008198	C	T	nonsense	CAG>TAG	p.Q319X
11	6	32008312	C	T	missense	CGG>TGG	p.R357W
11	6	32008896	G	A	silent	CCG>CCA	p.P491P
11	6	32008904	G	A	missense	AGC>AAC	p.S494N
11	6	32008963	C	T	SNPs rs1058152		

ตารางที่ 8 การแปรผันทางพันธุกรรมทั้งหมดของผู้ป่วยรายที่ 11

(แรงแง = ตำแหน่งที่เป็นไปตามเกณฑ์คัดเข้า,

ตำแหน่ง = ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมแท่งที่ 6 ตามฐานข้อมูล Human GRCh37/hg19)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตำแหน่ง	ผลทำนายความรุนแรง	คะแนนความเชื่อมั่น
p.I173N	PROBABLY DAMAGING	1.000
p.I237N	PROBABLY DAMAGING	0.842
p.V238E	PROBABLY DAMAGING	0.832
p.V282L	PROBABLY DAMAGING	0.929
p.R357W	PROBABLY DAMAGING	1.000
p.S494N	BENIGN	0.003

ตารางที่ 9 ระดับความรุนแรงของการกลายพันธุ์ต่อโครงสร้างของโปรตีนของผู้ป่วยรายที่ 11 ด้วย

โปรแกรม Polyphen-2

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส จำนวน 49 ราย จากการศึกษาพบแอมพลิคอนที่ 1 จำนวน 43 ราย แอมพลิคอนที่ 2 จำนวน 49 ราย แอมพลิคอนที่ 3 จำนวน 16 ราย และแอมพลิคอนที่ 4 จำนวน 3 ราย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แอมพลิคอนที่ 3 ยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* จำนวน 16 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.204 (ร้อยละ 20.4 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) และแอมพลิคอนที่ 4 ยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* จำนวน 3 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.031 (ร้อยละ 3.1 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันทั้งข้อมูลการเกิดยีนลูกผสมที่ก่อให้เกิดการขาดหายขนาดใหญ่ของยีนจากการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัส และข้อมูลการแปรผันทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว พบว่าจีโนไทป์คู่แอลลีลของผู้ป่วยทั้งหมด (ตารางที่ 10) มีรูปแบบจีโนไทป์ทั้งหมด 7 รูปแบบ ได้แก่

จีโนไทป์รูปแบบที่ 1 เป็นโฮโมไซกัสของยีน *CYP21A2* ทั้งสองแอลลีล พบในผู้ป่วยจำนวน 23 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.469 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 1 ผู้ป่วยรายที่ 5 ผู้ป่วยรายที่ 7 ผู้ป่วยรายที่ 10 ผู้ป่วยรายที่ 11 ผู้ป่วยรายที่ 14 ผู้ป่วยรายที่ 19 ผู้ป่วยรายที่ 21 ผู้ป่วยรายที่ 24 ผู้ป่วยรายที่ 25 ผู้ป่วยรายที่ 26 ผู้ป่วยรายที่ 27 ผู้ป่วยรายที่ 29 ผู้ป่วยรายที่ 31 ผู้ป่วยรายที่ 32 ผู้ป่วยรายที่ 33 ผู้ป่วยรายที่ 35 ผู้ป่วยรายที่ 36 ผู้ป่วยรายที่ 37 ผู้ป่วยรายที่ 39 ผู้ป่วยรายที่ 40 ผู้ป่วยรายที่ 41 และผู้ป่วยรายที่ 42 สำหรับตัวอย่างผู้ป่วยรายที่ 11 พบการแปรผันทางพันธุกรรม ตำแหน่ง p.R357W บนแอลลีลหนึ่งของยีน *CYP21A2* และตำแหน่ง p.I173N, p.I237N, p.V238E, p.V282L, p.V306Ffs, p.Q319X, p.R357W และ p.S494N บนอีกแอลลีลหนึ่งของยีน *CYP21A2*

จีโนไทป์รูปแบบที่ 2 เป็นเฮมิไซกัสของยีน *CYP21A2* เพียงแอลลีลเดียว ส่วนอีกแอลลีลมีการขาดหายของยีน *CYP21A2* ทั้งยีน จำนวน 8 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.163 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 4 ผู้ป่วยรายที่ 16 ผู้ป่วยรายที่ 20 ผู้ป่วยรายที่ 22 ผู้ป่วยรายที่ 34 ผู้ป่วยรายที่ 43 ผู้ป่วยรายที่ 45 และผู้ป่วยรายที่ 46 สำหรับตัวอย่างผู้ป่วยรายที่ 20 และผู้ป่วยรายที่ 45 พบการแปรผัน

ทางพันธุกรรมตำแหน่ง IVS7 DS+1G>T ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ใหม่บนแอลลีลของยีน *CYP21A2* ซึ่งมีเพียงแอลลีลเดียว

จีโนไทป์รูปแบบที่ 3 เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีน *CYP21A2* กับยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera จำนวน 11 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.224 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 2 ผู้ป่วยรายที่ 3 ผู้ป่วยรายที่ 6 ผู้ป่วยรายที่ 9 ผู้ป่วยรายที่ 12 ผู้ป่วยรายที่ 17 ผู้ป่วยรายที่ 18 ผู้ป่วยรายที่ 30 ผู้ป่วยรายที่ 38 ผู้ป่วยรายที่ 44 และผู้ป่วยรายที่ 47 สำหรับตัวอย่างผู้ป่วยรายที่ 18 พบการแปรผันทางพันธุกรรมตำแหน่ง p.Q319X และ p.R357W บนแอลลีลของยีน *CYP21A2* ซึ่งมีเพียงแอลลีลเดียว

จีโนไทป์รูปแบบที่ 4 เป็นเฮมิไซกัสของยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera โดยไม่พบยีน *CYP21A2* จำนวน 4 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.082 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 8 ผู้ป่วยรายที่ 13 ผู้ป่วยรายที่ 23 และผู้ป่วยรายที่ 48

จีโนไทป์รูปแบบที่ 5 เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีน *CYP21A2* กับยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement จำนวน 1 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.020 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 15 ซึ่งพบการแปรผันทางพันธุกรรมตำแหน่ง IVS2-13A/C>G และ p.S494N บนแอลลีลของยีน *CYP21A2* ซึ่งมีเพียงแอลลีลเดียว

จีโนไทป์รูปแบบที่ 6 เป็นเฮมิไซกัสของยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement โดยไม่พบยีน *CYP21A2* จำนวน 1 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.020 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 28

และจีโนไทป์รูปแบบที่ 7 เป็นเฮมิไซกัสของยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera กับ ยีนลูกผสม *CYP21A2/CYP21A1P* rearrangement โดยไม่พบยีน *CYP21A2* จำนวน 1 ราย มีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.020 ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 49

ในผู้ป่วยทั้งหมดนี้ แอลลีลที่พบยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera และแอลลีลที่ไม่พบยีน *CYP21A2* เป็นแอลลีลที่มีการขาดหายไปขนาดใหญ่ของยีน *CYP21A2* พบจำนวน 23 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.235 และการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคที่พบทั้ง 13 ตำแหน่ง ตำแหน่ง IVS2-13A/C>G พบจำนวน 37 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.378 ตำแหน่ง p.I173N พบจำนวน 12 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.122 ตำแหน่ง I237N พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010

ตำแหน่ง V238E พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010 ตำแหน่ง V282L พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010 ตำแหน่ง p.G293D พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010 ตำแหน่ง p.V306Ffs พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010 ตำแหน่ง IVS7+1G>T พบจำนวน 2 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.020 ตำแหน่ง p.R317X พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010 ตำแหน่ง Q319X พบจำนวน 6 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.061 ตำแหน่ง p.R357W พบจำนวน 6 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.061 ตำแหน่ง p.R484P พบจำนวน 1 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.010 และตำแหน่ง p.S494N พบจำนวน 19 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.194 โดยตำแหน่ง IVS7+1G>T เป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ใหม่ที่พบในการศึกษา



ผู้ป่วย	เพศ	การเพิ่มปริมาณชิ้นแบบจำเพาะโคลัส (แอมพลิคอนที่)				การวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสายยาว	จีนไทป์จากการเพิ่มปริมาณชิ้นแบบจำเพาะโคลัส และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสายยาว		กลุ่มจีนไทป์
		1	2	3	4		อัลลิลที่ 1	อัลลิลที่ 2	
1	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.518T>A	IVS2-13A/C>G	p.I173N	B
2	ชาย	+	+	+	-	c.293-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	Chimera	A
3	หญิง	+	+	+	-	c.518T>A	p.I173N	Chimera	B
4	หญิง	+	+	-	-	c.518T>A	p.I173N	Entire gene deletion	B
5	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G; p.S494N	A
6	หญิง	+	+	+	-	c.1066C>T	p.R357W	Chimera	Null
7	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.518T>A	IVS2-13A/C>G	p.I173N	B
8	หญิง	-	+	+	-	No amplicon 1	Entire gene deletion	Chimera	Null
9	หญิง	+	+	+	-	c.293-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	Chimera	A
10	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G; p.S494N	A
11	หญิง	+	+	-	-	c.1066C>T, c.[518T>A; 710T>A; 713T>A; 844G>T; 924insT; 952C>T; 1066C>T; 1489G>A]	p.R357W	p.[I173N; I237N; V238E; V282L; V306Fs; Q319X; R357W; S494N]	Null
12	หญิง	+	+	+	-	c.293-13A/C>G	IVS2 AS-13(C>G)	Chimera	A
13	ชาย	-	+	+	-	No amplicon 1	Entire gene deletion	Chimera	Null
14	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G; p.S494N	A
15	หญิง	+	+	-	+	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Entire gene deletion; Rearrangement	A
16	หญิง	+	+	-	-	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Entire gene deletion	A
17	ชาย	+	+	+	-	c.293-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	Chimera	A
18	หญิง	+	+	+	-	c.[952C>T; 1066C>T]	p.[Q319X; R357W]	Chimera	Null
19	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.518T>A	IVS2-13A/C>G	p.I173N	B
20	หญิง	+	+	-	-	c.936+1G>T	IVS7 DS+1G>T	Entire gene deletion	A
21	หญิง	+	+	-	-	c.952C>T, c.[1448G>C; 1489G>A]	p.Q319X	p.R484P, p.S494N	C
22	ชาย	+	+	-	-	c.952C>T	p.Q319X	Entire gene deletion	Null
23	หญิง	-	+	+	-	No amplicon 1	Entire gene deletion	Chimera	Null
24	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	A
25	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G	A
26	ชาย	+	+	-	-	c.1066C>T, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	p.R357W	IVS2-13A/C>G, p.S494N	A
27	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G, p.S494N	A
28	ชาย	-	+	-	+	No amplicon 1	Entire gene deletion	Entire gene deletion; Rearrangement	Null
29	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G, p.S494N	A
30	ชาย	+	+	+	-	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Chimera	A
31	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.518T>A	IVS2-13A/C>G	p.I173N	B
32	ชาย	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.518T>A	IVS2-13A/C>G	p.I173N	B
33	หญิง	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G	IVS2-13A/C>G, p.S494N	A
34	หญิง	+	+	-	-	c.1489G>A	p.S494N	Entire gene deletion	C
35	หญิง	+	+	-	-	c.1489G>A	p.S494N	p.S494N	C
36	หญิง	+	+	-	-	c.518T>A, c.952C>T	p.I173N	p.Q319X	B
37	ชาย	+	+	-	-	c.518T>A, c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	p.I173N	IVS2-13A/C>G, p.S494N	B
38	หญิง	+	+	+	-	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Chimera	A
39	หญิง	+	+	-	-	c.518T>A	p.I173N	p.I173N	B
40	ชาย	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.952C>T	IVS2-13A/C>G	p.Q319X	A
41	ชาย	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.1066C>T	IVS2-13A/C>G	p.R357W	A
42	ชาย	+	+	-	-	c.293-13A/C>G, c.878G>A	IVS2-13A/C>G	p.G293D	A
43	หญิง	+	+	-	-	c.946C>T	p.R317X	Entire gene deletion	Null
44	หญิง	+	+	+	-	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Chimera	A
45	ชาย	+	+	-	-	c.936+1G>T	IVS7 DS+1G>T	Entire gene deletion	A
46	ชาย	+	+	-	-	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Entire gene deletion	A
47	ชาย	+	+	+	-	c.[293-13A/C>G; 1489G>A]	IVS2-13A/C>G, p.S494N	Chimera	A
48	หญิง	-	+	+	-	No amplicon 1	Entire gene deletion	Chimera	Null
49	หญิง	-	+	+	+	No amplicon 1	Entire gene deletion, Rearrangement	Chimera	Null

