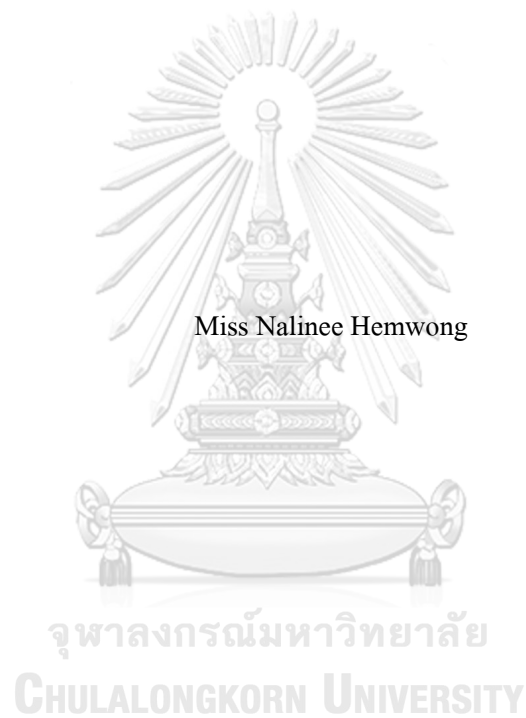


การศึกษาเพื่อประเมินความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ในผู้ป่วยโรค
ต่อมใต้สมองทำงานลดลงและโรคกระดูกพรุน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A STUDY TO DETERMINE PATHOGENICITY OF A MISSENSE P.R122W VARIANT IN
THE *LHX4* GENE IN A PATIENT WITH COMBINED PITUITARY HORMONE
DEFICIENCY AND OSTEOGENESIS IMPERFECTA



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

Common Course

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเพื่อประเมินความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน <i>LHX4</i> ในผู้ป่วยโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลงและโรคกระดูกเปราะ
โดย	น.ส. นลินี เหมวงศ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงกัญญา สุภปีติพร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
.....	
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงกัญญา สุภปีติพร)	กรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
.....	
(อาจารย์ แพทย์หญิงจุฬาลักษณ์ กุปตานนท์)	

นลินี เหมวงศ์ : การศึกษาเพื่อประเมินความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ในผู้ป่วยโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลงและโรคกระดูกเปราะ. (A STUDY TO DETERMINE PATHOGENICITY OF A MISSENSE P.R122W VARIANT IN THE *LHX4* GENE IN A PATIENT WITH COMBINED PITUITARY HORMONE DEFICIENCY AND OSTEOGENESIS IMPERFECTA) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร. พญ.กัญญา ศุภปีติพร

ผู้ป่วยเด็กชายไทยคนหนึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ (osteogenesis imperfecta; OI) และโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง (combined pituitary hormone deficiency; CPHD) ผลจากการตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมโดยวิธี whole exome sequencing (WES) พบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.G511C (c.1531G>T) ในยีน *COL1A2* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในพ่อและแม่ของผู้ป่วย (*de novo* mutation) อีกทั้งยังพบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W (c.364C>T) ในยีน *LHX4* ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรง ยีน *LHX4* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาต่อมใต้สมองและระบบประสาท อีกทั้งยังเคยมีการรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง และมีลักษณะการแสดงออกแบบ incomplete penetrance ผลจากการทำ WES เพียงอย่างเดียวอาจจะไม่เพียงพอที่จะสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวก่อให้เกิดโรคได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อประเมินการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W โดยทำการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *POU1F1*, *GHI* และ *TSHB* ในเซลล์ Chinese hamster ovary (CHO)-K1 และวัดระดับการแสดงออกด้วยเทคนิค luciferase reporter assay ผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับอาการของผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องโกรทฮอร์โมนและไทรอยด์ฮอร์โมน จึงสรุปได้ว่าการศึกษาทางห้องปฏิบัติการสนับสนุนว่าการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ก่อให้เกิดโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5974116630 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Combined pituitary hormone deficiency, *LHX4*, Incomplete penetrance,
Osteogenesis imperfecta, *COL1A2*

Nalinee Hemwong : A STUDY TO DETERMINE PATHOGENICITY OF A
MISSENSE P.R122W VARIANT IN THE *LHX4* GENE IN A PATIENT WITH
COMBINED PITUITARY HORMONE DEFICIENCY AND OSTEOGENESIS
IMPERFECTA. Advisor: Prof. VORASUK SHOTELERSUK, M.D. Co-advisor:
Prof. KANYA SUPHAPEETIPORN, M.D., Ph.D.

A Thai boy with features of osteogenesis imperfecta (OI) and combined pituitary hormone deficiency (CPHD) was identified. Whole exome sequencing (WES) identified that the child possessed a *de novo* novel heterozygous missense p.G511C (c.1531G>T) mutation in *COL1A2* leading to OI and a heterozygous missense p.R122W (c.364C>T) variant in *LHX4*. His healthy father harbors the same *LHX4* variant. *LHX4* is a LIM homeodomain transcription factor playing an important role in the development pituitary gland and the nervous system. It is a gene known to be associated with CPHD with incomplete penetrance. This study aimed to determine whether the p.R122W (c.364C>T) variant in *LHX4* is pathogenic. Using luciferase reporter assay, the p.R122W was found not able to activate *POU1F1*, *GHI* and *TSHB* promoters, indicating that the variant is pathogenic. This suggests that the mutation in *LHX4* is responsible for CPHD in the child.

Field of Study: Medical Sciences

Academic Year: 2018

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ศ.ดร.พญ.กัญญา ศุภปีดิพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้โอกาสและเป็นแรงบันดาลใจในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท รวมถึงการให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำที่ดีและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยการใช้ชีวิตในมหาวิทยาลัย และการดำเนินชีวิตประจำวัน

ขอขอบพระคุณ รศ.ทญ.ดร.พันจรรยา พรทวีทัศน์ สำหรับการประสานงานและคำปรึกษาในการขอความอนุเคราะห์เวกเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ

ขอขอบพระคุณ Dr.Marie Legendre สำหรับความอนุเคราะห์เวกเตอร์ pTracer-LHX4_WT-HA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.รุ่งนภา อธิธิวุฒิ, ดร.ชูพงศ์ อธิธิวุฒิ, อ.ดร.จุริรัตน์ โพธิ์แก้ว, ดร.สุนันทา โกศลศิริลักษณ์, น.ส.ศิริประภา ทองกอบเพชร, นายเฉลิมพล ศรีจอมทอง, น.ส.วันดี อุดมชัยประเสริฐกุล และ น.ส.ทิวรัตน์ สินธุวิวัฒน์ สำหรับความรู้และเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ รวมถึงคำแนะนำ คำปรึกษา กำลังใจ และการดูแลเอาใจใส่ที่ดีตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณ พญ.ปองหทัย บุญสิมมา และ นพ.วุทธิชาติ กมลวิศิษฐ์ สำหรับข้อมูลทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย รวมถึงคำแนะนำ คำปรึกษา และกำลังใจที่ดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านและผู้ประสานงานหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือที่ดีตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการศูนย์อนุพันธุศาสตร์เพื่อการวินิจฉัยโรค โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย สำหรับความช่วยเหลือและมิตรภาพที่ดีตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณผู้พี่และครอบครัวสำหรับข้อมูลและความร่วมมือที่ดีตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาจากบริษัทซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

ขอขอบพระคุณ น.สพ.นรินทร์ รมล้าควน, นายฉัตรพล มุงคุณดา และสมาชิกศูนย์วินิจฉัยโรคสัตว์บกที่ให้โอกาสศึกษาต่อในระดับปริญญาโท รวมถึงการสนับสนุนและกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และเพื่อนๆ ที่คอยเป็นแรงผลักดันและเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดที่ทำให้ทุกสิ่งทุกอย่างสำเร็จไปได้ด้วยดี

นลินี เหมวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	1
สารบัญรูปภาพ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	5
คำถามของการวิจัย.....	7
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	7
สมมติฐานของการวิจัย.....	7
ขอบเขตของการวิจัย	7
คำสำคัญ.....	7
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	9
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	10
ต่อมใต้สมอง (Pituitary gland)	10
การพัฒนาของต่อมใต้สมอง (Pituitary development)	10
โรค Combined pituitary hormone deficiency (CPHD).....	12
ยีน LIM homeobox 4 (<i>LHX4</i>).....	13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีน <i>LHX4</i> ที่สัมพันธ์กับโรค CPHD	15

โรค Osteogenesis imperfect (OI).....	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
รูปแบบการวิจัย.....	34
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	34
วิธีดำเนินการวิจัย	40
1. การตรวจสอบพลาสมิด <i>LHX4</i> ชนิด wild type	40
2. การสร้างพลาสมิด <i>LHX4</i> ชนิด mutant	42
3. การสร้างพลาสมิด luciferase reporter	45
4. การเลี้ยงเซลล์และการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยการทำให้ transfection.....	56
5. การตรวจวัดการแสดงออกของยีนและการตรวจวัดปริมาณ โปรตีนทั้งหมด.....	60
6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	63
บทที่ 4 ผลการวิจัย	64
1. ข้อมูลของผู้ป่วย	64
2. การตรวจสอบพลาสมิด <i>LHX4</i> ชนิด wild type	69
3. การสร้างพลาสมิด <i>LHX4</i> ชนิด mutant	70
4. การสร้างพลาสมิด luciferase reporter.....	71
5. การตรวจวัดการแสดงออกของยีนและการตรวจวัดปริมาณ โปรตีนทั้งหมด.....	77
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ	81
บรรณานุกรม	84
ภาคผนวก	88
ประวัติผู้เขียน	105

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD	13
ตารางที่ 2 ข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในยีน <i>LHX4</i>	27
ตารางที่ 3 ข้อมูลทางพันธุกรรมของผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในยีน <i>LHX4</i>	29
ตารางที่ 4 รายละเอียดยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค OI.....	32
ตารางที่ 5 การกลายพันธุ์ของยีนที่พบในคนไข้โรค OI ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	33
ตารางที่ 6 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย	35
ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ <i>LHX4</i> ชนิด mutant	43
ตารางที่ 8 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ <i>LHX4</i> ชนิด mutant	43
ตารางที่ 9 สารเคมีที่ใช้ในการทำ phosphorylation, ligation และ template removal	44
ตารางที่ 10 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน <i>GHI</i>	46
ตารางที่ 11 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน <i>GHI</i>	46
ตารางที่ 12 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน <i>POU1F1</i>	47
ตารางที่ 13 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน <i>POU1F1</i>	47
ตารางที่ 14 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน <i>TSHB</i>	48
ตารางที่ 15 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน <i>TSHB</i>	48
ตารางที่ 16 สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation เพื่อเชื่อมโปรโมเตอร์เข้ากับ pMiniT2.0 vector	49
ตารางที่ 17 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการ	51
ตารางที่ 18 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการ	51
ตารางที่ 19 สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	52
ตารางที่ 20 สารเคมีที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก pMiniT2.0 vector	53
ตารางที่ 21 สารเคมีที่ใช้ในการตัด pGL4.10[<i>luc2</i>] vector	53
ตารางที่ 22 สารเคมีที่ใช้ทำ ligation เพื่อเชื่อม <i>GHI</i> promoter กับ pGL4.10[<i>luc2</i>] vector	55