ตารางที่ 10 ข้อมูลสรุปจีโนไทป์คู่แอลลีลของผู้ป่วยแต่ละราย

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นข้อได้เปรียบของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวแบบตามเวลาจริง ของบริษัท PacBio ที่สามารถวิเคราะห์หากการกลายพันธุ์ในยีนจริงที่มีคู่ฮอโมโลกัสเป็นยีนเทียม ได้ข้อมูลครอบคลุมการแปรผันทางพันธุกรรมทั้งหมดในยีนของผู้ป่วย ทั้งตำแหน่งที่เคยมีรายงานและตำแหน่งที่พบใหม่ ซึ่งข้อมูลที่ได้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และให้ความมั่นใจสูง ด้วยระยะเวลาที่สั้นลงและลดความยุ่งยากในการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ เมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นที่ใช้ก่อนหน้านี้ เช่น เทคนิคเซาเทิร์นบลอตไฮบริดเซชัน (L'Allemand et al., 2000; Morel et al., 1989) ที่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอจำนวนมาก และเทคนิค MLPA (Carvalho et al., 2012) ยังคงเป็นวิธีที่มีความยากลำบากและใช้เวลาในการปฏิบัติการณ์าน หรือแม้แต่เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมดร่วมกับเทคนิค MLPA ผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดต้องได้รับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพโรเมอรัลภายใน จำนวนมากที่ต้องครอบคลุมยีน *CYP21A2* ทั้งหมด (Carvalho et al., 2012) วิธีเหล่านี้จึงถูกแทนที่ด้วยเทคนิคอื่น ๆ ในเวลาต่อมา เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวแบบตามเวลาจริง ของบริษัท PacBio จึงมีข้อได้เปรียบกว่าเทคนิคที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อใช้ร่วมกับการเพิ่มปริมาณยีนแบบจำเพาะโลคัสโดยใช้ไพโรเมอรัลที่มีความจำเพาะ (specificity) ต่อยีนโลคัสนั้น ๆ ซึ่งผ่านการยืนยันความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพโรเมอรัลคู่ที่มีความจำเพาะต่างโลคัสกันด้วยการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีรวมนี้จึงมีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือ ทั้งนี้ ผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ 21-ไฮดรอกซิเลส ต้องมีการกลายพันธุ์ของยีน *CYP21A2* ทั้งสองแอลลีล เนื่องจากโรคนี้มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อย ดังนั้น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นฮอโมไซกัสของ *CYP21A2* ทั้งสองแอลลีล และผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสหรือเฮมิไซกัสของ *CYP21A2* เพียงหนึ่งแอลลีล อาจจะมีการกลายพันธุ์แบบอื่นในยีน *CYP21A2* ได้แก่ การกลายพันธุ์เฉพาะจุด เช่น การแทนที่และการสอดแทรกจากกระบวนการยีนคอนเวอร์ชัน เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวแบบตามเวลาจริง ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่แบบสายยาวจึงเป็นวิธีที่ช่วยวิเคราะห์ เพื่อระบุการกลายพันธุ์ดังกล่าว เพื่อระบุการกลายพันธุ์เป็นคู่แอลลีล (biallelic mutation) ของผู้ป่วยทุกรายได้

ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้ บางตำแหน่งเคยมีรายงานในการศึกษาของ Robert และคณะ, 2007 ที่เป็นข้อมูลของผู้ป่วยชาวไทยจำนวน 72 ราย ได้แก่ การขาดหายขนาด

ใหญ่ IVS2-13A/C>G p.Q319X p.R357W ซึ่งมีความถี่แอลลีลต่ำกว่าความถี่แอลลีลในการศึกษานี้ และ p.I173N ซึ่งมีความถี่แอลลีลสูงกว่าความถี่แอลลีลในการศึกษานี้ (ตารางที่ 11)

ตำแหน่งการกลายพันธุ์	ความถี่แอลลีลประชากรชาวไทย	
	การศึกษาของ Robert et al., 2007	การศึกษานี้
Large gene deletion	0.08	0.16
IVS2-13A/C>G	0.33	0.38
p.I173N	0.15	0.12
I237N	NA	0.01
V238E	NA	0.01
V282L	ND	0.01
p.G293D	NA	0.01
V306Ffs	NA	0.01
IVS7+1G>T	NA	0.02
p.R317X	NA	0.01
p.Q319X	0.01	0.06
p.R357W	0.04	0.06
p.R484P	NA	0.01
p.S494N	NA	0.19
จำนวนแอลลีลทั้งหมด	142	98

ตารางที่ 11 ความถี่แอลลีลประชากรชาวไทยในการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้านี้

(ND = ตรวจไม่พบ NA = ไม่แสดงข้อมูล)

ในการศึกษานี้พบการแปรผันทางพันธุกรรมตำแหน่ง IVS7+1G>T ซึ่งเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยพบมาก่อน มีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตำแหน่งการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค เนื่องจากตำแหน่ง IVS7+1G>T มีลักษณะของการแทนที่นิวคลีโอไทด์ G ด้วยนิวคลีโอไทด์ T ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 936 หรือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1 นับจากปลายฝั่ง 3' ของอินทรอนที่ 7 การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคนี้อาจจะส่งผลให้กระบวนการตัดเชื่อม

ของอินทรอนที่ 7 ผิดปกติ และนำไปสู่การแปลรหัสแบบเลื่อนกรอบ ซึ่งสามารถยืนยันผลกระทบจากการกลายพันธุ์นี้ได้ด้วยการทดลองทางห้องปฏิบัติการต่อไป

ตำแหน่งที่มีความถี่แอลลีลสูงที่สุดในการศึกษานี้คือ ตำแหน่ง IVS2-13A/C>G (ความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.378 คิดเป็นร้อยละ 37.8 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค ตำแหน่ง IVS2-13A/C>G มีลักษณะของการแทนที่นิวคลีโอไทด์ A หรือนิวคลีโอไทด์ C ด้วยนิวคลีโอไทด์ G ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 656 หรือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 13 นับย้อนกลับจากปลายฝั่ง 5' ของอินทรอนที่ 2 การแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคนี้อาจส่งผลให้กระบวนการตัดเชื่อมของอินทรอนที่ 2 ผิดปกติไป โดยเก็บนิวคลีโอไทด์ส่วนอินทรอนจำนวน 19 นิวคลีโอไทด์ไว้ซึ่งปกตินิวคลีโอไทด์ช่วงดังกล่าวจะถูกตัดออกและไม่ได้รับการถอดรหัสเป็น mRNA จึงนำไปสู่การแปลรหัสแบบเลื่อนกรอบ (Yujiro Higashi et al., 1991; Yujiro Higashi et al., 1988)

ตำแหน่งที่มีความถี่แอลลีลรองลงมาเป็นตำแหน่ง p.S494N (ความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.194 คิดเป็นร้อยละ 19.4 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) และตำแหน่ง p.I173N (ความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.122 คิดเป็นร้อยละ 12.2 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) ตามลำดับ โดยตำแหน่ง p.S494N เป็นตำแหน่งการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคชนิดไม่รุนแรง (Benign variant) ที่เคยพบในยีน *CYP21A2* มี 5 ตำแหน่ง ได้แก่ p.L9dup p.R103K p.D184E p.S269T และ p.S494N (Higashi et al, 1986; White et al, 1986) ส่วนตำแหน่ง p.I173N เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค โดยส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้เพียงร้อยละ 1 ของการทำงานปกติ (Chiou, Hu, & Chung, 1990; Tusie-Luna & White, 1995) และมีความสัมพันธ์แบบจำเพาะเจาะจงกับโรคชนิด simple virilizing form แต่ก็มีรายงานที่อธิบายไว้กับโรคชนิด salt wasting form ด้วย (Wilson, Mercado, Cheng, & New, 1995)

สำหรับตำแหน่ง p.V306Ffs เป็นการแทรกสอดจำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ ในเอ็กซอนที่ 7 ของยีนเทียม *CYP21A1P* นี้ ซึ่งไม่มีรายงานที่อธิบายว่าเป็นตำแหน่งการแปรผันทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดโรค แต่ปรากฏอยู่ในกลุ่มของยีนเทียม *CYP21A1P* ที่ถ่ายโอนมาด้วยกันกับการแปรผันทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดโรค ในเอ็กซอนที่ 7 และเอ็กซอนที่ 8 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยชาวดัตช์ (Dutch patient) (Stikkelbroeck et al., 2003) ประกอบด้วยตำแหน่ง V282L, p.V306Ffs, Q319X และ R357W ในการศึกษานี้พบกลุ่มยีนนี้ในผู้ป่วยเพียง 1 ราย

ตำแหน่ง p.Q318X และ p.R356W เป็นอีก 2 ตำแหน่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคและมีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.061 คิดเป็นร้อยละ 6.1 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมดเท่ากันทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยตำแหน่ง p.Q318X เป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค เมื่อตำแหน่งโคดอนที่ 318 เปลี่ยนจาก CAG ซึ่งถอดรหัสและแปลรหัสเป็นกรดแอมิโนชนิดกลูตามีน (glutamine) เป็น TAG ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบการกลายเปลี่ยนรหัสหยุด ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานไม่สมบูรณ์ เนื่องมาจากการหยุดการแปลรหัสก่อนกำหนด (Globerman, Amor, Parker, New, & White, 1988) ส่วน p.R356W ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกรณีที่เป็นการแสดงออกในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Yujiro Higashi et al., 1991; Yujiro Higashi et al., 1988) ตำแหน่งดังกล่าวตั้งอยู่บริเวณของยีนที่ถอดรหัสและแปลรหัสเป็น K helix ของเอนไซม์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรคนี้อาจส่งผลกระทบต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ cytochrome P450 reductase (POR) แต่ยังไม่มีการยืนยันด้วยการทดลองทางห้องปฏิบัติการ (Lajic et al., 1997)

รายงานเกี่ยวกับยีนคอนเวอร์ชันและการขาดหายขนาดใหญ่ของยีน *C4B* และยีน *CYP21A2* กับการเกิดยีนลูกผสม *CYP21A1P/CYP21A2* chimera พบร้อยละ 20 ของการแปรผันทางพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุของโรค การขาดหายขนาดใหญ่ตั้งแต่ชิ้นส่วนฝั่ง 3' ของยีน *CYP21A1P* ยีน *C4B* ทั้งหมด และชิ้นส่วนฝั่ง 5' ของยีน *CYP21A2* ซึ่งส่วนที่ขาดหายไปมีความยาว 26 หรือ 32 กิโลเบส ขึ้นอยู่กับความยาวของยีน *C4B* ทำให้เกิดยีนลูกผสม chimera ที่ไม่สามารถทำงานได้ ประกอบด้วยชิ้นส่วนฝั่ง 5' ของยีน *CYP21A1P* และชิ้นส่วนฝั่ง 3' ของยีน *CYP21A2* (Concolino et al., 2009; L'Allemand et al., 2000; Lee, 2004; Lee et al., 2003; Perrin C White et al., 1984) ซึ่งในการศึกษานี้พบการขาดหายขนาดใหญ่ของยีนจำนวน 23 แอลลีล จาก 98 แอลลีล มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.235 (ร้อยละ 23.5 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด) สูงกว่าอีกกลุ่มประชากรที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (ร้อยละ 15 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด (Ma et al., 2014) ร้อยละ 8 ของแอลลีลผู้ป่วยทั้งหมด (R. C. Wilson et al., 2007))

เมื่อพิจารณาจีโนไทป์คู่แอลลีลของผู้ป่วยแต่ละราย พบผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ในกลุ่ม null จำนวน 11 ราย กลุ่ม A จำนวน 25 ราย กลุ่ม B จำนวน 10 ราย และกลุ่ม C จำนวน 3 ราย ข้อมูลจีโนไทป์นี้จึงสามารถใช้ประกอบการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามความรุนแรงของโรคที่มีความสอดคล้องกับข้อมูลลักษณะทางคลินิกได้ (ตารางที่ 10)

ข้อเสนอแนะ

ความรู้และเทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์สามารถอธิบายได้ว่าตำแหน่ง IVS7+1G>T ที่เป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์พบใหม่นั้นมีความน่าจะเป็นที่จะเป็นตำแหน่งการแปรผันทางพันธุกรรมที่ก่อให้เกิดโรค เนื่องจากตำแหน่งนี้ส่งผลให้กระบวนการตัดเชื่อมของอินทรอนและเอ็กซอนผิดปกติ และนำไปสู่การแปลรหัสแบบเลื่อนกรอบ โดยการทดลองทางห้องปฏิบัติการจะสามารถช่วยยืนยันผลกระทบจากการกลายพันธุ์นี้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น วิธีการตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดโรคในโรคที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ได้แก่ วิธีตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) วิธีวัดระดับการแสดงออกของยีน (gene expression) แต่เนื่องจากยีน *CYP21A2* ไม่มีการแสดงออกในเลือด จึงสร้างความยากลำบากแก่การเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ

ขณะที่ดำเนินการวิจัยนี้ เทคโนโลยีวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเดี่ยวแบบตามเวลาจริง ของบริษัท PacBio มีอัตราค่าใช้จ่ายที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้กับวิธีการดั้งเดิมอื่น ๆ โครงการนี้จึงเป็นโครงการนำร่องสำหรับการหาการกลายพันธุ์ในยีนที่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับยีนเทียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ค่าใช้จ่ายดังกล่าวจะลดลงในอนาคต และสามารถเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับโรงพยาบาลทั่วไปได้

บรรณานุกรม

- Al-Mendalawi, M. D. (2018). Comment on: Growth characteristics in children with congenital adrenal hyperplasia. *Saudi medical journal*, 39(11), 1164.
- Ammar, R., Paton, T. A., Torti, D., Shlien, A., & Bader, G. D. (2015). Long read nanopore sequencing for detection of HLA and CYP2D6 variants and haplotypes. *F1000Research*, 4.
- Apóstolos, R. A., Canguçu-Campinho, A. K., Lago, R., Costa, A. C. S., Oliveira, L. M., Toralles, M. B., & Barroso, U. (2018). Gender identity and sexual function in 46, XX patients with congenital adrenal hyperplasia raised as males. *Archives of sexual behavior*, 47(8), 2491-2496.
- Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R., & Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic acids research*, 46(5), 2159-2168.
- Balsamo, A., Baldazzi, L., Menabo, S., & Cicognani, A. (2010). Impact of molecular genetics on congenital adrenal hyperplasia management. *Sex Dev*, 4(4-5), 233-248. doi:10.1159/000315959
- Bardaro, T., Falco, G., Sparago, A., Mercadante, V., Gean Molins, E., Tarantino, E., . . . D'Urso, M. (2003). Two cases of misinterpretation of molecular results in incontinentia pigmenti, and a PCR-based method to discriminate NEMO/IKK γ gene deletion. *Human mutation*, 21(1), 8-11.
- Blanchong, C. A., Zhou, B., Rupert, K. L., Chung, E. K., Jones, K. N., Sotos, J. F., . . . Yung Yu, C. (2000). Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. *J Exp Med*, 191(12), 2183-2196. doi:10.1084/jem.191.12.2183
- Borràs, D. M., Vossen, R. H., Liem, M., Buermans, H. P., Dauwerse, H., van Heusden, D., . . . Peters, D. J. (2017). Detecting PKD1 variants in polycystic kidney disease