ตารางที่ 23 สารเคมีที่ใช้ทำ ligation เพื่อเชื่อม <i>POU1F1</i> promoter กับ pGL4.10 [<i>luc2</i>] vector	55
ตารางที่ 24 สารเคมีที่ใช้ทำ ligation เพื่อเชื่อม <i>TSHB</i> promoter กับ pGL4.10[<i>luc2</i>] vector	56
ตารางที่ 25 การเตรียม DNA complex ที่ใช้ในการทำ transfection	59
ตารางที่ 26 การเตรียม X-tremeGENE reagent ที่ใช้ในการทำ transfection.....	60
ตารางที่ 27 การเตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) Standard.....	62
ตารางที่ 28 ระดับฮอร์โมนของผู้ป่วย	67
ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับ transcription โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22.....	78
ตารางที่ 30 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ด้วย independent samples t-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22.....	79

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การพัฒนาของต่อมใต้สมอง (pituitary development).....	11
รูปที่ 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต่อมใต้สมอง	12
รูปที่ 3 ตำแหน่งของยีน <i>LHX4</i> บนโครโมโซมที่ 1	14
รูปที่ 4 พงสาวรีของครอบครัวผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในยีน <i>LHX4</i> ที่สัมพันธ์กับโรค CPHD จากการศึกษาของ Cohen และคณะในปี ค.ศ. 2017	27
รูปที่ 5 ความผิดปกติของยีน <i>LHX4</i> ที่พบในผู้ป่วย CPHD ที่ศึกษาการทำงานของยีนแล้ว.....	31
รูปที่ 6 โครงสร้างและรายละเอียดของ pMiniT2.0 vector	49
รูปที่ 7 โครงสร้างและรายละเอียดของ pGL4.10[luc2] vector	54
รูปที่ 8 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย.....	66
รูปที่ 9 ผล Sanger sequencing และพงสาวรี (pedigree) ของผู้ป่วยและครอบครัว.....	68
รูปที่ 10 ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W	69
รูปที่ 11 โครงสร้างและรายละเอียดของ pTracer- <i>LHX4</i> _WT-HA.....	70
รูปที่ 12 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด <i>LHX4</i> ชนิด mutant เปรียบเทียบกับพลาสมิด <i>LHX4</i> ชนิด wild type.....	71
รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบขนาดของโปรโมเตอร์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	72
รูปที่ 14 ผลการคัดเลือกโคลนที่เชื่อม pMiniT2.0 vector เข้ากับโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค PCR.....	73
รูปที่ 15 ผลการคัดเลือกโคลนที่เชื่อม pMiniT2.0 vector เข้ากับโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BglIII</i> และ <i>HindIII</i>	74
รูปที่ 16 ผลการคัดเลือกโคลนที่เชื่อม pGL4.10[luc2] vector เข้ากับโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BglIII</i> และ <i>HindIII</i>	75
รูปที่ 17 แบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิด pGL4.10[luc2]_GH1	76

รูปที่ 18 แบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิด pGL4.10[luc2]_POUIF1	76
รูปที่ 19 แบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิด pGL4.10[luc2]_TSHB	77
รูปที่ 20 transcription activity ของ LHX4 ต่อโปรโมเตอร์ที่สนใจ.....	80



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

คณะแพทย์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบผู้ป่วยไทยรายแรกที่เป็นโรคกระดูกเปราะกระดูกพันธุ์ชนิดที่ 3 (Osteogenesis imperfect type III, OI type III) และโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง (Combined pituitary hormone deficiency, CPHD) ในผู้ป่วยคนเดียวกันซึ่งมีโอกาพบได้น้อยมากและยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน โดย Genetic Home Reference (NIH) รายงานความชุกของโรค OI เท่ากับ 6-7 คนใน 100,000 คน ส่วนโรค CPHD ที่มีสาเหตุจากพันธุกรรมพบว่ามี ความชุกเท่ากับ 1 คนใน 8,000 คน

ผู้ป่วยเป็นเพศชาย คลอดตามกำหนดตอนอายุครรภ์ 37 สัปดาห์ มีภาวะเจริญเติบโตช้า ในครรภ์แบบไม่ได้สัดส่วน (asymmetrical intrauterine growth retardation, asymmetrical IUGR) น้ำหนักแรกเกิด 1,840 กรัม (น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 3) ความยาว 41 เซนติเมตร (น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 3) เส้นรอบศีรษะ (head circumference) ยาว 32 เซนติเมตร (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25-50) พบกระดูกต้นแขนข้างซ้ายหักตั้งแต่แรกเกิด กระดูกหน้าแข้ง (tibia) และกระดูกต้นขา (femur) โค้งงอมากกว่าปกติ ตาขาวมีสีฟ้าอ่อน และพบว่ามีภาวะ dentinogenesis imperfecta (DI) ร่วมด้วย ซึ่งลักษณะดังกล่าวมาเป็นลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค OI ชนิดที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยมีส่วนสูงที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนพบว่าผู้ป่วยมีระดับ free thyroxine (FT4), insulin-like growth factor 1 (IGF1), insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3) และ growth hormone (GH) หลังจากการกระตุ้นต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ในขณะที่ระดับ thyroid-stimulating hormone (TSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) และ cortisol อยู่ในเกณฑ์ปกติ ผลจากการทำ magnetic resonance imaging (MRI) พบว่าต่อมใต้สมองและก้านของต่อมใต้สมองมีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ (hypoplasia of pituitary gland and stalk) แพทย์วินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรค CPHD มีภาวะพร่องโกรทฮอร์โมนและไทรอยด์ฮอร์โมน

ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยถูกส่งไปสกัดดีเอ็นเอและนำไปทำ whole exome sequencing จากนั้นยืนยันผลด้วย Sanger sequencing เปรียบเทียบกับพ่อและแม่ของผู้ป่วยเพื่อตรวจหา

ความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะฟีโนไทป์ดังกล่าว ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.G511C (c.1531G>T) ในยีน *COL1A2* ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค OI โดยไม่พบความผิดปกตินี้ในพ่อและแม่ของผู้ป่วย (*de novo* mutation) และการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน (novel mutation) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W (c.364C>T) ในยีน *LHX4* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาต่อมไธมัสและระบบประสาท และเคยมีรายงานว่า เป็นสาเหตุของการเกิดโรค CPHD การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้พบในพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรงด้วย

จากข้อมูลข้างต้นเป็นข้อมูลที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง ประเด็นแรกคือผู้ป่วย 1 คน เป็นโรค 2 โรค ซึ่งหนึ่งในนั้นเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีโอกาสพบได้น้อยมาก อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานว่าผู้ป่วย 1 คน เป็นโรคทั้ง 2 โรคนี้มาก่อน ประเด็นที่สองคือความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ที่พบในยีน *LHX4* เป็นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) ซึ่งมีโซ่ข้าง (side chain) เป็นเบส (basic) เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) ซึ่งมีโซ่ข้าง (side chain) ชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobic) และเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน *LHX4* ประกอบกับการทำนายผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของซอฟต์แวร์ Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT), Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) และ Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity (M-CAP) พบว่าให้ผลเป็นไปในทางเดียวกันคือการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้อาจส่งผลกระทบที่ก่อให้เกิดโรคได้ ประเด็นที่สามคือความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ที่พบในยีน *LHX4* สมมติฐานว่ามีลักษณะเป็น incomplete penetrance และน่าจะส่งผลให้เกิดโรค CPHD ซึ่งเคยมีการรายงานเกี่ยวกับลักษณะ incomplete penetrance ในยีน *LHX4* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CPHD ประเด็นสุดท้ายคือความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ที่พบในยีน *LHX4* นี้ยังไม่เคยมีการศึกษาและการรายงานที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมามาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อประเมินความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ซึ่งจะเป็นหลักฐานสำคัญที่จะสนับสนุนผลจากการทำ whole exome sequencing ว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวก่อให้เกิดโรค CPHD หรือโรคต่อมไธมัสทำงานลดลง

คำถามของการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ส่งผลให้การทำงานของโปรตีน *LHX4* ผิดปกติไปหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินระดับการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ซึ่งจะเป็นหลักฐานสำคัญว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง

สมมติฐานของการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ทำให้โปรตีน *LHX4* ทำงานผิดปกติไปแล้ว ส่งผลให้การพัฒนาของต่อมใต้สมองในระยะเริ่มต้นมีความผิดปกติและเกิดโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง

ขอบเขตของการวิจัย

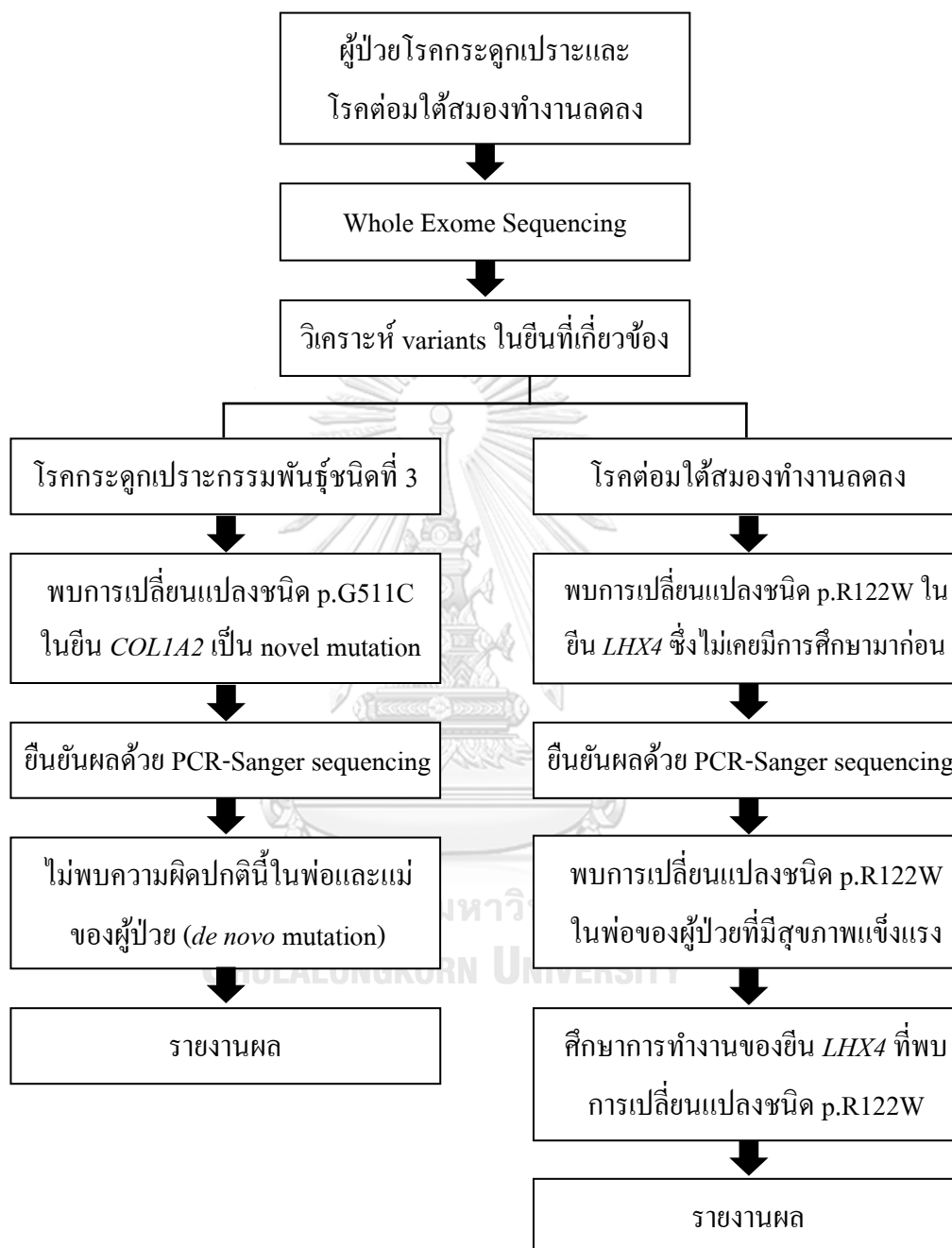
ศึกษา transcription activity ของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ต่อ target promoters ด้วยเทคนิค luciferase reporter assay โดยใช้เซลล์ Chinese hamster ovary (CHO)-K1 (ATCC® CCL-61™)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำสำคัญ

combined pituitary hormone deficiency, *LHX4*, incomplete penetrance, osteogenesis imperfecta, *COL1A2*