- patients by single-molecule long-read sequencing. *Human mutation*, 38(7), 870-879.
- Bristow, J., Tee, M. K., Gitelman, S. E., Mellon, S. H., & Miller, W. L. (1993). Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol*, 122(1), 265-278. doi:10.1083/jcb.122.1.265
- Buermans, H. P., Vossen, R. H., Anvar, S. Y., Allard, W. G., Guchelaar, H. J., White, S. J., . . . van der Straaten, T. (2017). Flexible and scalable full-length CYP2D6 long amplicon PacBio sequencing. *Human mutation*, 38(3), 310-316.
- Carneiro, M. O., Russ, C., Ross, M. G., Gabriel, S. B., Nusbaum, C., & DePristo, M. A. (2012). Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC genomics*, 13(1), 375.
- Carvalho, B., Pereira, M., Marques, C., Carvalho, D., Leão, M., Oliveira, J., . . . Carvalho, F. (2012). Comprehensive genetic analysis and structural characterization of CYP21A2 mutations in CAH patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120(9), 535-539.
- Chiou, S.-H., Hu, M.-C., & Chung, B.-C. (1990). A missense mutation at Ile172----Asn or Arg356----Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3549-3552.
- Claes, K. B., & De Leeneer, K. (2014). Dealing with pseudogenes in molecular diagnostics in the next-generation sequencing era. In *Pseudogenes* (pp. 303-315): Springer.
- Clarke, J., Wu, H.-C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature nanotechnology*, 4(4), 265-270.
- Concolino, P., Mello, E., Toscano, V., Ameglio, F., Zuppi, C., & Capoluongo, E. (2009). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. *Clin Chim Acta*, 402(1-2), 164-170.

doi:10.1016/j.cca.2009.01.008

- D'Errico, I., Gadaleta, G., & Saccone, C. (2004). Pseudogenes in metazoa: origin and features. *Briefings in Functional Genomics*, 3(2), 157-167.
- Dougherty, M. L., Underwood, J. G., Nelson, B. J., Tseng, E., Munson, K. M., Penn, O., . . . Eichler, E. E. (2018). Transcriptional fates of human-specific segmental duplications in brain. *Genome research*, 28(10), 1566-1576.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., . . . Bettman, B. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323(5910), 133-138.
- Frans, G., Meert, W., Ten Bosch, J. V. d. W., Meyts, I., Bossuyt, X., Vermeesch, J. R., & Hestand, M. S. (2018). Conventional and single-molecule targeted sequencing method for specific variant detection in IKBKG while bypassing the IKBKG1 pseudogene. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 20(2), 195-202.
- Gitelman, S. E., Bristow, J., & Miller, W. L. (1992). Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus. *Mol Cell Biol*, 12(5), 2124-2134. doi:10.1128/mcb.12.5.2124
- Globerman, H., Amor, M., Parker, K., New, M., & White, P. (1988). Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 82(1), 139-144.
- Gondim, R., Teles, F., & Barroso Jr, U. (2018). Sexual orientation of 46, XX patients with congenital adrenal hyperplasia: a descriptive review. *Journal of pediatric urology*, 14(6), 486-493.
- Hebert, P. D., Braukmann, T. W., Prosser, S. W., Ratnasingham, S., DeWaard, J. R., Ivanova, N. V., . . . Sones, J. E. (2018). A Sequel to Sanger: amplicon sequencing that scales. *BMC genomics*, 19(1), 1-14.
- Hestand, M. S., Van Houdt, J., Cristofoli, F., & Vermeesch, J. R. (2016). Polymerase specific error rates and profiles identified by single molecule sequencing. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,

784, 39-45.

- Higashi, Y., Hiromasa, T., Tanae, A., Miki, T., Nakura, J., Kondo, T., . . . Fujii-Kuriyama, Y. (1991). Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene on the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of Biochemistry*, 109(4), 638-644.
- Higashi, Y., Tanae, A., Inoue, H., Hiromasa, T., & Fujii-Kuriyama, Y. (1988). Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450 (C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(20), 7486-7490.
- Higashi, Y., Yoshioka, H., Yamane, M., Gotoh, O., & Fujii-Kuriyama, Y. (1986). Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(9), 2841-2845. doi:10.1073/pnas.83.9.2841
- Jayakrishnan, R., Lao, Q., Adams, S. D., Ward, W. W., & Merke, D. P. (2019). Revisiting the association of HLA alleles and haplotypes with CYP21A2 mutations in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Gene*, 687, 30-34.
- Keen-Kim, D., Redman, J. B., Alanes, R. U., Eachus, M. M., Wilson, R. C., New, M. I., . . . Fenwick, R. G. (2005). Validation and clinical application of a locus-specific polymerase chain reaction- and minisequencing-based assay for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Mol Diagn*, 7(2), 236-246. doi:10.1016/S1525-1578(10)60550-8
- Ko, P. J., & Yeh, M. L. (2015). Images in clinical medicine. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*, 372(24), e32. doi:10.1056/NEJMicm1403201
- Krone, N., & Arlt, W. (2009). Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, 23(2), 181-192.
- L'Allemand, D., Tardy, V., Gruters, A., Schnabel, D., Krude, H., & Morel, Y. (2000). How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can

- have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12), 4562-4567. doi:10.1210/jcem.85.12.7018
- Lajic, S., Levo, A., Nikoshkov, A., Lundberg, Y., Partanen, J., & Wedell, A. (1997). A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Human genetics*, 99(6), 704-709.
- Lee, H. H. (2004). The chimeric CYP21P/CYP21 gene and 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet*, 49(2), 65-72. doi:10.1007/s10038-003-0115-2
- Lee, H. H. (2005). Chimeric CYP21P/CYP21 and TNXA/TNXB genes in the RCCX module. *Mol Genet Metab*, 84(1), 4-8. doi:10.1016/j.ymgme.2004.09.009
- Lee, H. H., Chang, S. F., Lee, Y. J., Raskin, S., Lin, S. J., Chao, M. C., . . . Lin, C. Y. (2003). Deletion of the C4-CYP21 repeat module leading to the formation of a chimeric CYP21P/CYP21 gene in a 9.3-kb fragment as a cause of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem*, 49(2), 319-322. doi:10.1373/49.2.319
- Lee, H. H., Chao, H. T., Ng, H. T., & Choo, K. B. (1996). Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *J Med Genet*, 33(5), 371-375. doi:10.1136/jmg.33.5.371
- Lee, H. H., Lee, Y. J., & Chao, M. C. (2010). Comparing the Southern blot method and polymerase chain reaction product analysis for chimeric RCCX detection in CYP21A2 deficiency. *Anal Biochem*, 399(2), 293-298. doi:10.1016/j.ab.2009.11.037
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., . . . Exome Aggregation, C. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291. doi:10.1038/nature19057
- Levene, M. J., Korlach, J., Turner, S. W., Foquet, M., Craighead, H. G., & Webb, W. W. (2003). Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, 299(5607), 682-686.
- Loidi, L., Quinteiro, C., Parajes, S., Barreiro, J., Lestón, D. G., Cabezas-Agrícola, J. M., . . . Costas, J. (2006). High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-

hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect.

Clinical endocrinology, 64(3), 330-336.

Ma, D., Chen, Y., Sun, Y., Yang, B., Cheng, J., Huang, M., . . . Xu, Z. (2014). Molecular analysis of the CYP21A2 gene in Chinese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Biochem*, 47(6), 455-463.

doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.01.019

Mandelker, D., Schmidt, R. J., Ankala, A., Gibson, K. M., Bowser, M., Sharma, H., . . . Lebo, M. (2016). Navigating highly homologous genes in a molecular diagnostic setting: a resource for clinical next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*, 18(12), 1282-1289.

Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*, 32(1), 81-151. doi:10.1210/er.2010-0013

Milyani, A. A., Al-Agha, A. E., & Al-Zanbagi, M. (2018). Initial presentations and associated clinical findings in patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 31(6), 671-673.

Morel, Y., Andre, J., Uring-Lambert, B., Hauptmann, G., Betuel, H., Tossi, M., . . . Miller, W. (1989). Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of clinical investigation*, 83(2), 527-536.

Narasimhan, M. L., & Khattab, A. (2019). Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. *Fertil Steril*, 111(1), 24-29.

doi:10.1016/j.fertnstert.2018.11.007

Neocleous, V., Fanis, P., Phylactou, L. A., & Skordis, N. (2018). Genotype is associated to the degree of virilization in patients with classic congenital adrenal hyperplasia.

Frontiers in Endocrinology, 9, 733.

Nimkarn, S., Gangishetti, P. K., Yau, M., & New, M. I. (2016). 21-Hydroxylase-deficient

- congenital adrenal hyperplasia. In *GeneReviews*®[Internet]: University of Washington, Seattle.
- Pei, B., Sisu, C., Frankish, A., Howald, C., Habegger, L., Mu, X. J., . . . Diekhans, M. (2012). The GENCODE pseudogene resource. *Genome biology*, 13(9), R51.
- Pollard, M. O., Gurdasani, D., Mentzer, A. J., Porter, T., & Sandhu, M. S. (2018). Long reads: their purpose and place. *Human molecular genetics*, 27(R2), R234-R241.
- Qiao, W., Yang, Y., Sebra, R., Mendiratta, G., Gaedigk, A., Desnick, R. J., & Scott, S. A. (2016). Long-read single molecule real-time full gene sequencing of cytochrome P450-2D6. *Human mutation*, 37(3), 315-323.
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., . . . Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13(1), 1-13.
- Roberts, R. J., Carneiro, M. O., & Schatz, M. C. (2013). The advantages of SMRT sequencing. *Genome biology*, 14(7), 1-4.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*, 30(12), e57-e57.
- Seo, J.-S., Rhie, A., Kim, J., Lee, S., Sohn, M.-H., Kim, C.-U., . . . Kim, J. (2016). De novo assembly and phasing of a Korean human genome. *Nature*, 538(7624), 243-247.
- Shen, L., Wu, L. C., Sanlioglu, S., Chen, R., Mendoza, A. R., Dangel, A. W., . . . Yu, C. Y. (1994). Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *J Biol Chem*, 269(11), 8466-8476.
Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132574>
- Sorensen, K. M., Andersen, P. S., Larsen, L. A., Schwartz, M., Schouten, J. P., & Nygren, A.

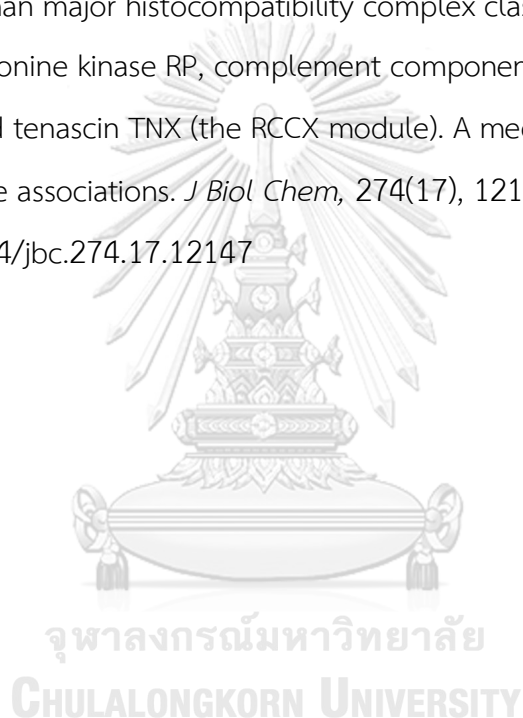
- O. (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem*, 80(23), 9363-9368. doi:10.1021/ac801688c
- Speiser, P. W., Arlt, W., Auchus, R. J., Baskin, L. S., Conway, G. S., Merke, D. P., . . . White, P. C. (2018). Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 103(11), 4043-4088. doi:10.1210/jc.2018-01865
- Speiser, P. W., Azziz, R., Baskin, L. S., Ghizzoni, L., Hensle, T. W., Merke, D. P., . . . Endocrine, S. (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(9), 4133-4160. doi:10.1210/jc.2009-2631
- Stikkelbroeck, N. M., Hoefsloot, L. H., de Wijs, I. J., Otten, B. J., Hermus, A. R., & Sistermans, E. A. (2003). CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8), 3852-3859.
- Tan, A. Y., Michael, A., Liu, G., Elemento, O., Blumenfeld, J., Donahue, S., . . . Rennert, H. (2014). Molecular diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using next-generation sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(2), 216-228.
- Travers, K. J., Chin, C.-S., Rank, D. R., Eid, J. S., & Turner, S. W. (2010). A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic acids research*, 38(15), e159-e159.
- Tusie-Luna, M.-T., & White, P. C. (1995). Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(23), 10796-10800.
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The third revolution in sequencing technology. *Trends in Genetics*, 34(9), 666-681.