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. สามารถประเมินระดับการทำงานของโปรตีน LHX4 ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ได้
2. ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยอาจทำให้ทราบปัจจัยทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดโรคต่อมไธสมองทำงานลดลง ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคต่อมไธสมองทำงานลดลงให้เร็วและดียิ่งขึ้น
3. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปใช้ในการให้คำปรึกษาด้านการวางแผนครอบครัวสำหรับการมีบุตรคนต่อไปของครอบครัวผู้ป่วยได้
4. ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนายาหรือวิธีการรักษาโรคต่อมไธสมองทำงานลดลงได้ในอนาคต



บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ต่อมใต้สมอง (Pituitary gland)

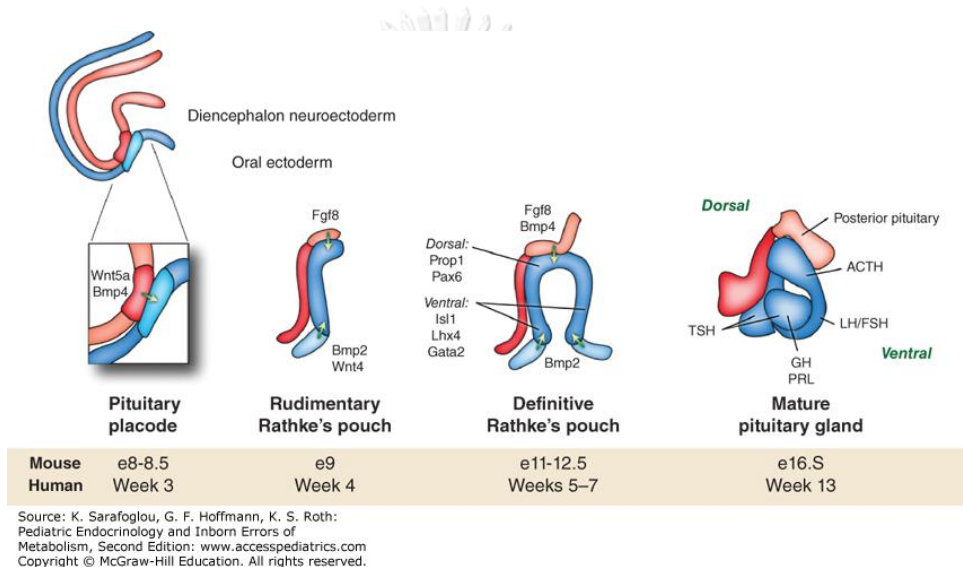
ต่อมใต้สมองเป็นต่อมไร้ท่อที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการเจริญเติบโต (growth) กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) การสืบพันธุ์ (reproduction) และการรักษาสมดุลของร่างกาย (homeostasis)⁽¹⁾ ต่อมใต้สมองตั้งอยู่ในแอ่ง sella turcica ของกระดูกสฟีนอยด์ (sphenoid) อยู่ติดกับส่วนล่างของสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) โดยมีอินฟันดิบูลัม (infundibulum) เป็นจุดเชื่อมต่อระหว่างต่อมใต้สมองและสมองส่วนไฮโปทาลามัส ต่อมใต้สมองแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ประกอบด้วยเซลล์ทั้งหมด 5 ชนิด โดยแบ่งตามชนิดของฮอร์โมนที่ผลิต ได้แก่ somatotrophs ผลิต growth hormone (GH), thyrotrophs ผลิต thyrotrophin หรือ thyroid-stimulating hormone (TSH), lactotrophs ผลิต prolactin (PRL), gonadotrophs ผลิต follicle-stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) และ corticotrophs ผลิต corticotrophin หรือ adrenocorticotrophic hormone (ACTH)
2. ต่อมใต้สมองส่วนกลาง (interior pituitary gland) ประกอบด้วยเซลล์ melanotrophs ผลิต pro-opiomelanocortin (POMC) ซึ่งเป็นโมเลกุลตั้งต้นของ melanocyte-stimulating hormone (MSH) และ endorphin
3. ต่อมใต้สมองส่วนหลัง (posterior pituitary gland) ประกอบด้วยปลายแอกซอน (axon) ของนิวโรซีครีทอรีเซลล์ (neurosecretory cell) ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทที่ผลิตฮอร์โมน arginine vasopressin (AVP) และ oxytocin โดยที่ตัวเซลล์อยู่ในไฮโปทาลามัส ดังนั้นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนหลังคือฮอร์โมนที่สร้างจากเซลล์ประสาท⁽¹⁻³⁾

การพัฒนาของต่อมใต้สมอง (Pituitary development)

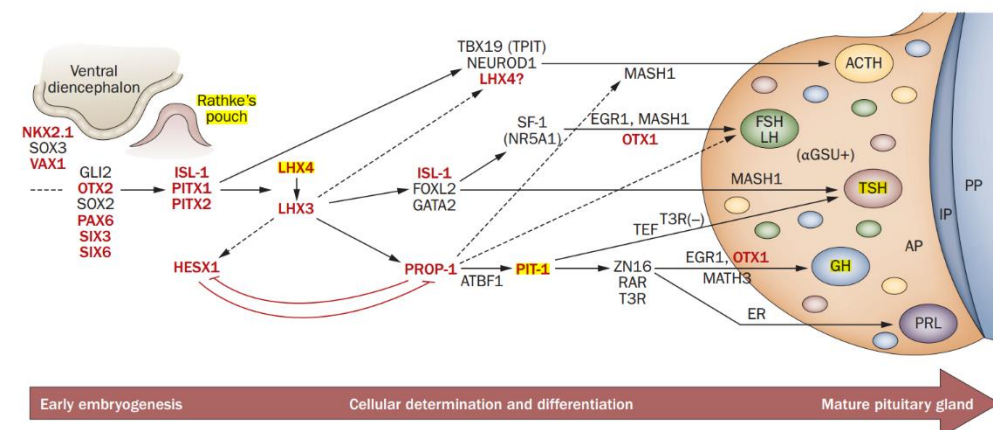
ต่อมใต้สมองส่วนหน้าและต่อมใต้สมองส่วนกลางเจริญมาจากเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน คือ oral ectoderm ในขณะที่ต่อมใต้สมองส่วนหลังเจริญมาจาก neural ectoderm การศึกษาการเจริญและการพัฒนาของต่อมใต้สมองถูกศึกษาในหนู โดยหนูจะเริ่มมีสัญญาณของการพัฒนาต่อมใต้สมองในช่วงที่เอ็มบริโอ (embryonic) มีอายุประมาณ 7.5 วัน (embryonic day 7.5, E7.5)

และเมื่อเอ็มบริโอมีอายุประมาณ 9 วัน (E9) จะเริ่มสร้าง Rathke's pouch ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นต่อมใต้สมองส่วนหน้าและต่อมใต้สมองส่วนกลาง ในขณะที่ไดเอนเซفالอน (diencephalon) ซึ่งอยู่ด้านบน Rathke's pouch จะมีการพัฒนาและทำให้เกิดต่อมใต้สมองส่วนหลัง การสร้าง Rathke's pouch จะสำเร็จเมื่อเอ็มบริโอมีอายุประมาณ 10.5 วัน (E10.5) และจะถูกแยกออกจาก oral ectoderm อย่างสมบูรณ์เมื่ออายุประมาณ 12.5 วัน (E12.5) จากนั้นช่วงอายุระหว่าง 12.5-15.5 วัน (E12.5-E15.5) ต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะสร้างเซลล์ทั้งหมด 5 ชนิด โดยเริ่มจาก thyrotrophs, corticotrophs, somatotrophs, gonadotrophs และ lactotrophs รายละเอียดดังรูปที่ 1^(1, 2)



รูปที่ 1 การพัฒนาของต่อมใต้สมอง (pituitary development)

นอกจากการพัฒนาของต่อมใต้สมองจะเกิดขึ้นตามลำดับเวลาแล้วยังเกิดขึ้นตามการแสดงออกของ signalling molecules และ transcription factors ด้วย โดย signalling molecules สองชนิดแรกคือ *BMP4* และ *FGF8* โดย *FGF8* จะไปกระตุ้นการทำงานของ *LHX3* และ *LHX4* ซึ่งเป็น transcription factors ที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนา Rathke's pouch ในระยะเริ่มต้นไปสู่ Rathke's pouch ที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังมี signalling molecules และ transcription factors อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต่อมใต้สมองรายละเอียดดังรูปที่ 2^(1, 3, 4)



รูปที่ 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของต่อมใต้สมอง

ความผิดปกติของการพัฒนาของต่อมใต้สมองจะส่งผลกระทบต่อการพัฒนาส่วนต่างๆ ของร่างกาย อีกทั้งยังส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ รวมถึงภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิด (congenital hypopituitarism; CH) ซึ่งจะทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรค isolated growth hormone deficiency (IGHD), septo-optic dysplasia (SOD) และ combined pituitary hormone deficiency (CPHD) เป็นต้น^(1, 3) ในที่นี้ขอกล่าวถึงเฉพาะโรค CPHD

โรค Combined pituitary hormone deficiency (CPHD)

โรค CPHD เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า panhypopituitarism หรือบางตำราอาจจะใช้ชื่อว่า multiple pituitary hormone deficiency (MPHD)^(4, 5) โรค CPHD เป็นโรคที่เกิดจากการพร่องของ GH ร่วมกับฮอร์โมนชนิดอื่นที่ผลิตจากต่อมใต้สมองอย่างน้อยหนึ่งชนิด⁽³⁻⁷⁾ ผู้ป่วยจะมีการเจริญเติบโตช้าและมีส่วนสูงที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน มักจะพบได้ตั้งแต่วัยเด็กซึ่งเป็นอาการเริ่มต้นที่นำไปสู่โรค CPHD การวินิจฉัยโรคมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การตรวจวัดระดับฮอร์โมน การทำ MRI ที่สมองเพื่อดูความผิดปกติของต่อมใต้สมอง รวมถึงการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรม โรค CPHD อาจมีสาเหตุมาจากพันธุกรรมหรือสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่พันธุกรรม เช่น การบาดเจ็บ การผ่าตัดต่อมสมองเนื้องอก การติดเชื้อ การได้รับพิษจากโลหะหนักเรื้อรัง การฉายรังสี และโรคแพ้ภูมิตัวเอง⁽⁵⁾ พบว่าประมาณร้อยละ 80 เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม^(6, 7) โดยมีความชุกเท่ากับ 1 คนใน 8,000 คน ยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD มีประมาณ 30 ยีน ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดประมาณ 2,500 ชนิด⁽⁵⁾ ยีนที่พบว่ามีการรายงานบ่อยได้แก่ *POU1F1*, *PROPI*, *LHX3*, *LHX4*, *HESX1*, *OTX2*, *GLI2*, *SOX2* และ *SOX3* ซึ่งเป็น transcription factor ที่มีบทบาทสำคัญต่อ

การพัฒนาต่อมาได้สมองและระบบประสาท ลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรค CPHD มีทั้งการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR) และ X-Linked (XL) รายละเอียดดังตารางที่ 1⁽⁵⁻⁷⁾ ในส่วนของการรักษาโรค CPHD จะใช้วิธีการให้ฮอร์โมนทดแทน (hormone replacement therapy)⁽³⁾

ตารางที่ 1 ลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD

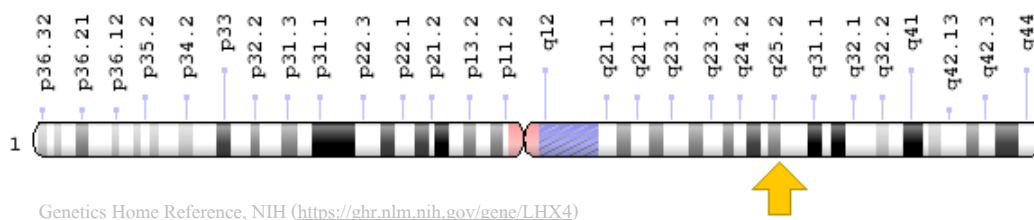
Gene	Inheritance	Mutation type
<i>POU1F1</i>	AD, AR	missense, nonsense, frameshift, splicing
<i>PROP1</i>	AR	missense, nonsense, frameshift, splicing
<i>LHX3</i>	AR	missense, nonsense, frameshift, splicing
<i>LHX4</i>	AD, AR	missense, nonsense, frameshift, deletion, splicing
<i>HESX1</i>	AD, AR	missense
<i>OTX2</i>	AD	missense, nonsense
<i>GLI2</i>	AD	frameshift, missense
<i>SOX2</i>	AD	missense, deletion
<i>SOX3</i>	XL	variation poly-A length duplication/deletion

ยีน LIM homeobox 4 (*LHX4*)

ยีน LIM Homeobox 4 หรือ *LHX4* จัดอยู่ในกลุ่ม LIM-homeodomain (LIM-HD) มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาต่อมใต้สมองและระบบประสาท ตั้งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่ง 25.2 (1q25.2) ดังรูปที่ 3 จีโนมมีขนาดใหญ่กว่า 45 kb ประกอบด้วย 6 exons^(8,9) โปรตีนมีขนาด 390 amino acids พบได้ในนิวเคลียส ทำหน้าที่เป็น transcription factor หรือ cofactor ประกอบด้วยโดเมน 3 โดเมน คือ

1. LIM1 domain อยู่บริเวณตำแหน่งที่ 30-81 ทำหน้าที่เป็น zinc binding site [ion binding site]
2. LIM2 domain อยู่บริเวณตำแหน่งที่ 89-144 ทำหน้าที่เป็น zinc binding site [ion binding site] และ Isl binding site (protein-protein interaction)
3. Homeodomain (HD) จัดเป็น DNA binding domain อยู่บริเวณตำแหน่งที่ 160-213

บริเวณ LIM1 และ LIM2 domain จะเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) เยอะซึ่งจะไปสร้างพันธะกับ zinc atoms อีกทั้งยังเป็นบริเวณอนุรักษ์อีกด้วย (ข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information; NCBI)



Genetics Home Reference, NIH (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/LHX4>)

รูปที่ 3 ตำแหน่งของยีน *LHX4* บนโครโมโซมที่ 1

การศึกษาในหนูพบการแสดงออกของยีน *LHX4* ในการพัฒนาสมองส่วนหลัง (hindbrain) เซรีบรัลคอร์เทกซ์ (cerebral cortex) ต่อมใต้สมอง (pituitary gland) และไขสันหลัง (spinal cord) โปรตีน *LHX4* มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับโปรตีน *LHX3* โปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทหน้าที่ทับซ้อนกันแต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดยในช่วงที่เอ็มบริโอมีอายุประมาณ 9.5 วัน (E9.5) โปรตีน *LHX3* และ *LHX4* จะมีการแสดงออกตลอดในช่วงของการพัฒนา Rathke's pouch แต่ในช่วงที่เอ็มบริโอมีอายุประมาณ 12.5 วัน (E12.5) การแสดงออกของโปรตีน *LHX4* จะถูกจำกัดไว้สำหรับการพัฒนาต่อมใต้สมองส่วนหน้าในอนาคต ในขณะที่โปรตีน *LHX3* ยังคงมีการแสดงออกตลอด และในช่วงที่เอ็มบริโอมีอายุประมาณ 12.5 วัน (E12.5) การแสดงออกของโปรตีน *LHX4* จะลดลง ในขณะที่โปรตีน *LHX3* ยังคงมีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในต่อมใต้สมองที่มีการพัฒนาสมบูรณ์แล้วจะพบการแสดงออกของโปรตีน *LHX3* มากกว่าโปรตีน *LHX4*⁽¹⁰⁾ การศึกษาการทำงานของยีน *LHX3* และ *LHX4* ในหนู พบว่าหนูที่มีจีโนไทป์แบบ *LHX4*^{-/-} จะมีการพัฒนาของ Rathke's pouch ที่สมบูรณ์ แต่ต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะมีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์โดยจะมีจำนวนเซลล์ลดลง ในขณะที่หนูที่มีจีโนไทป์แบบ *LHX3*^{-/-} ต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะมีเซลล์ครบทั้ง 5 ชนิด ส่วนหนูที่มีจีโนไทป์แบบ *LHX4*^{-/-} และ *LHX3*^{-/-} จะสามารถพัฒนา Rathke's pouch ได้เฉพาะในระยะเริ่มต้นเท่านั้นและจะไม่สามารถพัฒนาต่อได้ ในขณะที่หนูที่มีจีโนไทป์แบบ *LHX4*^{+/-} หรือ *LHX3*^{+/-} จะสามารถพัฒนา Rathke's pouch จนเป็น Rathke's pouch ที่สมบูรณ์ได้ จากการศึกษานี้พวกเขาได้ให้ระดับความรุนแรงของจีโนไทป์ของหนูดังนี้ *LHX3*^{-/-} *LHX4*^{-/-} > *LHX3*^{-/-} *LHX4*^{+/-} > *LHX3*^{-/-} *LHX4*^{+/+} > *LHX3*^{+/-} *LHX4*^{-/-} > *LHX3*^{+/-} *LHX4*^{+/-} > *LHX3*^{+/-} *LHX4*^{+/+}

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน *LHX4* และ *LHX3* มีหน้าที่ทับซ้อนกันแต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกัน และการมีอัลลีลที่ปกติเพียงอัลลีลเดียวเพียงพอต่อการพัฒนาของ Rathke's pouch จนเป็น Rathke's pouch ที่สมบูรณ์ได้⁽¹⁰⁾

นอกจากนี้ยีน *LHX4* ยังสามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *POU1F1*, *GHI*, *PRL*, *alpha-GSU*, *FSHB* และ *TSHB* ได้อีกด้วย ซึ่งยีน *POU1F1* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์ thyrotroph, lactotroph และ somatotroph เพื่อไปทำหน้าที่ในการผลิต TSH, PRL และ GH ตามลำดับ^(1-5, 11, 12) ความผิดปกติที่พบในยีน *LHX4* ที่มีความสัมพันธ์กับโรค CPHD จะมีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal dominant และ autosomal recessive ผู้ป่วยจะมีส่วนสูงที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานและมีภาวะพร่อง GH, PRL, TSH, LH, FSH และ/หรือ ACTH นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของต่อมใต้สมองด้วย เช่น ต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ เซลลาเทอร์ซิกา (sella turcica) มีขนาดเล็กกว่าปกติ หรือมีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ พบรอยโรคชีเอม (chiari malformation; CM) หรืออาจพบซิสต์ที่ต่อมใต้สมอง^(1, 5-7)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีน *LHX4* ที่สัมพันธ์กับโรค CPHD

ปี ค.ศ. 2001 Machinis และคณะพบผู้ป่วยครอบครัวแรกที่ป่วยเป็นโรค CPHD และมีความผิดปกติในยีน *LHX4* โดยผู้ป่วยเป็นพี่น้องเพศชายและหญิงสองคนที่เกิดจากพ่อและแม่ที่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยทั้งสองคนมีภาวะพร่อง GH, TSH และ ATCH ผลจากการทำ MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ เซลลาเทอร์ซิกามีขนาดเล็กกว่าปกติ และพบรอยโรคชีเอม เมื่อตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมพบความผิดปกติในยีน *LHX4* ชนิด c.607-1G>C ใน intron 4 บริเวณ splice sites ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่และตาของพวกเขา โดยแม่ของพวกเขาสูง 148 เซนติเมตร ผล MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์และเซลลาเทอร์ซิกามีขนาดเล็ก ส่วนตาของพวกเขาสูง 150 เซนติเมตร ผล MRI พบว่าเซลลาเทอร์ซิกามีขนาดเล็กเช่นกัน การศึกษาแบบ *in vitro* expression พบว่าความผิดปกติในยีน *LHX4* ชนิด c.607-1G>C ทำให้ขบวนการ splicing ของ RNA และการสังเคราะห์โปรตีนมีความผิดปกติโดยบางส่วนของโปรตีนเกิดการขาดหายไป ส่งผลให้เกิดโรค CPHD⁽⁸⁾

ปี ค.ศ.2007 Tajima และคณะรายงานการพบผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นเพศหญิงคนหนึ่งที่เป็นโรค CPHD ซึ่งเกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยมีความผิดปกติในยีน *LHX4* แบบ heterozygous missense mutation โดยพบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.P366T (ถ้าใช้ฐานข้อมูลใหม่จะเป็น p.P389T) ใน exon 6 การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 366 เปลี่ยนจากโพรลีน (proline) เป็นทรีโอนีน (threonine) ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ในพ่อและแม่ของผู้ป่วย (*de novo* mutation) ผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH, PRL, TSH, LH, FSH และ ACTH นอกจากนี้ผล MRI ยังพบการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ เซลลาเทอร์ซิกามีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ และพบรอยโรคซีเอ็มอีกด้วย⁽¹³⁾

ปี ค.ศ.2008 Pfaffle และคณะได้รายงานผลการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 253 คน จาก 245 ครอบครัวที่มีภาวะพร่องของ GH และฮอร์โมนชนิดอื่นที่ผลิตจากต่อมใต้สมองอย่างน้อยหนึ่งชนิด จากการศึกษาทำให้พบความผิดปกติในยีน *LHX4* แบบ heterozygous missense mutation ชนิดใหม่ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ p.R84C, p.L190R และ p.A210P ในผู้ป่วยที่ไม่มีความสัมพันธ์กันสามครอบครัว คือ