- Vrzalova, Z., Hrabincova, E., Fajkusova, L., Vseticka, J., & Kozak, L. (2008). *MLPA in differential diagnostics of congenital adrenal hyperplasia*. Paper presented at the JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE.
- Wedell, A. (1998). Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Acta Paediatrica*, 87(2), 159-164.
- Wenger, A. M., Peluso, P., Rowell, W. J., Chang, P.-C., Hall, R. J., Concepcion, G. T., . . . Olson, N. D. (2019). Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nature biotechnology*, 37(10), 1155-1162.
- White, P. C., New, M. I., & Dupont, B. (1984). HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(23), 7505-7509.
- White, P. C., & Speiser, P. W. (2000). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*, 21(3), 245-291.
doi:10.1210/edrv.21.3.0398
- White, P. C., Vitek, A., Dupont, B., & New, M. I. (1988). Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), 4436-4440.
- Wilson, R., Mercado, A., Cheng, K., & New, M. (1995). Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(8), 2322-2329.
- Wilson, R. C., Nimkarn, S., Domic, M., Obeid, J., Azar, M., Najmabadi, H., . . . New, M. I. (2007). Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 90(4), 414-421.
- Wilson, R. C., Nimkarn, S., Domic, M., Obeid, J., Azar, M. R., Najmabadi, H., . . . New, M. I. (2007). Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital

adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*, 90(4), 414-421. doi:10.1016/j.ymgme.2006.12.005

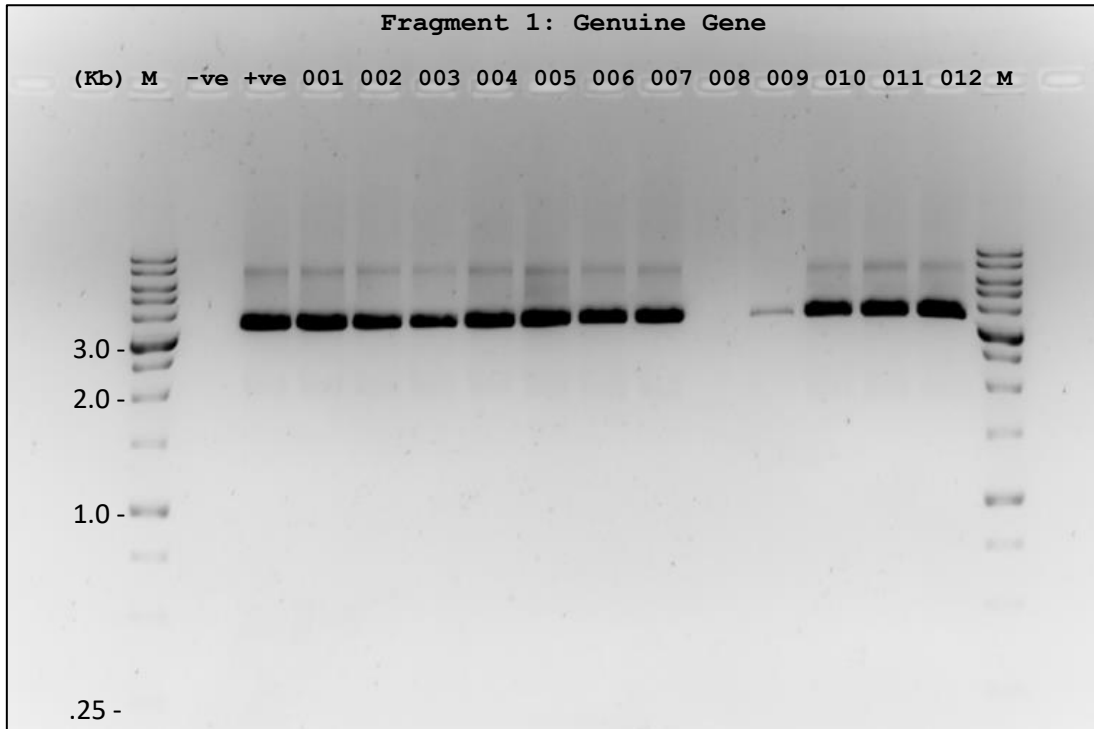
Xu, C., Jia, W., Cheng, X., Ying, H., Chen, J., Xu, J., . . . Li, G. (2019). Genotype–phenotype correlation study and mutational and hormonal analysis in a Chinese cohort with 21-hydroxylase deficiency. *Molecular genetics & genomic medicine*, 7(6), e671.

Yang, Z., Mendoza, A. R., Welch, T. R., Zipf, W. B., & Yu, C. Y. (1999). Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem*, 274(17), 12147-12156. doi:10.1074/jbc.274.17.12147



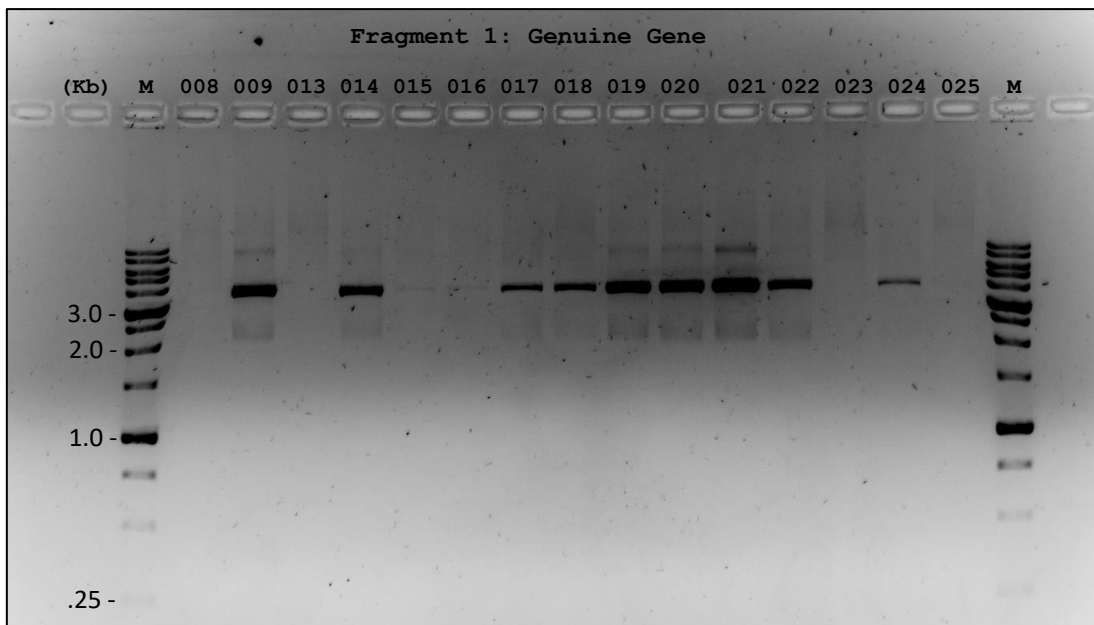
ภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่ 1 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของแอมพลิคอนที่ 1

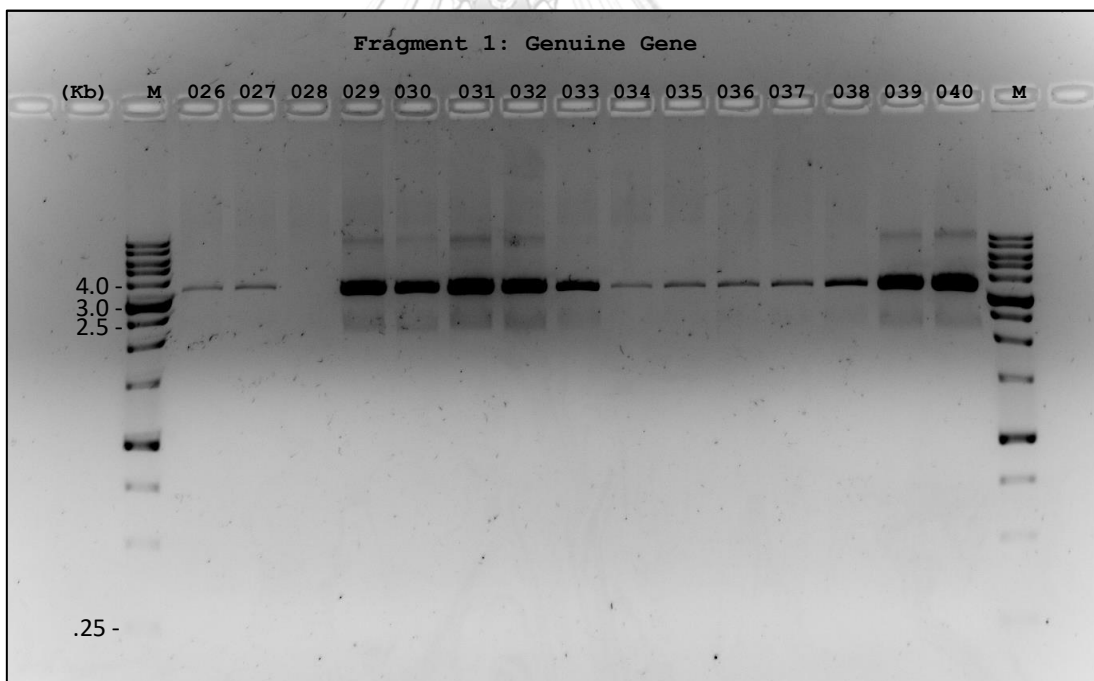


ภาพภาคผนวกที่ 1-1

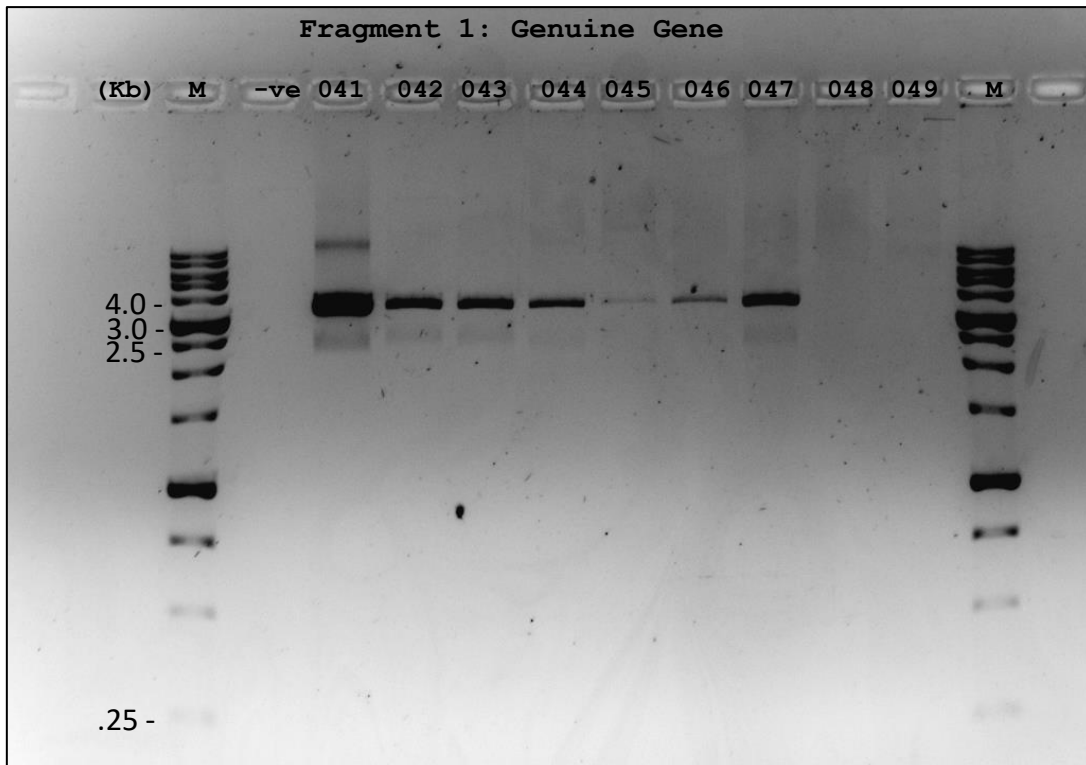
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