1. ครอบครัวที่ 1 เป็นครอบครัวชาวสวิส (Swiss) ผู้ป่วยเป็นพี่น้องเพศหญิงสองคนที่เกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยคนที่หนึ่งเป็นพี่สาวมีภาวะพร่อง GH, TSH, LH, FSH และ ACTH ส่วนผู้ป่วยคนที่สองเป็นน้องสาวมีภาวะพร่อง GH และ TSH ผลจากการทำ MRI ของทั้งสองคนพบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์และพบซีสต์ที่ต่อมใต้สมอง ในขณะที่พ่อของผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH เมื่อตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมพบความผิดปกติในยีน *LHX4* ชนิด p.A210P (c.628G>C) ทั้งสามคน การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดบริเวณ homeodomain ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 628 โดยเปลี่ยนจากกวานีน (guanine) เป็นไซโตซีน (cytosine) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 210 เปลี่ยนจากอะลานีน (alanine) เป็นโพรลีน (proline)
2. ครอบครัวที่ 2 เป็นชาวมาซิโดเนีย (Macedonian) ผู้ป่วยเป็นเพศชายที่เกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH, TSH, LH และ FSH ผล MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีขนาดเล็กและต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ เมื่อตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมพบว่ายีน *LHX4* มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R84C (c.250C>T) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่าง LIM1 และ LIM2 domain การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 250 โดยเปลี่ยนจากไซโตซีน (cytosine) เป็นไทมีน

(thymine) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 84 เปลี่ยนจากอาร์จินีน (arginine) เป็นซิสเทอีน (cysteine) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ในพ่อและแม่ของผู้ป่วย (*de novo* mutation)

3. ครอบครัวที่ 3 ผู้ป่วยเป็นเพศหญิงที่เกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ พบภาวะพร่อง GH, TSH และ ACTH ในผู้ป่วย ผล MRI แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยมีขนาดของต่อมใต้สมองส่วนหน้าเล็กกว่าปกติและต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.L190R (c.569T>G) บริเวณ homeodomain ของยีน *LHX4* โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 190 เปลี่ยนจากลูซีน (leucine) เป็นอาร์จินีน (arginine) ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 569 จากเบสไทมีน (thymine) เปลี่ยนเป็นเบสกวานีน (guanine) ไม่พบข้อมูลทางพันธุกรรมของพ่อและแม่ผู้ป่วย

จากข้อมูลเบื้องต้น Pfaffle และคณะได้ศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 ชนิด โดยทำการทดสอบ transcription activity ของยีน *LHX4* ต่อโปรโมเตอร์ของยีน *alpha-GSU*, *TSHB* และ *PIT1 (POU1F1)* ซึ่งเป็น downstream gene ของยีน *LHX4* ทำการศึกษาในเซลล์สองชนิด คือ mouse pituitary GHFT1 cells และ human embryonic kidney 293 T cells (HEK293T cells) ผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R84C สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้น้อยลง ส่วนการเปลี่ยนแปลงชนิด p.L190R และ p.A210P ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ จากการศึกษานี้พวกเขาได้ตั้งข้อสังเกตว่าผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีน *LHX4* ทั้งหมดจะมีการเจริญของต่อมใต้สมองที่ผิดปกติและมีภาวะพร่องฮอร์โมนโดยผู้ป่วยทั้งหมดของพวกเขาไม่พบรอยโรคซีเอ็มซึ่งแตกต่างจากการรายงานก่อนหน้านี้ ข้อมูลจากการศึกษานี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาต่อมใต้สมองและโรคต่อมใต้สมอง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคและการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปว่าการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 ชนิดที่พบในยีน *LHX4* คือ p.R84C, p.L190R และ p.A210P ทำให้ยีน *LHX4* ทำงานผิดปกติส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของต่อมใต้สมองและทำให้เกิดโรค CPHD ในที่สุด⁽¹⁴⁾

ในปีเดียวกันนี้ Castinetti และคณะได้รายงานผลการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 136 คน จาก 133 ครอบครัวที่มีภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิด (congenital hypopituitarism; CH) และมีความผิดปกติที่โครงสร้างสมอง ก้านของต่อมใต้สมอง (pituitary stalk) หรือต่อมใต้สมองส่วนหลัง ผลการศึกษาพบความผิดปกติในยีน *LHX4* ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่

การเปลี่ยนแปลงชนิด p.T99fs (p.T99fs53*), p.T90M และ p.G370S จากนั้นได้ทำการศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีความผิดปกตินี้ใน human heterologous HeLa cells โดยทำการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *PRL*, *GH* และ *POU1F1* ผลการศึกษาพบว่า p.T90M และ p.G370S เป็นเพียง polymorphisms ส่วน p.T99fs53* เป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ของยีน *LHX4* ที่สัมพันธ์กับภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิด โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้พบในผู้ป่วยทารกเพศชาย น้องชาย และพ่อของผู้ป่วย พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผลการตรวจวัดระดับฮอร์โมนพบว่าผู้ป่วยและน้องชายมีภาวะพร่อง GH และ TSH ส่วนพ่อของผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH, LH และ FSH ผลจากการทำ MRI พบว่าผู้ป่วยมีเซลล์าเทอร์ซิกาที่พัฒนาไม่สมบูรณ์ ต่อมใต้สมองมีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ก้านของต่อมใต้สมองบาง ไม่พบต่อมใต้สมองส่วนหลัง และพบความผิดปกติคอร์ปัสแคลโลซัม (corpus callosum) ซึ่งเป็นตัวเชื่อมระหว่างเซรีบรัมซีกซ้ายและซีกขวา ผล MRI ของน้องชายผู้ป่วยแสดงให้เห็นถึงการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมใต้สมองและเซลล์าเทอร์ซิกา ส่วนผล MRI ของพ่อผู้ป่วยพบเพียงความผิดปกติของการเจริญของต่อมใต้สมอง การเปลี่ยนแปลงชนิด p.T99fs53* (c.293_294 InsC) เป็น heterozygous frameshift mutation ที่เกิดขึ้นบริเวณ LIM2 domain ของยีน *LHX4* โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสโดยมีการเพิ่มเข้ามาของเบสไซโทซีน (cytosine) ระหว่างตำแหน่งที่ 293 และ 294 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนเฟรม (frameshift) เริ่มที่ตำแหน่งที่ 99 และเกิดตำแหน่งหยุดก่อนกำหนด (premature stop codon) โดยกรดอะมิโนจะหายไป 53 ตัว ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดสั้นกว่าปกติ ส่งผลให้โปรตีนทำงานผิดปกติและทำให้เกิดโรค จากการศึกษาครั้งนี้และการรายงานก่อนหน้านี้ Castinetti และคณะพบว่าผู้ป่วยทุกรายที่มีอายุน้อยและมีความผิดปกติของยีน *LHX4* จะพบการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ของเซลล์าเทอร์ซิกา ส่วนการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมใต้สมองถูกพบเพียงบางรายเท่านั้น ผลจากการศึกษาครั้งนี้ช่วยยืนยันว่าการเกิดโรค CPHD ที่สัมพันธ์กับยีน *LHX4* จะมีลักษณะการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant การศึกษาครั้งนี้พบความผิดปกติในยีน *LHX4* น้อยกว่าร้อยละ 1 ในกลุ่มผู้ป่วย 136 คน และพบการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่หนึ่งชนิด คือ p.T99fs53* ในยีน *LHX4* ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD⁽¹⁵⁾

ปี ค.ศ.2010 Tajima และคณะได้รายงานความผิดปกติในยีน *LHX4* ชนิดใหม่ในผู้ป่วยเพศชายชาวญี่ปุ่นคนหนึ่งที่เป็นโรค CPHD ที่เกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH, TSH, LH, FSH และ ACTH ผล MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีขนาดเล็ก ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในบริเวณที่ผิดปกติ และพบรอยโรคซีเอ็ม เมื่อตรวจสอบ

ความผิดปกติทางพันธุกรรมพบความผิดปกติในยีน *LHX4* แบบ heterozygous missense mutation ชนิด p.V101A (c.302T>C) ใน exon 3 ซึ่งอยู่บน LIM2 domain การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 302 จากเบสไทมีน (thymine) เปลี่ยนเป็นเบสไซโตซีน (cytosine) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 101 จากวาลีน (valine) เป็นอะลานีน (alanine) จากนั้นได้ศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีความผิดปกตินี้ใน HEK293 cells โดยทำการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* และ *FSHB* ซึ่งผลการศึกษพบว่ายีน *LHX4* ที่มีความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.V101A ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ Tajima และคณะได้ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับผู้ป่วย CPHD ที่มีความผิดปกติของยีน *LHX4* ทั้งหมด พวกเขาพบว่ามีผู้ป่วยทั้งหมด 12 คน แบ่งออกเป็นแบบ familial cases จำนวน 9 คน (3 ครอบครัว) และแบบ sporadic cases จำนวน 3 คน โดยผู้ป่วยจำนวน 9 คนมีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมใต้สมองส่วนหน้าหรือต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีขนาดเล็ก ซึ่งมีลักษณะเหมือนผู้ป่วยของพวกเขา นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยจำนวน 5 คนมีการพัฒนาของเซลล์เทอร์ซิคาที่ไม่สมบูรณ์ ในขณะที่เดียวกันมีผู้ป่วยจำนวน 5 คนที่มีการพัฒนาของเซลล์เทอร์ซิคาปกติ ส่วนผู้ป่วยอีก 2 คนไม่พบข้อมูลการทำ MRI จากการศึกษาครั้งนี้สรุปว่าความผิดปกติของยีน *LHX4* ชนิด p.V101A เป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดโรค CPHD และความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับ clinical phenotypes และการทำงานของยีน *LHX4* ระหว่างการพัฒนาของต่อมใต้สมอง⁽¹⁶⁾

ในปีเดียวกันนี้ Dateki และคณะได้ทำการศึกษากลุ่มผู้ป่วย CPHD ชาวญี่ปุ่นจำนวน 71 คน แบ่งเป็นเพศชาย 39 คน และเพศหญิง 32 คน โดยทำการทดสอบทางพันธุกรรมเพื่อหาความผิดปกติในยีนที่สัมพันธ์กับโรค CPHD ได้แก่ *POUIF1*, *PROPI*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4* และ *SOX3* ผลการศึกษาพบความผิดปกติบริเวณยีน *LHX4* แบบ heterozygous microdeletion ขนาด 522,009 bp ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ อีกทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ในพ่อและแม่ของผู้ป่วย (*de novo* mutation) ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ นอกจากความผิดปกตินี้จะส่งผลกระทบต่อยีน *LHX4* แล้วยังพบว่าความผิดปกตินี้ส่งผลกระทบต่อยีน *CEP350*, *QSOX1* และ *ACBD6* อีกด้วย ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมดังกล่าวมีภาวะพร่อง GH, TSH, PRL, LH และ FSH ผลจากการทำ MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในบริเวณที่ผิดปกติ และเซลล์เทอร์ซิคาที่มีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกที่เหมือนกับผู้ป่วยที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ นอกจากความผิดปกติของยีนดังกล่าวแล้วการศึกษานี้

ยังพบการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ทั้งหมด 5 ชนิด ใน 3 ยีน ได้แก่ p.T63M และ p.A322T ในยีน *LHX3*, p.V201I และ p.H387P ในยีน *LHX4* และ p.V53L ในยีน *SOX3* พวกเขาได้ทำการศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.V201I และ p.H387P ใน COS1 cells โดยทำการทดสอบกับ โปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* ผลจากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ *POUIF1* ได้ตามปกติ โดยพวกเขาอธิบายว่าผลการศึกษาอาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรโมเตอร์และชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา กล่าวโดยสรุป Dateki และคณะพบความผิดปกติของยีน *LHX4* ชนิดใหม่ คือ *de novo* heterozygous microdeletion ขนาด 522,009 bp ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD ในผู้ป่วยซึ่งมีลักษณะทางคลินิกที่เหมือนกับผู้ป่วยที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้⁽¹⁷⁾

ปี ค.ศ.2012 Filges และคณะรายงานการพบผู้ป่วยทารกเพศหญิงรายหนึ่งที่มีผู้ป่วยเป็นโรค panhypopituitarism (CPHD) ร่วมกับภาวะหัวใจล้มเหลว ผู้ป่วยเกิดจากพ่อแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผลจากการตรวจวัดระดับฮอร์โมนพบว่าผู้ป่วยพร่องฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองทั้งหมด ผล MRI พบความผิดปกติของต่อมใต้สมองโดยเกิดการหายไปของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและอินฟันดิบูลัม (infundibulum) นอกจากนี้ยังพบว่าต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในบริเวณที่ผิดปกติ และมีการพัฒนาของเซลล์ลาเทอร์ชิกาที่ไม่สมบูรณ์ เมื่อตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค array CGH พบความผิดปกติบนโครโมโซมที่ตำแหน่ง 1q25 แบบ microdeletion ขนาด 1.5 megabases ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่ที่มีสุขภาพแข็งแรง ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบนี้ส่งผลกระทบต่อยีนอย่างน้อย 13 ยีนซึ่งรวมถึงยีน *LHX4* ด้วยการรายงานนี้เป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่ยืนยันเกี่ยวกับทฤษฎี haploinsufficiency และ variable penetrance ของยีน *LHX4*⁽¹⁸⁾

ในปีเดียวกันนี้ Takagi และคณะรายงานการพบความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ 2 ชนิดในยีน *LHX4* จากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นจำนวน 91 คนที่มีภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิด โดยประกอบด้วยผู้ป่วย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรค IGHD จำนวน 14 คน และกลุ่มผู้ป่วยโรค MPHD หรือ CPHD จำนวน 77 คน โดยผู้ป่วยทั้งหมดมีภาวะพร่อง GH และมีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า Takagi และคณะทำการศึกษาโดยตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิด ได้แก่ *POUIF1*, *PROPI*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX2*, *SOX3*, *OTX2* และ *GLI2* ผลการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 3 ชนิด

แบบ heterozygous mutation ได้แก่ p.R271W (c.811C>T) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้และพบได้ทั่วไปในยีน *POU1F1* ส่วนอีก 2 ชนิดเป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ในยีน *LHX4* มีรายละเอียดดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงชนิดที่หนึ่ง คือ c.249-1G>A เกิดขึ้นบริเวณ intron คาดว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ส่งผลให้เกิด exon skipping ทำให้ได้โปรตีนที่ผิดปกติ ผู้ป่วยที่พบความผิดปกตินี้เป็นเพศหญิงป่วยเป็นโรค IGHD ต่อมาได้ส่องส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ก้านของต่อมได้ส่องบาง ต่อมาได้ส่องส่วนหลังอยู่ในบริเวณที่ผิดปกติ พบภาวะพร่อง GH และพบว่าระดับของ ACTH ค่อยๆ ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น ความผิดปกติทางพันธุกรรมนี้ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี อีกทั้งยังพบในพี่สาวและพี่ชายของผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีด้วย พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ
2. การเปลี่ยนแปลงชนิดที่สอง คือ c.223G>A (p.V75I) เกิดขึ้นบริเวณ LIM1 domain ของยีน *LHX4* การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 223 โดยเปลี่ยนจากกวานีน (guanine) เป็นอะดีนีน (adenine) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 75 เปลี่ยนจากวาลีน (valine) เป็นไอโซลิวซีน (isoleucine) การเปลี่ยนแปลงนี้พบในผู้ป่วยเพศชายที่มีภาวะพร่อง GH, TSH, LH และ FSH ผลจากการทำ MRI พบว่าต่อมได้ส่องส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ก้านของต่อมได้ส่องบาง เซลลาเทอร์ซิกามีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ และต่อมได้ส่องส่วนหลังอยู่ในบริเวณที่ผิดปกติ การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรง พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ

Takagi และคณะได้ศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.V75I ใน COS7 cells และ GH3 cells โดยทำการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *POU1F1* และ *alpha-GSU* พบว่า p.V75I สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับ *LHX4* ชนิด wild type การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่รายงานความผิดปกติของยีน *LHX4* ที่สัมพันธ์กับภาวะพร่อง ACTH ที่เริ่มช้ากว่าปกติในผู้ป่วยที่มีภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมได้ส่อง แต่กำเนิด Takagi และคณะได้อธิบายว่า haploinsufficiency เป็นกลไกเบื้องต้นที่ทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานที่ต่างกันของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *LHX4*⁽¹⁹⁾

ปี ค.ศ. 2015 Rochette และคณะศึกษาความผิดปกติของยีน *LHX4* ในกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 321 คนที่เป็นโรค CPHD ผลการศึกษาพบความผิดปกติของยีน *LHX4* แบบ heterozygous missense mutation ในผู้ป่วย 5 ครอบครัว โดยพบการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ p.W204X,

p.delK242, p.N271S และ p.Q346R จากนั้นได้ศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้ง 4 ชนิดนี้ใน HEK293T cells โดยทำการทดสอบกับ โปรโมเตอร์ของยีน *PRL*, *TSHB*, *alpha-GSU* และ *POU1F1* ผลการศึกษาพบว่า p.delK242, p.N271S และ p.Q346R สามารถกระตุ้นการทำงานของ โปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ตามปกติ ในขณะที่ p.W204X ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ โปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ ประกอบกับผลการทำ western blot, EMSA และ *in silico* analysis ให้ผล ไปในทางเดียวกันจึงสรุปว่า p.delK242, p.N271S และ p.Q346R เป็นเพียง polymorphism ในขณะที่ การเปลี่ยนแปลงชนิด p.W204X ซึ่งเกิดขึ้น บริเวณ homeodomain domain ของยีน *LHX4* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้จะทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 204 เปลี่ยนจากทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นรหัสหยุด ส่งผลให้โปรตีนมีขนาดสั้นกว่าปกติ สูญเสียการทำงานและทำให้เกิดโรคในที่สุด การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้พบในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่อง GH, TSH และ ACTH โดยภาวะพร่อง GH และ TSH ถูกตรวจพบเมื่อผู้ป่วยอายุ 2 ปี ส่วนภาวะ พร่อง ACTH ถูกตรวจพบเมื่อผู้ป่วยอายุ 9 ปี นอกจากนี้ผล MRI ยังพบการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของ ต่อมใต้สมองส่วนหน้า ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ และไม่พบก้อนของ ต่อมใต้สมอง ไม่พบข้อมูลทางพันธุกรรมของพ่อและแม่ผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี การศึกษานี้ทำให้พบ ความผิดปกติของยีน *LHX4* ชนิด p.W204X ที่เป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับ การเกิดโรค CPHD และภาวะพร่อง ACTH ที่เริ่มช้ากว่าปกติ ซึ่งเป็นการขยายลักษณะทางคลินิก ของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีน *LHX4*⁽²⁰⁾

ในปีเดียวกันนี้ Gregory และคณะได้รายงานความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงชนิด p.T126M ในยีน *LHX4* ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงชนิดใหม่และชนิดแรกที่เป็นแบบ homozygous missense mutation และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD จากการศึกษาความผิดปกติของ ยีน *LHX4* ในผู้ป่วยโรค CPHD ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันจำนวน 97 คน การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ เกิดขึ้นบริเวณ LIM2 domain ผู้ป่วยเป็นเด็กทารกแรกเกิดที่เป็นพี่น้องกัน 3 คนของครอบครัว ชาวปากีสถาน (Pakistani) ที่เกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ทารกเพศหญิง ซึ่งเป็นลูกคนที่หนึ่งเสียชีวิตตอนอายุ 5 วัน ไม่มีข้อมูลการตรวจวัดระดับฮอร์โมน ไม่มีข้อมูลการทำ MRI และไม่มีข้อมูลการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรม ทารกเพศชายซึ่งเป็นลูกคนที่สอง มีภาวะพร่อง ACTH และ TSH ผลการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมพบการเปลี่ยนแปลง ชนิด p.T126M (c.377C>T) ในยีน *LHX4* การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ที่ตำแหน่ง 377 โดยเบสไซโตซีน (cytosine) เปลี่ยนเป็นเบสไทมีน (thymine) ส่งผลให้กรดอะมิโน

ที่ตำแหน่ง 126 เปลี่ยนจากทรีโอนีน (threonine) เป็นเมตไทโอนีน (methionine) ผลจากการทำ MRI พบการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมได้สมองส่วนหน้า และต่อมได้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ ทารกเพศชายซึ่งเป็นลูกคนที่สามมีภาวะพร่อง ACTH, TSH, PRL และ GH ส่วนผลการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมและผลจากการทำ MRI ให้ผลเช่นเดียวกับพี่ชายของเขา นอกจากลักษณะทางคลินิกที่กล่าวมาแล้วผู้ป่วยทั้ง 3 คนยังมีความบกพร่องในระบบอวัยวะอื่นๆ อีกด้วย ผู้ป่วยทั้ง 3 คนเสียชีวิตตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากคลอด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะที่พบว่าหนูที่มีความผิดปกติของยีน *LHX4* แบบ homozygous mutation จะเสียชีวิตหลังจากที่คลอดได้ไม่นาน⁽²¹⁾ นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของยีน *LHX4* ชนิด p.T126M แบบ heterozygous missense mutation ในพ่อแม่และปู่ของผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีด้วย Gregory และคณะได้ศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีความผิดปกตินี้ใน HEK293T cells โดยทำการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *PRL* และ *alpha-GSU* ผลการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงชนิด p.T126M สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ตามปกติเมื่อเปรียบเทียบกับ *LHX4* ชนิด wild type โดยพวกเขาได้อธิบายว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้อาจจะไม่ได้ส่งผลกระทบต่อโปรโมเตอร์ที่นำมาทดสอบแต่อาจจะส่งผลกระทบต่อโปรโมเตอร์ของยีนอื่น เช่น *TSHB*, *PIT1 (POU1F1)* และ *FSHB* กล่าวโดยสรุปการศึกษานี้พบความผิดปกติของยีน *LHX4* ชนิดใหม่และชนิดแรกที่เป็นแบบ homozygous missense mutation ที่ส่งผลให้ผู้ป่วย CPHD ที่มีความผิดปกตินี้เสียชีวิตหลังจากคลอดได้ไม่นาน⁽²²⁾