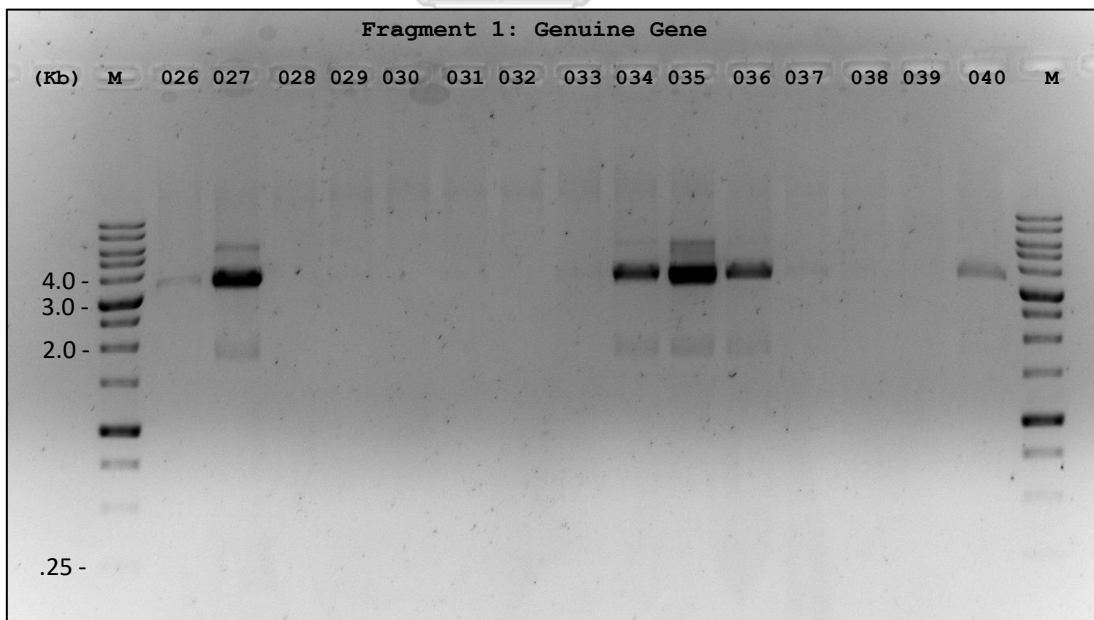
ภาพภาคผนวกที่ 1-2



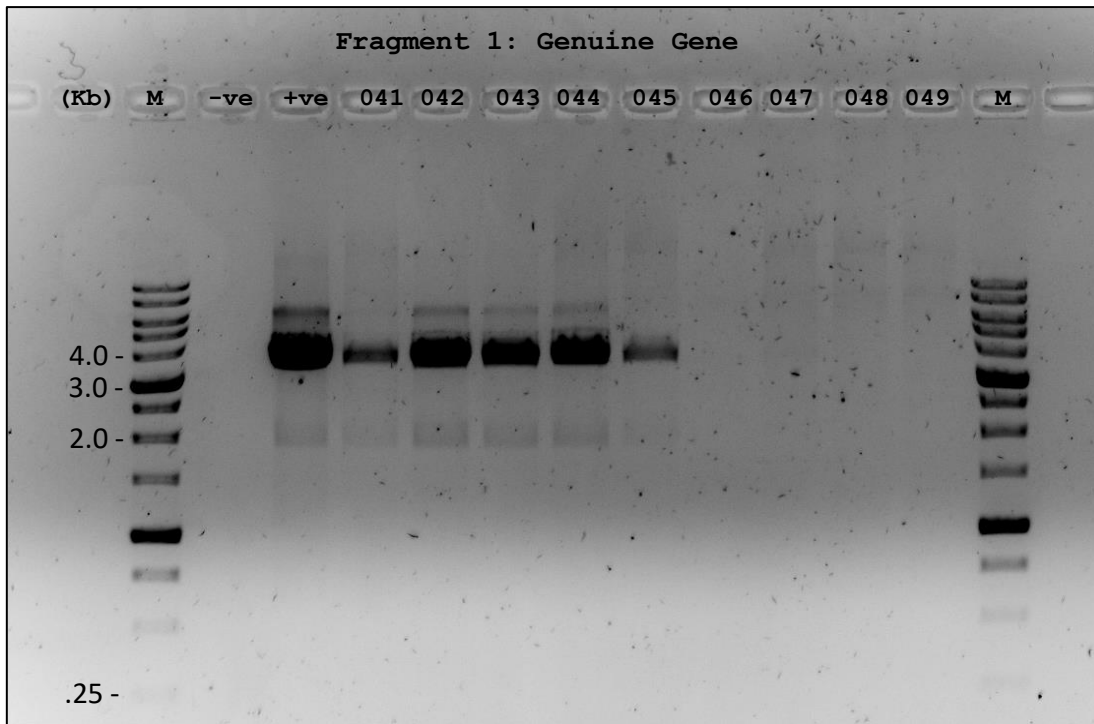
ภาพภาคผนวกที่ 1-3



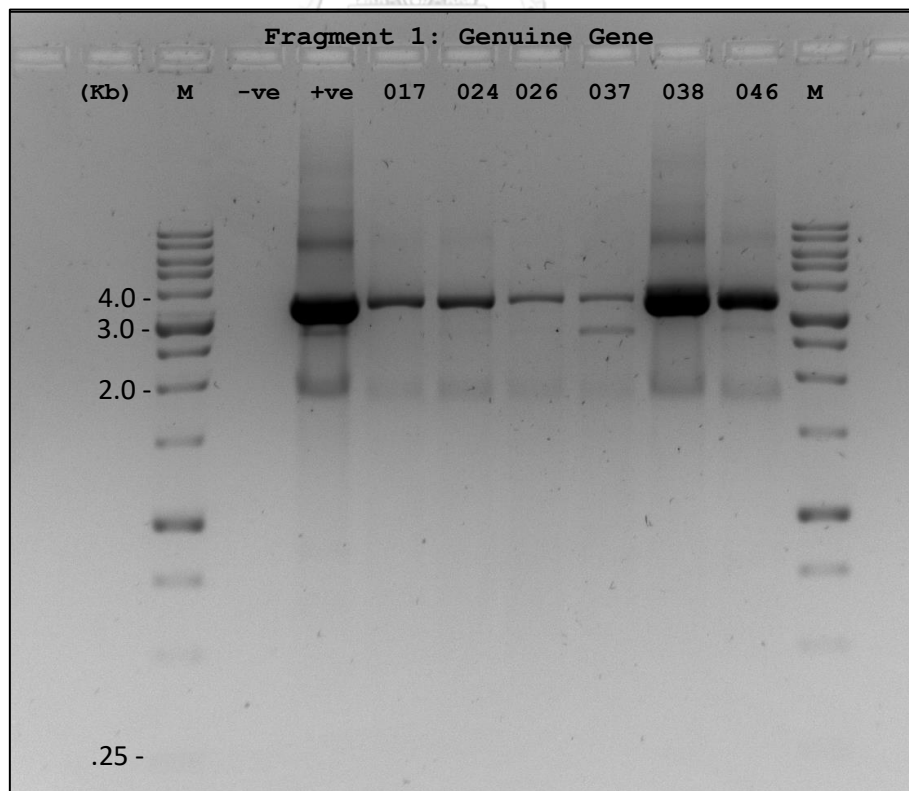
ภาพภาคผนวกที่ 1-4



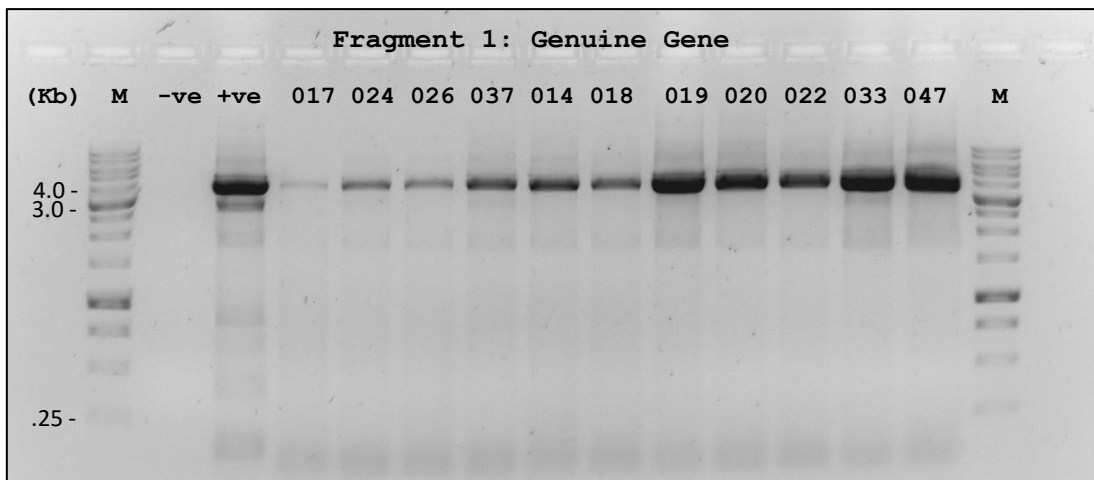
ภาพภาคผนวกที่ 1-5



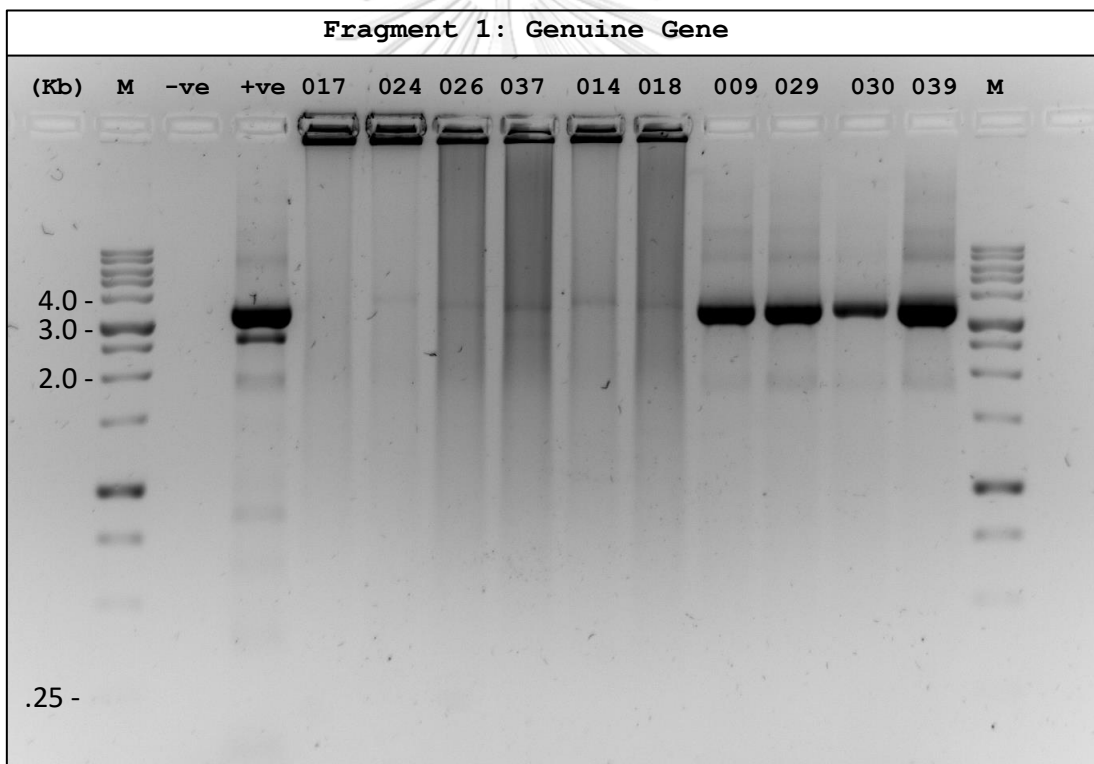
ภาพภาคผนวกที่ 1-6



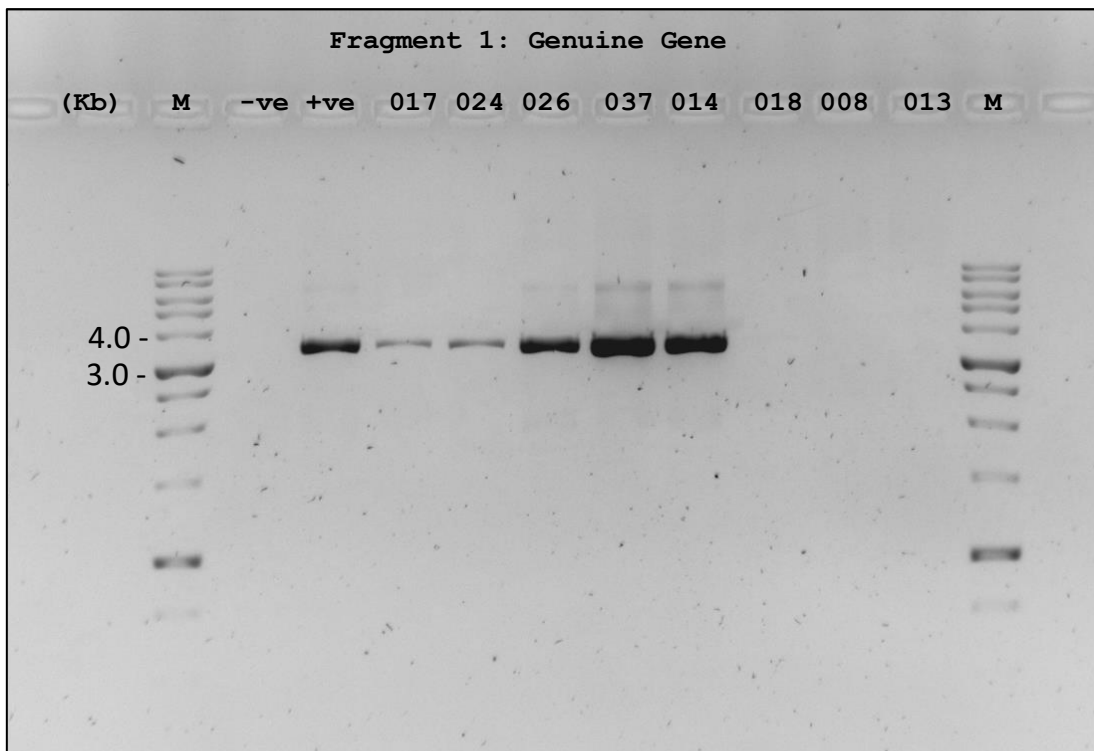
ภาพภาคผนวกที่ 1-7



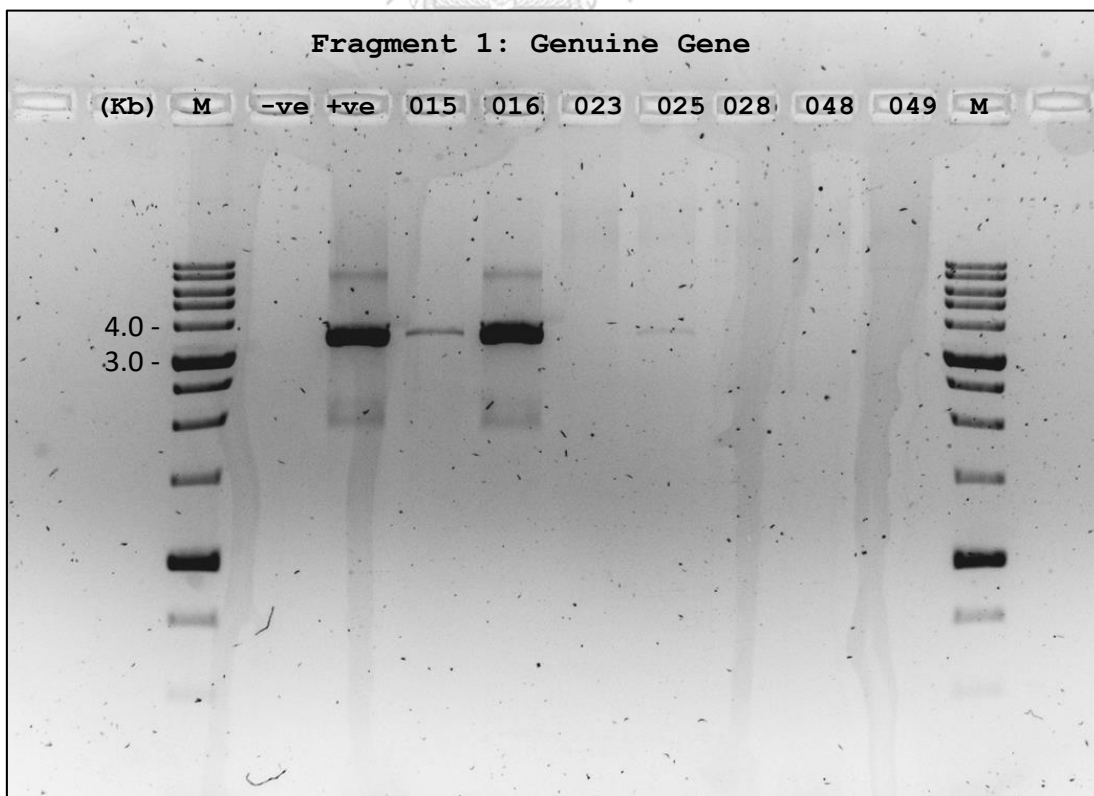
ภาพภาคผนวกที่ 1-8



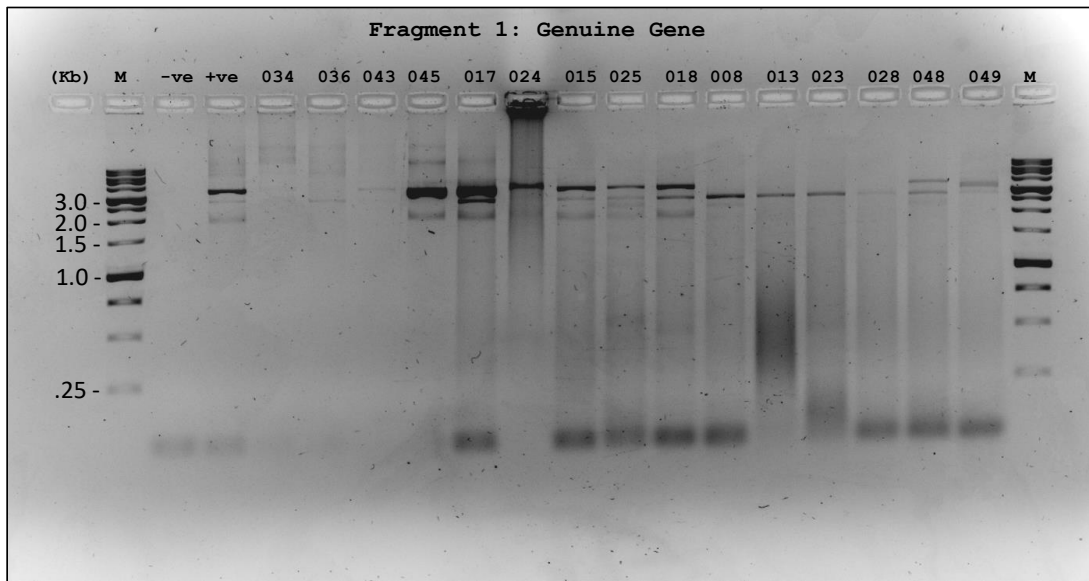
ภาพภาคผนวกที่ 1-9



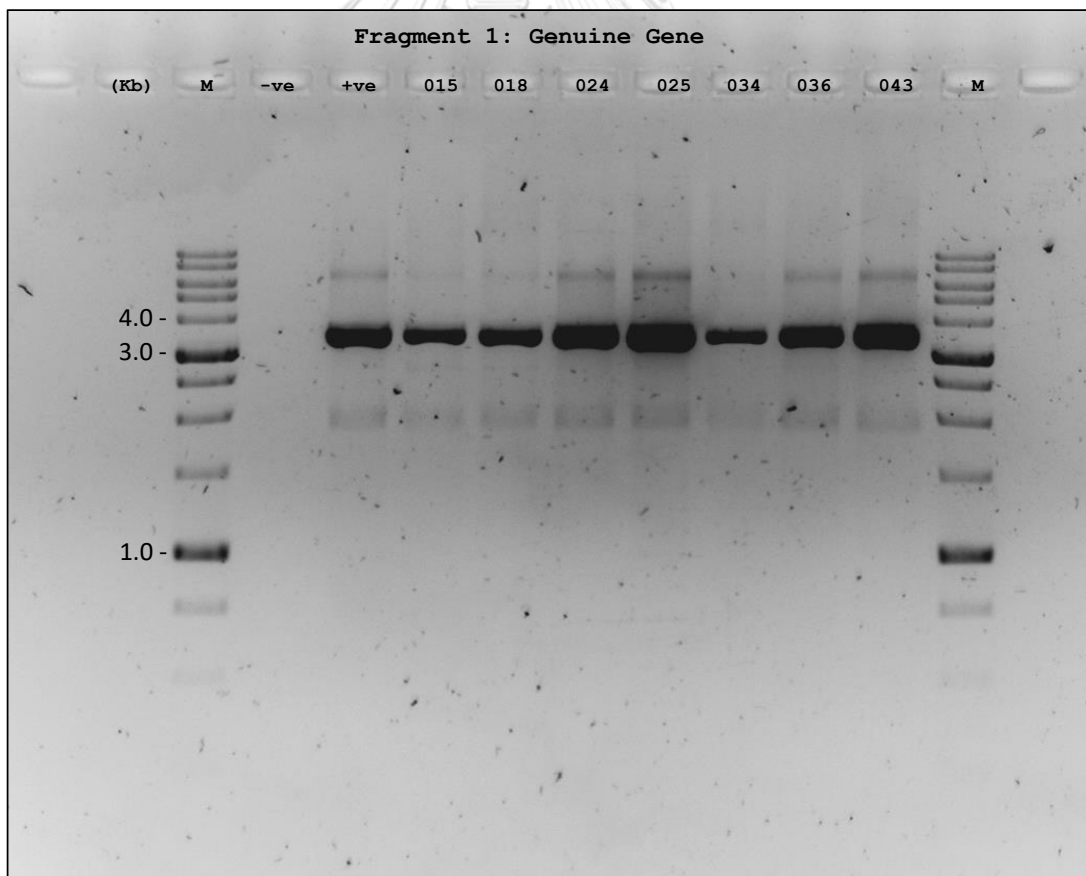
ภาพภาคผนวกที่ 1-10



ภาพภาคผนวกที่ 1-11

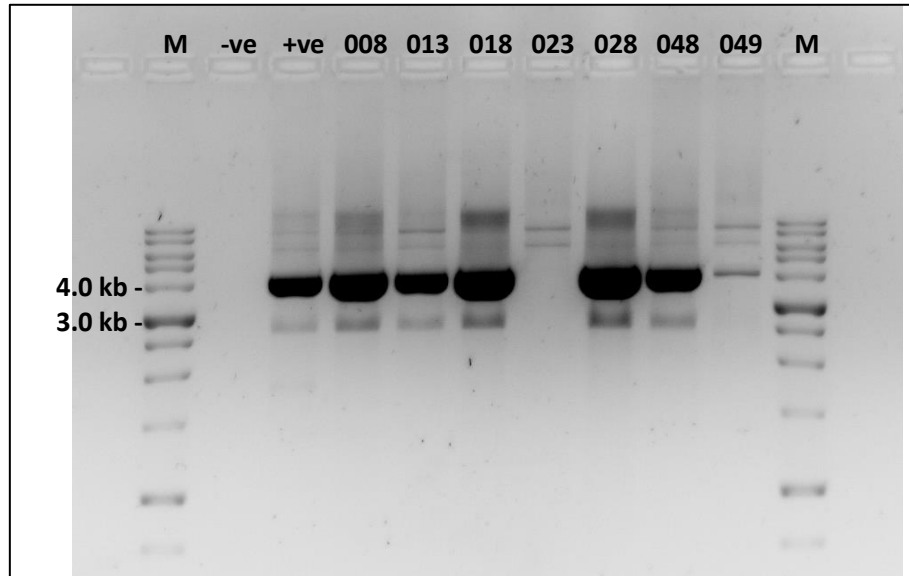


ภาพภาคผนวกที่ 1-12

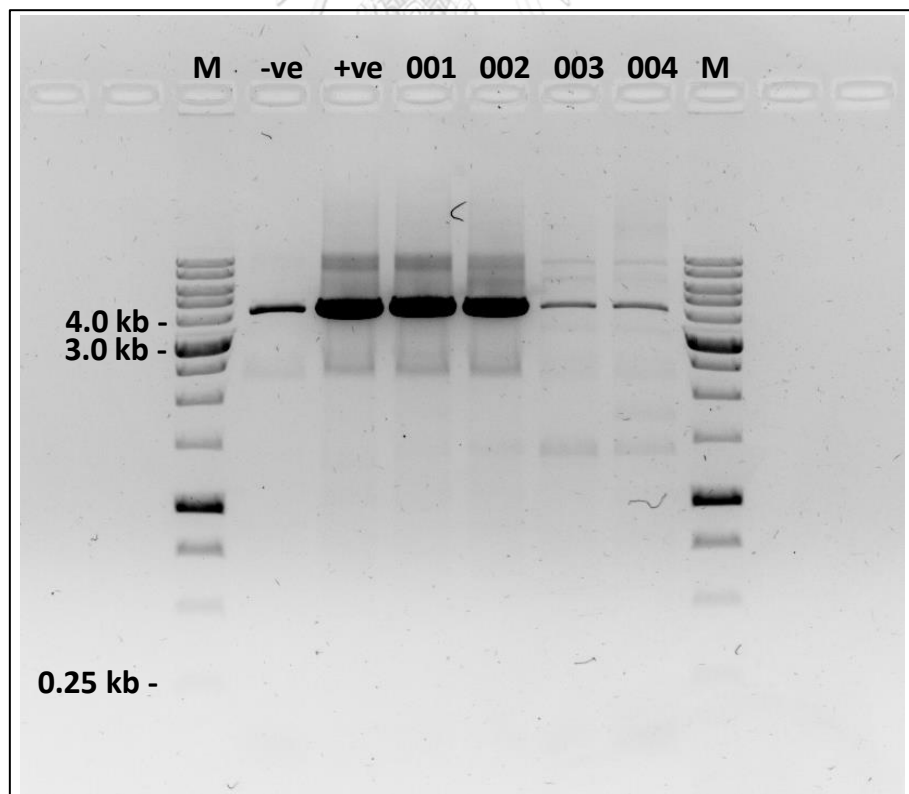


ภาพภาคผนวกที่ 1-13

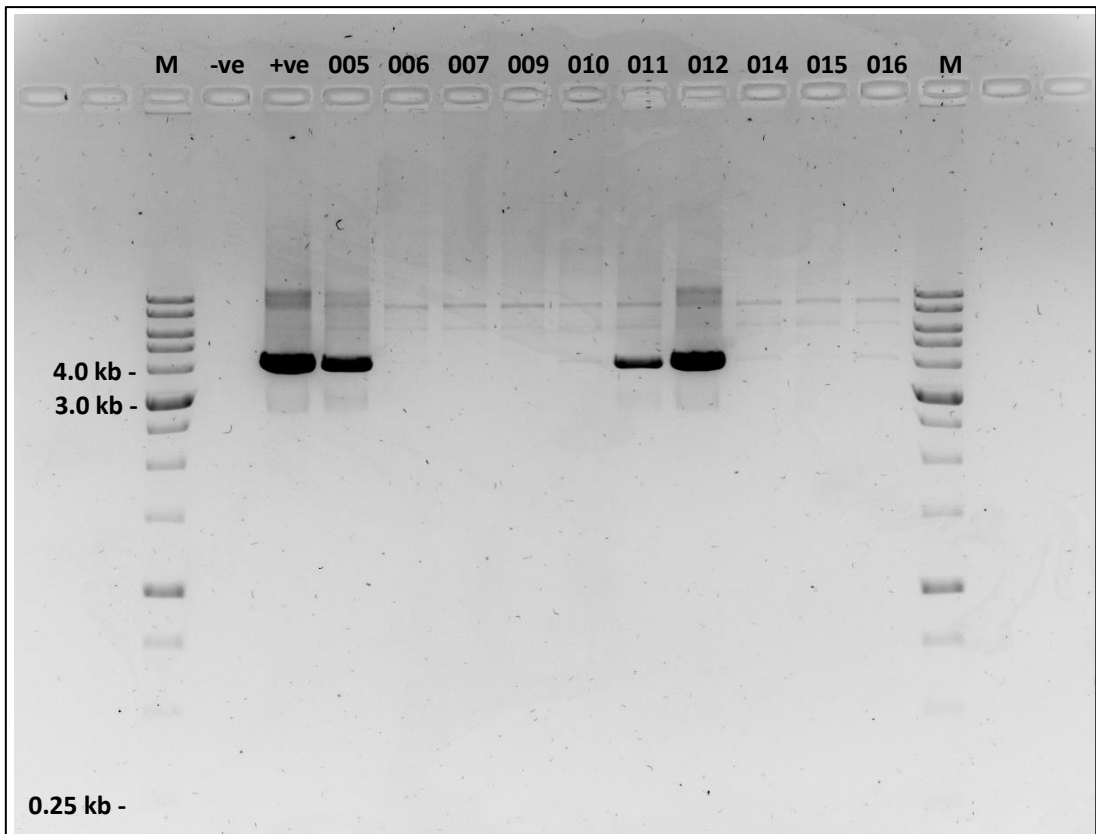
ภาพภาคผนวกที่ 2 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของแอมพลิคอนที่ 2



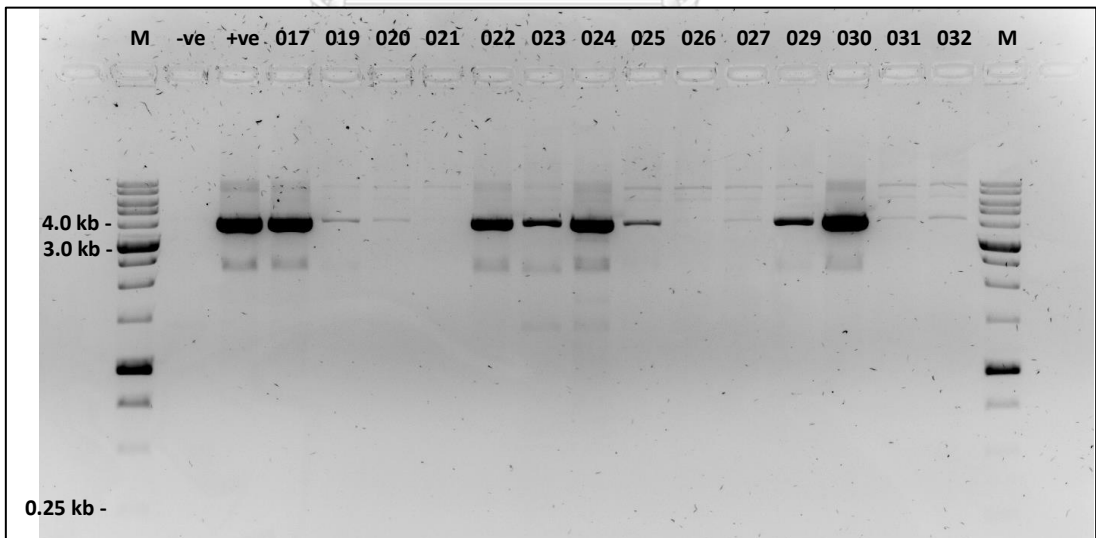
ภาพภาคผนวกที่ 2-1



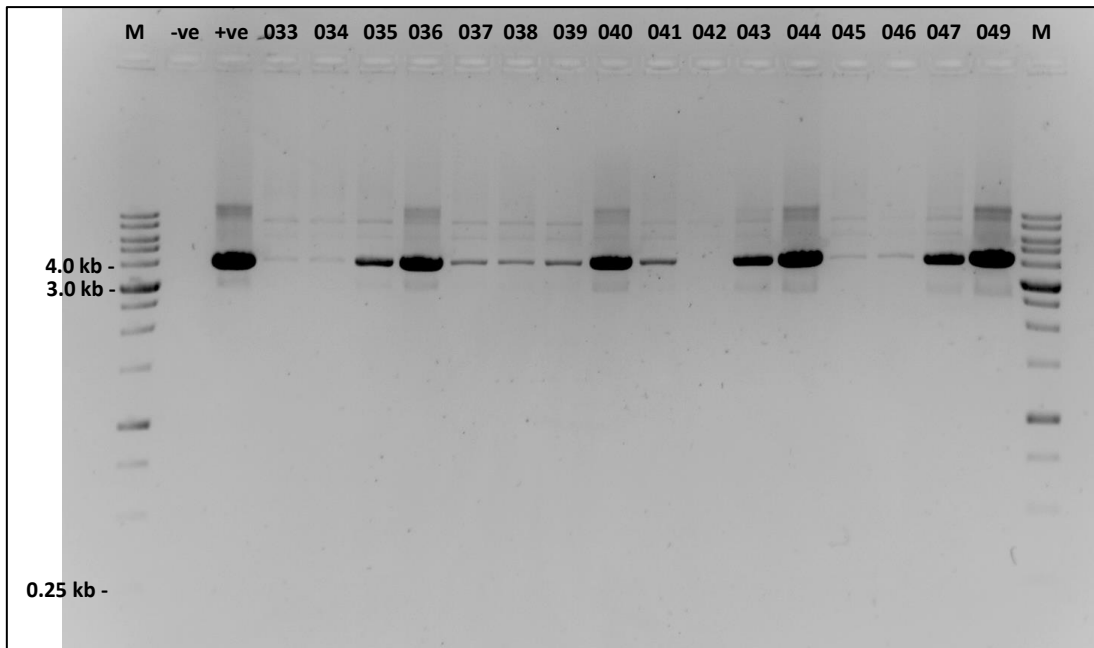
ภาพภาคผนวกที่ 2-2



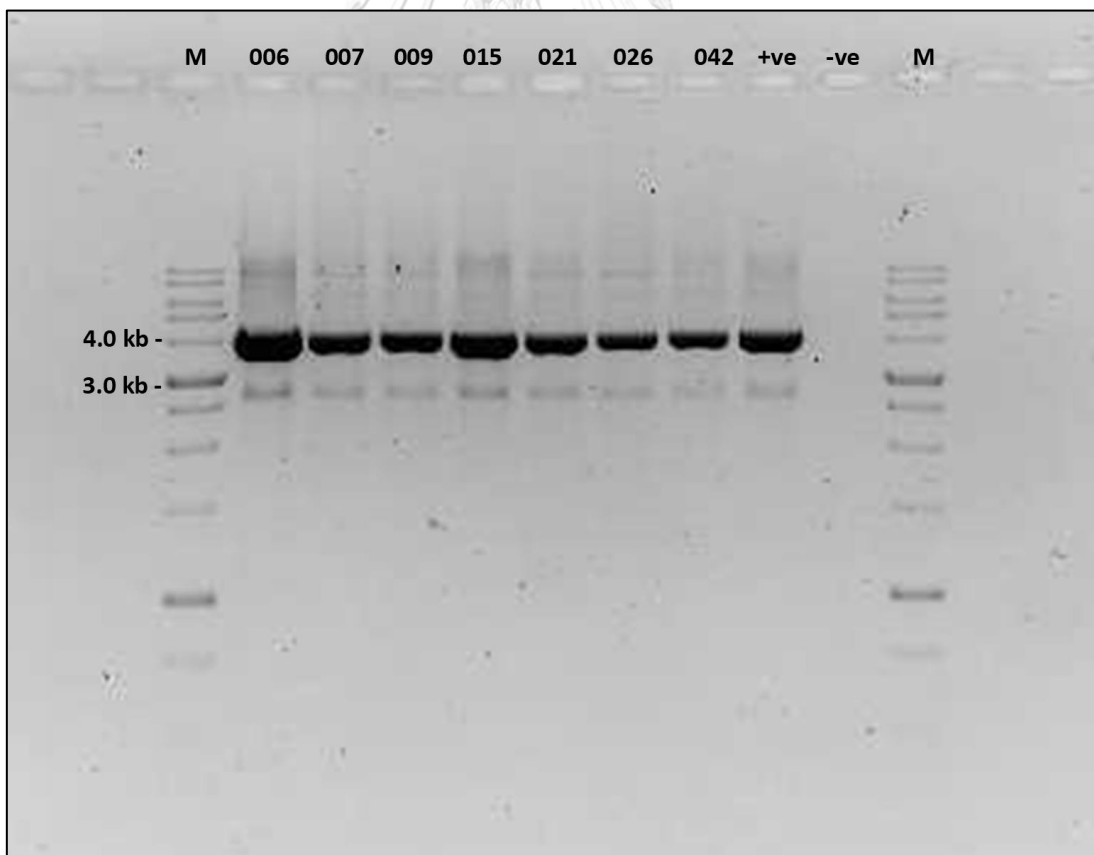
ภาพภาคผนวกที่ 2-3



ภาพภาคผนวกที่ 2-4

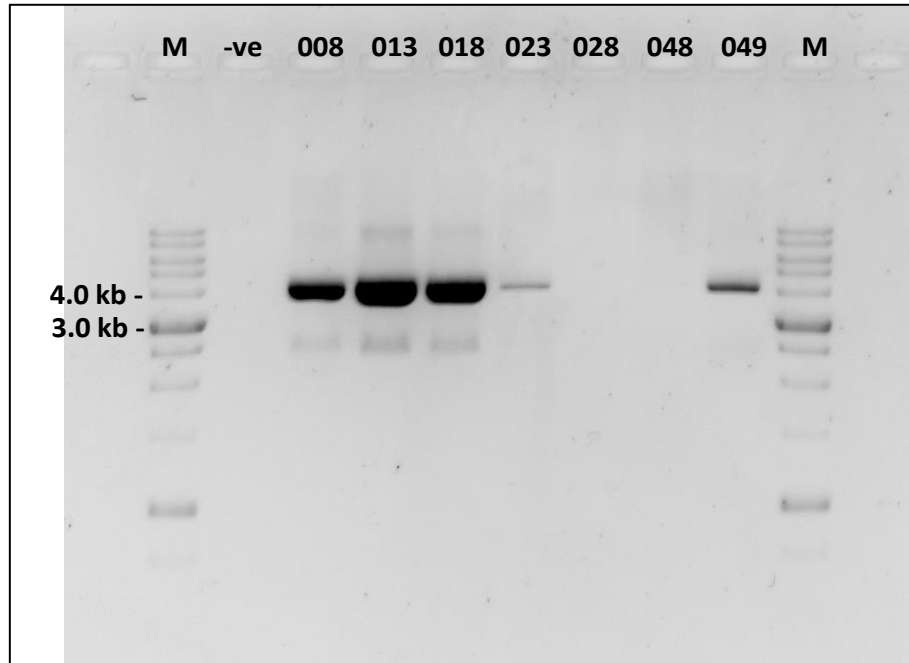


ภาพภาคผนวกที่ 2-5

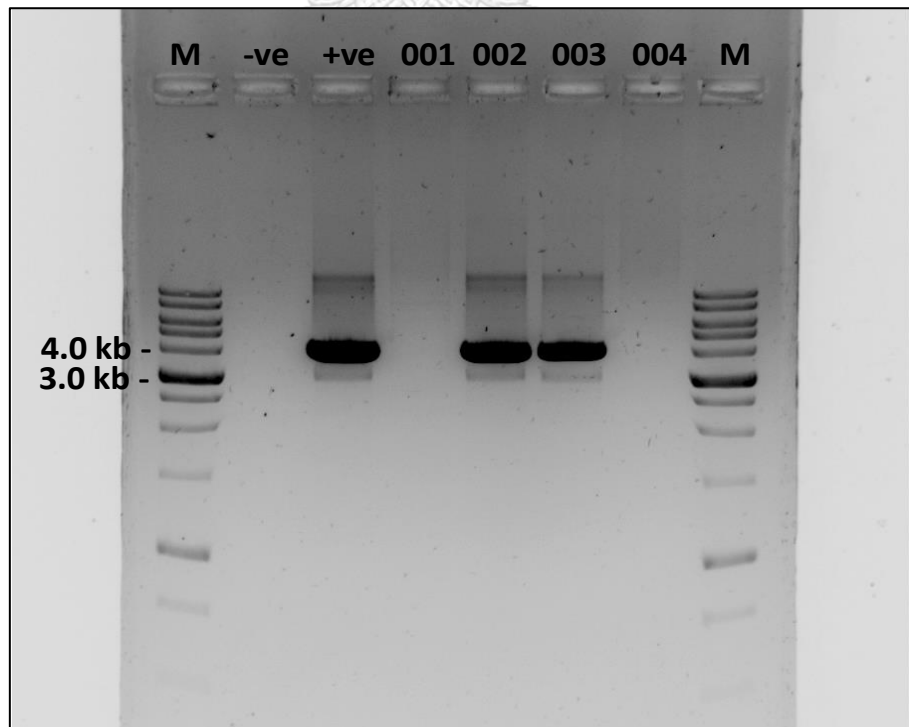


ภาพภาคผนวกที่ 2-6

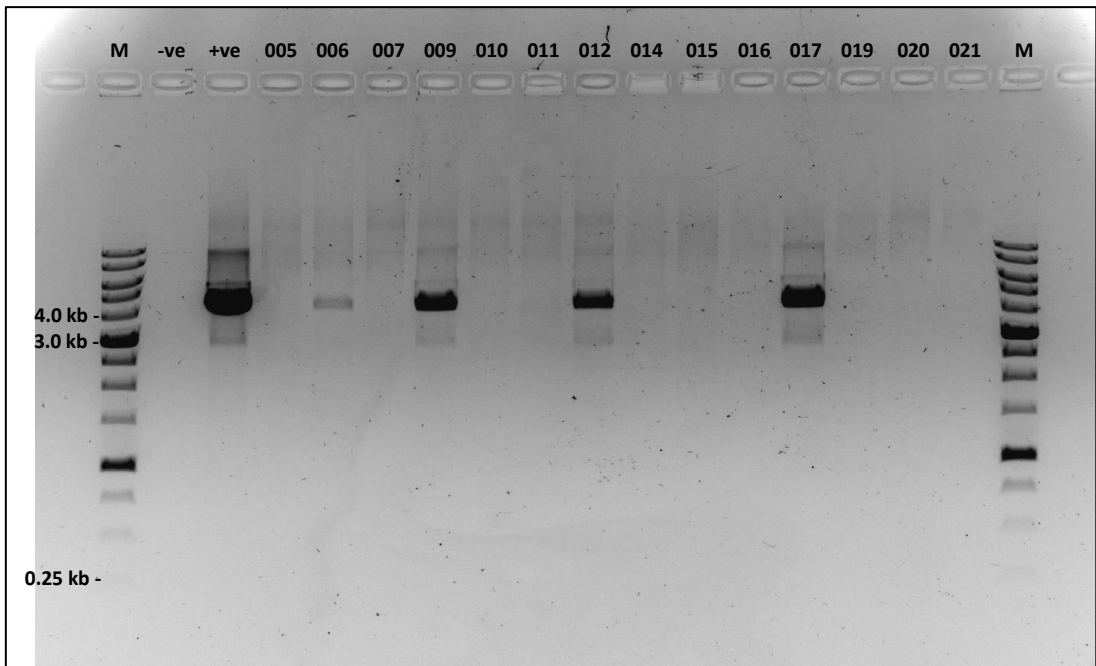
ภาพภาคผนวกที่ 3 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของแอมพลิคอนที่ 3



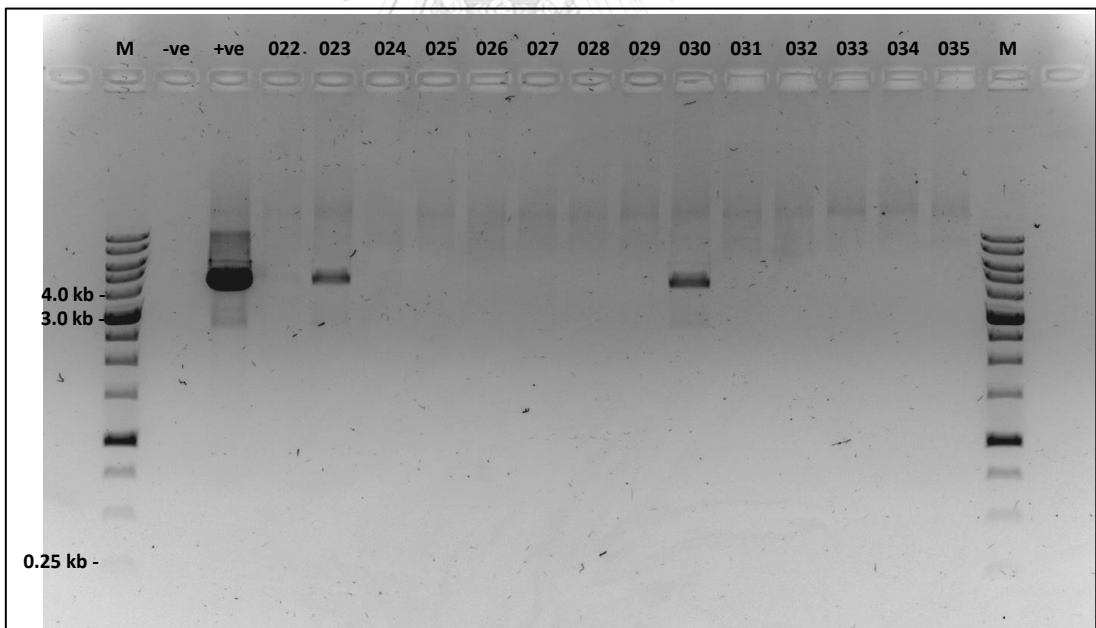
ภาพภาคผนวกที่ 3-1



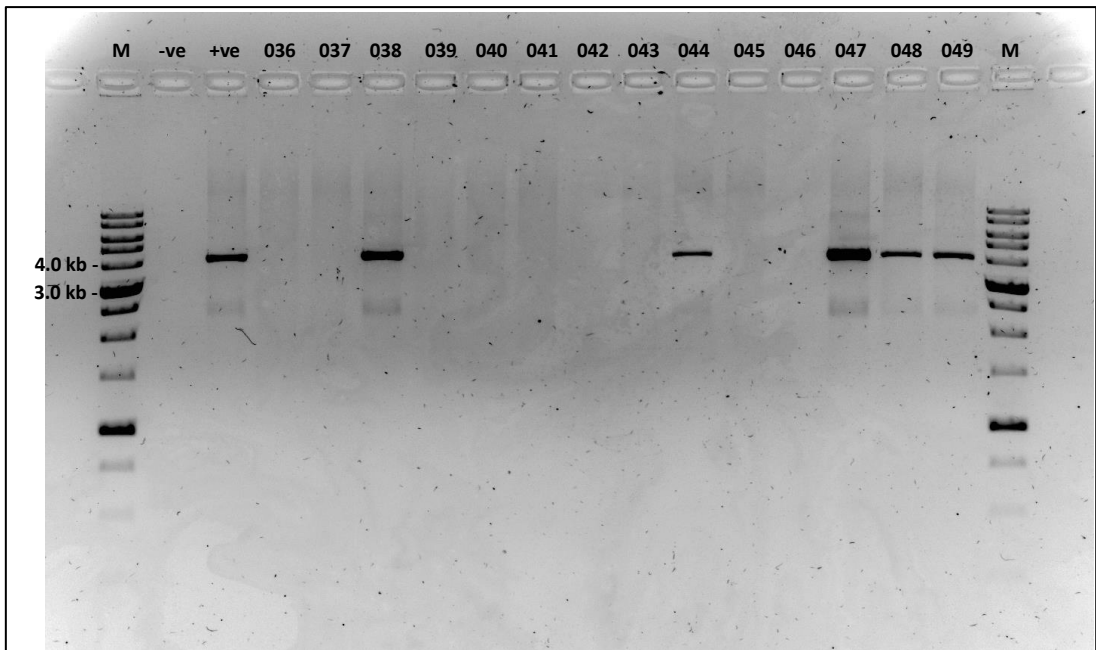
ภาพภาคผนวกที่ 3-2



ภาพภาคผนวกที่ 3-3



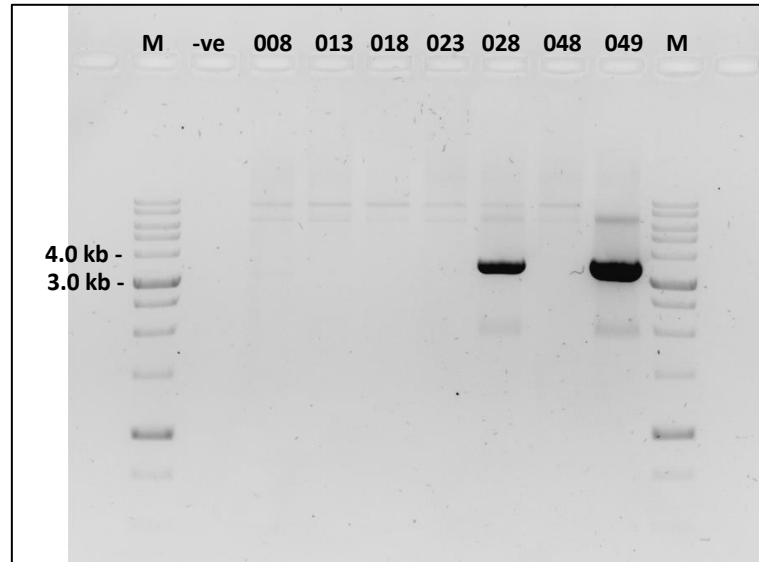
ภาพภาคผนวกที่ 3-4



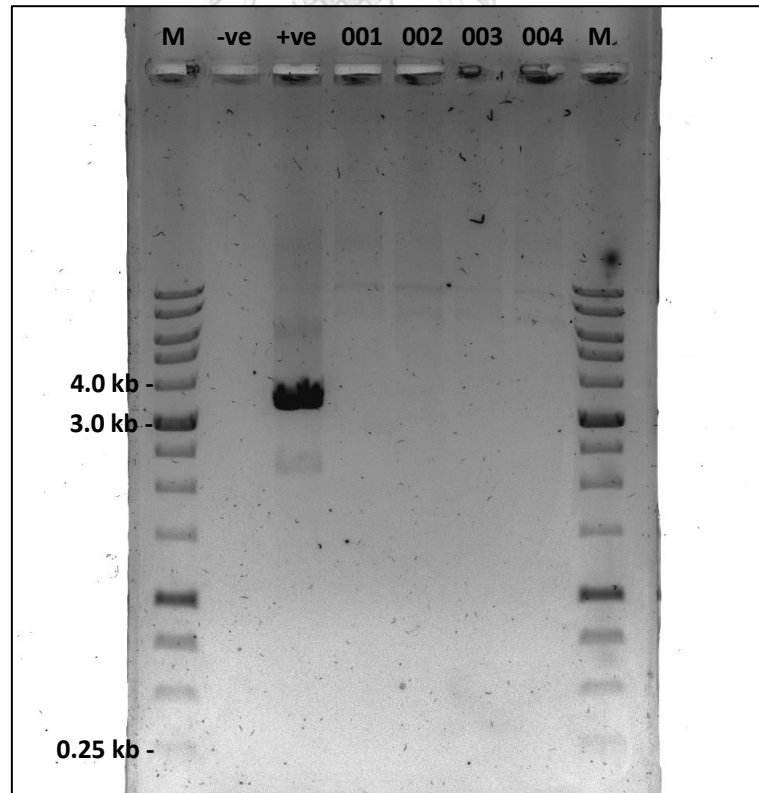
ภาพภาคผนวกที่ 3-5



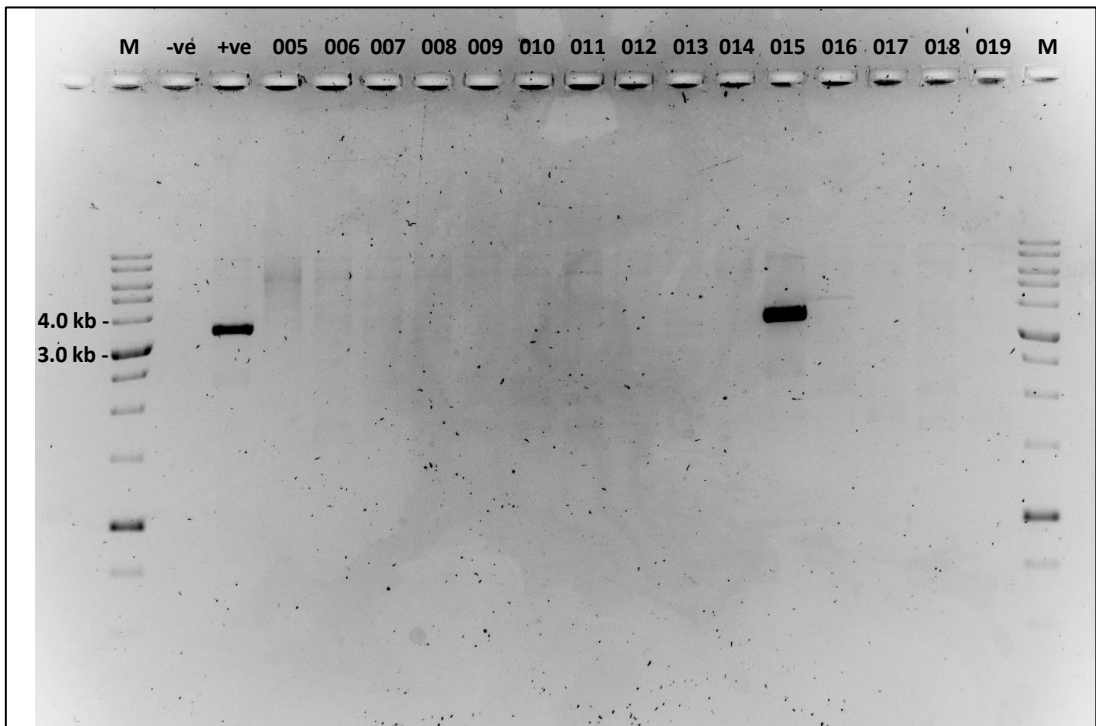
ภาพภาคผนวกที่ 4 ภาพเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของแอมพลิคอนที่ 4



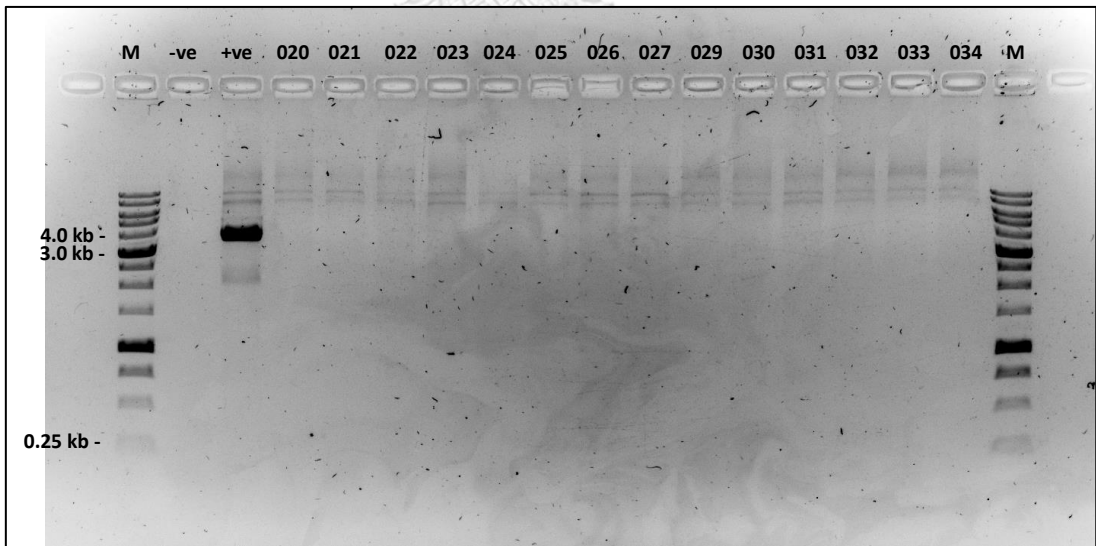
ภาพภาคผนวกที่ 4-1



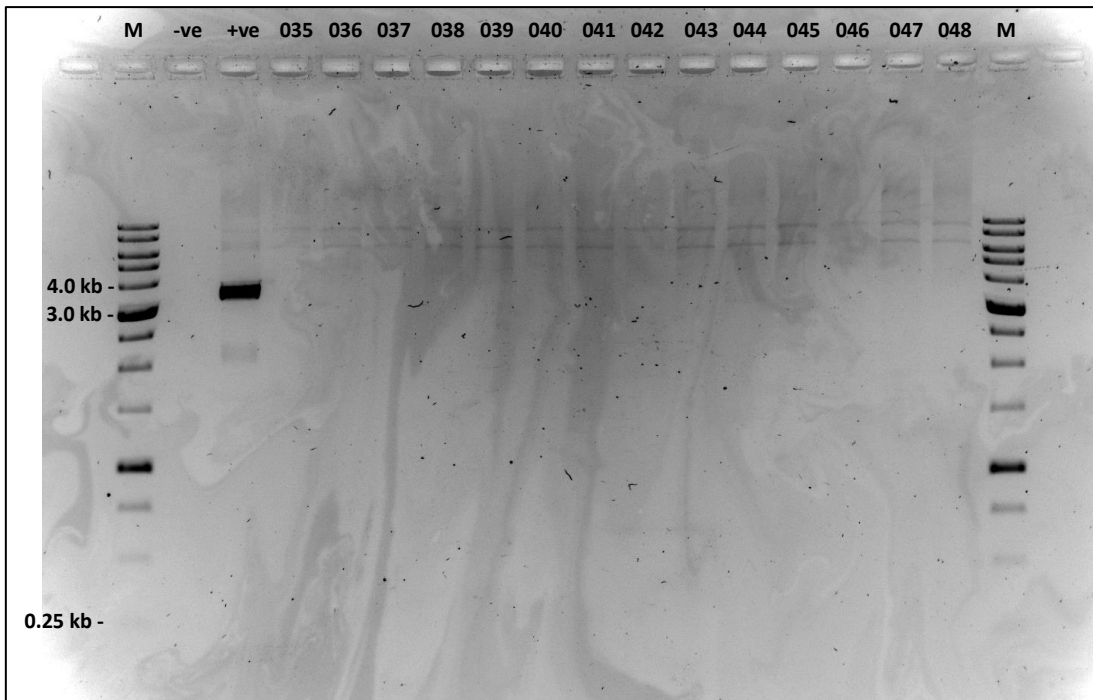
ภาพภาคผนวกที่ 4-2



ภาพภาคผนวกที่ 4-3



ภาพภาคผนวกที่ 4-4



ภาพภาคผนวกที่ 4-5



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายนิธิพัฒน์ ตันตริภักซ์ธรรม
วัน เดือน ปี เกิด	7 มกราคม 2535
สถานที่เกิด	จังหวัดตรัง
วุฒิการศึกษา	2563 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2557 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2552 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสภาราชนิ จังหวัดตรัง 2549 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพรศิริกุล จังหวัดตรัง
ผลงานตีพิมพ์	TTTCA repeat insertions in an intron of YEATS2 in benign adult familial myoclonic epilepsy type 4. Yeetong P, Pongpanich M, Srichomthong C, Assawapitaksakul A, Shotelersuk V, Tantirukdham N, Chunharas C, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Brain. 2019. 142(11): 3360-3366. Prevalence of JAK2V617F Mutation in 1,247 Thai Patients with Suspected Myeloproliferative Neoplasms. Bunyoo C, Wiryaukaradecha K, Sritana N, Udomchaiprasertkul W, Tantirukdham N, Tongsom J, Auewarakul C. J Med Assoc Thai 2018. 101(6): 157-164.