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2015 ยังพบว่ามีกรรายงานความถี่ของความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุของโรค CPHD โดย De Rienzo และคณะอีกด้วย การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลังในกลุ่มผู้ป่วยชาวอิตาลีจำนวน 144 คน แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ sporadic cases จำนวน 136 คน และ familial cases จำนวน 8 คน ทำการศึกษาโดยการรวบรวมข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยตั้งแต่ปี ค.ศ.2003 ถึงปี ค.ศ.2013 จากนั้นจัดแบ่งกลุ่มและทำการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมในยีน *PROPI*, *POU1F1*, *HESX1*, *LHX3* และ *LHX4* ผลการศึกษาพบความผิดปกติทางพันธุกรรมในยีนดังกล่าวร้อยละ 2.9 ในกลุ่ม sporadic cases โดยพบความผิดปกติในยีน *PROPI* จำนวน 2 คน, *POU1F1* และ *HESX1* จำนวนยีนละ 1 คน ส่วนกลุ่ม familial cases พบความผิดปกติในยีน *PROPI* จำนวน 1 คน คิดเป็นร้อยละ 12.5 นอกจากนี้พวกเขายังได้ศึกษาความถี่ของความผิดปกติในยีนดังกล่าวที่สัมพันธ์กับโรค CPHD จากการรายงานก่อนหน้านี้ด้วย ผลการศึกษาพบว่าความผิดปกติของยีนทั้งหมดที่ถูกตรวจพบในผู้ป่วยโรค CPHD ในกลุ่ม sporadic cases

คิดเป็นร้อยละ 11.2 (80 ใน 711 คน) และร้อยละ 63 (46 ใน 63 คน) ในกลุ่ม familial cases โดยพบความผิดปกติในยีน *PROPI* มากที่สุด รองลงมาคือ *POUIF1*, *LHX4*, *LHX3* และ *HESX1* ตามลำดับ ซึ่งความผิดปกติของยีน *LHX4* ที่พบในกลุ่ม sporadic case มีเพียงร้อยละ 0.5 (5 ใน 916 คน) ส่วนในกลุ่ม familial case พบร้อยละ 18.8 (3 ใน 16 คน)⁽²³⁾

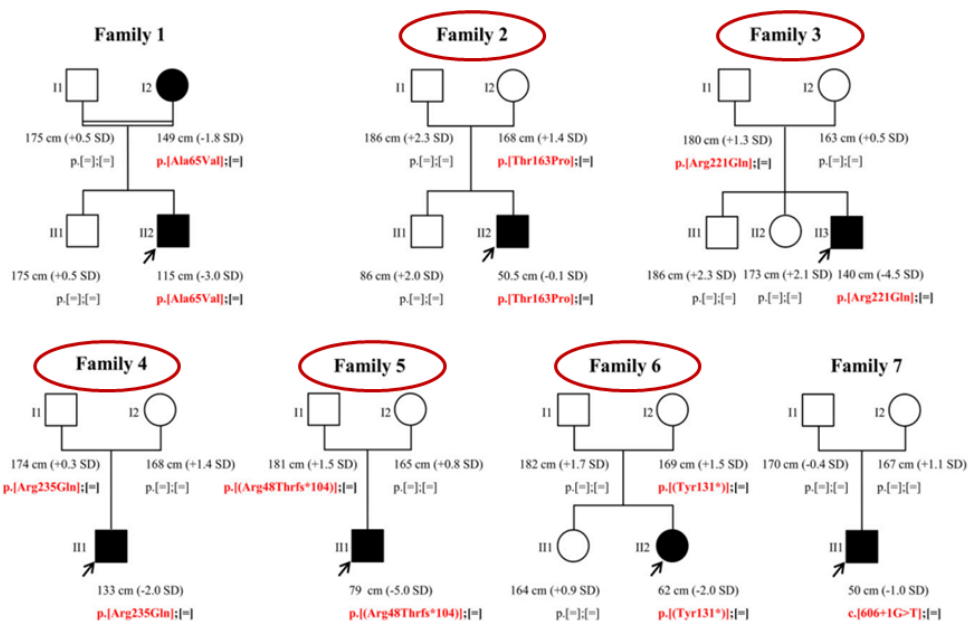
ปี ค.ศ. 2017 Cohen และคณะได้รายงานผลการศึกษาค้นคว้าความผิดปกติทางพันธุกรรมในยีน *LHX4* ที่ตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีความสัมพันธ์กันจำนวน 417 คน ที่มีภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิดร่วมกับการมีต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ และ/หรือมีความผิดปกติของเซลล์ลาเทอร์ซิกา ผลการศึกษาพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงแบบ heterozygous mutation ในยีน *LHX4* ทั้งหมด 7 ชนิด แบ่งออกเป็น การเปลี่ยนแปลงใน intron จำนวน 1 ชนิด คือ c.606+1G>T และการเปลี่ยนแปลงใน exon จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ p.Tyr131* (p.Y131*), p.Arg48Thrfs*104 (p.R48Tfs*104), p.Ala65Val (p.A65V), p.Thr163Pro (p.T163P), p.Arg221Gln (p.R221Q), และ p.Arg235Gln (p.R235Q) จากนั้นศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงใน exon ทั้ง 6 ชนิดใน CHO cells โดยทำการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1*, *GH* และ *PRL* พบว่า p.Tyr131*, p.Arg48Thrfs*104, p. Ala65Val, p.Thr163Pro และ p.Arg221Gln ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* และ *GH* ได้ ในขณะที่ p.Arg235Gln สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ทั้งสองชนิดได้ตามปกติ ส่วนการทดสอบกับโปรโมเตอร์ของยีน *PRL* พบว่า p.Tyr131*, p.Arg48Thrfs*104 และ p.Thr163Pro ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ ในขณะที่ p. Ala65Val, p.Arg221Gln และ p.Arg235Gln สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ดังกล่าวได้ตามปกติ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาดำเนินการของโปรตีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 6 ชนิดนี้ โดยพบว่า p. Ala65Val, p.Thr163Pro, p.Arg221Gln และ p.Arg235Gln อยู่ในนิเวศคล้ายเช่นเดียวกับโปรตีน *LHX4* ชนิด wild type ในขณะที่ p.Tyr131* และ p.Arg48Thrfs*104 ถูกพบในไซโตพลาสซึม ผลการศึกษาจากการทำ *in silico* analysis และการทดสอบการทำงานของยีน *LHX4* ที่ผิดปกติสรุปได้ว่าความผิดปกติของยีน *LHX4* ชนิด p.Tyr131*, p.Arg48Thrfs*104, c.606+1G>T, p. Ala65Val, p.Thr163Pro และ p.Arg221Gln สัมพันธ์กับภาวะบกพร่องในการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองแต่กำเนิด ส่วน p.Arg235Gln น่าจะเป็น polymorphism ที่พบได้ยาก โดยความผิดปกติของยีน *LHX4* แต่ละชนิดถูกพบในผู้ป่วยดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงชนิด p.Ala65Val (c.194C>T) เกิดขึ้นบริเวณ LIM1 domain ของยีน *LHX4* การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 194 โดยเปลี่ยนจากเบสไซโทซีน (cytosine) เป็นเบสไทมีน (thymine) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 65 เปลี่ยนจากอะลานีน (alanine) เป็นวาลีน (valine) การเปลี่ยนแปลงนี้พบในผู้ป่วยเพศชายที่ป่วยเป็นโรค IGHD มีภาวะพร่อง GH และต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ แม่ของผู้ป่วยมีความผิดปกติของยีน *LHX4* เช่นเดียวกับผู้ป่วย แม่ของผู้ป่วยสูง 149 เซนติเมตร (-1.8 SD ซึ่งใกล้เคียงกับ -2 SD) และมีระดับ IGF1 ต่ำ (110 ng/mL, ค่าปกติเท่ากับ 100-295) พ่อและแม่ของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ
2. การเปลี่ยนแปลงชนิด p.Thr163Pro (c.487A>C) เกิดขึ้นบริเวณ homeodomain ของยีน *LHX4* การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 487 จากเบสอะดีนีน (adenine) เปลี่ยนเป็นเบสไซโทซีน (cytosine) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 163 เปลี่ยนจากทรีโอนีน (threonine) เป็นโพรลีน (proline) การเปลี่ยนแปลงนี้พบในผู้ป่วยเพศชายที่ป่วยเป็นโรค CPHD มีภาวะพร่อง GH, TSH, LH/FSH และ ACTH ผล MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติและมีเซลล์เทอร์ซิก้าที่ตื้นกว่าปกติ ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรมชนิดนี้มาจากแม่ของผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ
3. การเปลี่ยนแปลงชนิด p.Arg221Gln (c.662G>A) พบในผู้ป่วยเพศชายที่มีภาวะพร่อง GH และ LH/FSH ผลจากการทำ MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติและมีเซลล์เทอร์ซิก้าที่ตื้นกว่าปกติ การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 662 โดยเปลี่ยนจากกวานีน (guanine) เป็นอะดีนีน (adenine) และกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 221 เปลี่ยนจากอาร์จินีน (arginine) เป็นกลูตามีน (glutamine) ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้มาจากพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ
4. การเปลี่ยนแปลงชนิด p.Arg235Gln (c.704G>A) พบในผู้ป่วยเพศชายที่เกิดจากพ่อและแม่ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผลการตรวจวัดระดับฮอร์โมนพบว่าภาวะพร่อง GH และ TSH นอกจากนี้ยังพบว่าต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ และพบการแตกของกระดูกสฟีนอยด์ที่จุดกำเนิดเซลล์เทอร์ซิก้า การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 235 เปลี่ยนจากอาร์จินีน (arginine) เป็นกลูตามีน (glutamine) โดยเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลง

- ของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 704 ที่เปลี่ยนจากเบสกวานีน (guanine) เป็นเบสอะดีนีน (adenine) ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้มาจากพ่อของผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรค
5. การเปลี่ยนแปลงชนิด p.Arg48Thrfs*104 (c.143_144delGA) เกิดขึ้นบริเวณ LIM1 domain ของยีน *LHX4* การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการขาดหายไปของเบสกวานีน (guanine) และอะดีนีน (adenine) ที่ตำแหน่ง 143 และ 144 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนเฟรม (frameshift) และเกิดตำแหน่งหยุดก่อนกำหนด (premature stop codon) การเปลี่ยนแปลงนี้พบในผู้ป่วยเพศชาย โดยได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อที่มีสุขภาพดี พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH, TSH, LH/FSH และ ACTH ผลจากการทำ MRI แสดงให้เห็นถึงการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ของต่อมใต้สมองส่วนหน้าและเซลล์ลาเทอร์ซิกา
 6. การเปลี่ยนแปลงชนิด p.Tyr131* (c.393C>G) เกิดขึ้นบริเวณ LIM2 domain ของยีน *LHX4* การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 393 จากเบสไซโตซีน (cytosine) เปลี่ยนเป็นเบสกวานีน (guanine) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 131 จากไทโรซีน (tyrosine) เป็นรหัสหยุด พบในผู้ป่วยเพศหญิงซึ่งได้รับการถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรมนี้มาจากแม่ที่มีสุขภาพดี พ่อและแม่ของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยมีต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่เจริญไม่สมบูรณ์ และมีภาวะพร่อง GH, PRL, TSH, LH/FSH และ ACTH
 7. การเปลี่ยนแปลงชนิด c.606+1G>T เกิดขึ้นบริเวณ intron 4 ของยีน *LHX4* ส่งผลให้เกิด exon skipping ทำให้การแปลรหัสเกิดความผิดปกติ การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ไม่พบในพ่อและแม่ของผู้ป่วย (*de novo mutation*) ที่ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH, TSH และ ACTH ผล MRI พบว่าต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ต่อมใต้สมองส่วนหลังอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติ เซลล์ลาเทอร์ซิกาตี้นกว่าปกติ

จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบในยีน *LHX4* ส่วนมากจะมีลักษณะการแสดงออกแบบ incomplete penetrance ซึ่งมีถึง 5 ชนิดใน 7 ชนิดของการเปลี่ยนแปลงที่พบ ได้แก่ p.Thr163Pro, p.Arg221Gln, p.Arg235Gln, p.Arg48Thrfs*104 และ p.Tyr131* (ครอบครัวที่ 2-6) รายละเอียดพงศาวรีของผู้ป่วยดังรูปที่ 4 โดย Cohen และคณะได้ใช้ทฤษฎี haploinsufficiency ในการอธิบายลักษณะดังกล่าวเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ และอธิบายเพิ่มเติมว่าการที่พ่อและแม่ของผู้ป่วยที่พบความผิดปกติเช่นเดียวกับผู้ป่วยแต่ไม่เป็นโรคน่าจะเกิดจากการแสดงออกของอัลลีลที่ปกติเพียงอัลลีลเดียวของยีน *LHX4* ซึ่งเป็นการแสดงออกที่เกิดจากการสุ่ม

(random monoallelic expression) จากการศึกษาใน Cohen และคณะได้พบข้อสังเกตเพิ่มเติมว่าความผิดปกติของเซลล์เทอร์ซิกาและการอยู่ในตำแหน่งที่ผิดปกติของต่อมได้สมองส่วนหลังไม่จำเป็นต้องพบในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีน *LHX4* เสมอไป นอกจากนี้พวกเขายังพบว่าผู้ป่วยของพวกเขามีลักษณะทางคลินิกอื่นๆ เพิ่มเติมที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น aortic coarctation, pyloric duplication, epilepsy และ rounded forehead รายละเอียดดังตารางที่ 2 กล่าวโดยสรุป การศึกษานี้ช่วยขยายความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *LHX4* และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย⁽²⁴⁾



รูปที่ 4 พงสาวรีของครอบครัวผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในยีน *LHX4* ที่สัมพันธ์กับโรค CPHD จากการศึกษาของ Cohen และคณะในปี ค.ศ. 2017 โดยวงกลมสีแดงคือครอบครัวที่พบ non-penetrance ตารางที่ 2 ข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในยีน *LHX4*

Patient	Mutation	Pituitary deficit(s)	Pituitary imaging			Other feature(s)
			Anterior pituitary	Posterior pituitary	Sella turcica	
1-1	c.607-1G>C	GH, TSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Hypoplastic	Chiari malformation
1-2		GH, TSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Hypoplastic	Chiari malformation
1-3		GH, TSH, ACTH	NA*	NA	NA	None
2	p.P389T	GH, PRL, TSH, LH, FSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Hypoplastic	Chiari malformation

Patient	Mutation	Pituitary deficit(s)	Pituitary imaging			Other feature(s)
			Anterior pituitary	Posterior pituitary	Sella turcica	
3-1	p.A210P	GH, TSH, LH, FSH, ACTH	Hypoplastic	Normal	Normal	Pituitary cystst
3-2		GH, TSH	Hypoplastic	Normal	Normal	Pituitary cystst
3-3		GH	NA	NA	NA	None
4	p.R84C	GH, TSH, LH, FSH	Small	Ectopic	Normal	None
5	p.L190R	GH, TSH, ACTH	Small	Ectopic	Normal	None
6-1	p.T99fs53*	GH, TSH	Hypoplastic	Invisible	Hypoplastic	Corpus callosum hypoplasia
6-2		GH, TSH	Hypoplastic	Normal	Hypoplastic	None
6-3		GH, LH, FSH	Hypoplastic	Normal	Normal	None
7	p.V101A	GH, TSH, LH, FSH, ACTH	Small	Ectopic	Normal	Chiari malformation
8	522,009 bp deletion	GH, TSH, PRL, LH, FSH	Hypoplastic	Ectopic	Hypoplastic	Pituitary cystst
9	1q25 microdeletion	GH, PRL, TSH, LH, FSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Hypoplastic	Heart failure
10	c.249-1G>A	GH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Normal	None
11	p.V75I	GH, TSH, LH, FSH	Hypoplastic	Ectopic	Hypoplastic	None
12	p.W204*	GH, TSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Normal	None
13-1	p.T126M	TSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Normal	Multiple organ failure
13-2		GH, PRL, TSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Normal	Multiple organ failure
14	p.A65V	GH	Normal	Ectopic	Normal	Micropenis
15	p.T163P	GH, TSH, LH/FSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic	Shallow	Aortic coarctation, Pyelocaliceal duplicity, Micropenis

Patient	Mutation	Pituitary deficit(s)	Pituitary imaging			Other feature(s)
			Anterior pituitary	Posterior pituitary	Sella turcica	
16	p.R221Q	GH, LH/FSH	Normal	Ectopic (double)	Shallow	Arched palate
17	p. R48Tfs*104	GH, TSH, FSH/LH, ACTH	Hypoplastic	Eutopic	Hypoplastic	None
18	p.Y131*	GH, PRL, TSH, FSH/LH, ACTH	Aplastic	Eutopic	Normal	Epilepsy
19	c.606+1G>T	GH, TSH, ACTH	Hypoplastic	Ectopic (double)	Shallow	Type I Chiari, rounded forehead, Micropenis

* NA ย่อมาจาก not available

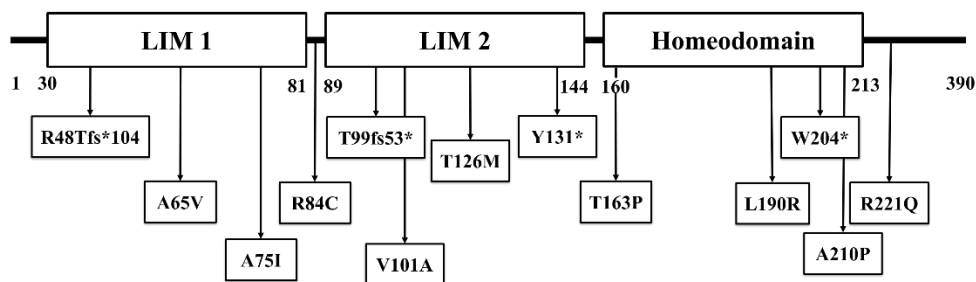
ปัจจุบันพบการรายงานความผิดปกติในยีน *LHX4* ที่มีความสัมพันธ์กับโรค CPHD ทั้งหมด 19 ชนิด แบ่งออกเป็นความผิดปกติแบบ microdeletion จำนวน 2 ชนิด ความผิดปกติที่พบบริเวณ intron จำนวน 3 ชนิด และความผิดปกติที่พบบริเวณ exon จำนวน 14 ชนิด โดยการเปลี่ยนแปลงทั้ง 19 ชนิดนี้พบว่ามี การแสดงออกแบบ incomplete penetrance จำนวน 8 ชนิด พบการเปลี่ยนแปลงแบบ *de novo* จำนวน 4 ชนิด และการเปลี่ยนแปลงที่มีการศึกษาการทำงานของยีนแล้วจำนวน 13 ชนิด ซึ่งจะพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงแบบ missense mutation ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของโปรตีนจำนวน 9 ชนิด การเปลี่ยนแปลงแบบ missense mutation ที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของโปรตีนจำนวน 2 ชนิด และการเปลี่ยนแปลงแบบ frameshift mutation จำนวน 2 ชนิด รายละเอียด ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 5

ตารางที่ 3 ข้อมูลทางพันธุกรรมของผู้ป่วยที่พบความผิดปกติในยีน *LHX4*

No.	Mutation		Genotype	Consanguinity	Location	Inheritance	Functional study
	Nucleotide	Protein					
1	c.607-1G>C	-	Heterozygous	Yes	Intron 4	Affected mother	No
2	c.1165C>A	p.P389T	Heterozygous	NA	After HD*	<i>De novo</i>	No
3	c.628G>C	p.A210P	Heterozygous	No	HD	Affected father	Yes

No.	Mutation		Genotype	Consanguinity	Location	Inheritance	Functional study
	Nucleotide	Protein					
4	c.250C>T	p.R84C	Heterozygous	No	Between LIM1 & LIM2	<i>De novo</i>	Yes
5	c.569T>G	p.L190R	Heterozygous	No	HD	NA	Yes
6	c.293_294 InsC	p.T99fs53*	Heterozygous	No	LIM2	Affected father	Yes
7	c.302T>C	p.V101A	Heterozygous	No	LIM2	NA	Yes
8	522,009 bp deletion	-	Heterozygous	No	1q25	<i>De novo</i>	No
9	1.5 megabases microdeletion	-	Heterozygous	No	1q25	Unaffected mother	No
10	c.249-1G>A	-	Heterozygous	No	Intron 2	Unaffected father	No
11	c.223G>A	p.V75I	Heterozygous	No	LIM1	Unaffected father	Yes
12	NA	p.W204*	Heterozygous	NA	HD	NA	Yes
13	c.377C>T	p.T126M	Homozygous	No	LIM2	Unaffected parents (Heterozygous)	Yes
14	c.194C>T	p.A65V	Heterozygous	Yes	LIM1	Affected mother	Yes
15	c.487A>C	p.T163P	Heterozygous	No	HD	Unaffected mother	Yes
16	c.662G>A	p.R221Q	Heterozygous	No	After HD	Unaffected father	Yes
17	c.143_144 delGA	p.R48Tfs*104	Heterozygous	No	LIM1	Unaffected father	Yes
18	c.393C>G	p.Y131*	Heterozygous	No	LIM2	Unaffected mother	Yes
19	c.606+1G>T	-	Heterozygous	No	Intron 4	<i>De novo</i>	No

* HD ข้อมูลจาก Homeodomain, NA ข้อมูลจาก not available



รูปที่ 5 ความผิดปกติของยีน *LHX4* ที่พบในผู้ป่วย CPHD ที่ศึกษาการทำงานของยีนแล้ว

โรค Osteogenesis imperfect (OI)

โรค Osteogenesis imperfecta (OI) หรือที่รู้จักกันในชื่อ brittle bone disease หรือโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์เป็นโรคทางพันธุกรรมที่หายาก (rare disease) มีความชุกประมาณ 7 คนใน 100,000 คน⁽²⁵⁾ อาการที่พบได้บ่อยคือกระดูกเปราะแตกหักง่ายและผิดรูป นอกจากนี้ อาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ตาขาวเปลี่ยนเป็นสีฟ้าหรือเทา (blue or gray sclerae) รูปหน้าแบนกว้าง ตัวเตี้ย มีความสูงต่ำกว่ามาตรฐาน ข้อหลวม (hypermobility) เท้าแบน (flat feet) แขนและขาโก่ง กระดูกสันหลังคด (scoliosis) กระดูกทรวงอกเจริญผิดปกติ เสียงแหลมผิดปกติ สูญเสียการได้ยิน (hearing loss) ฟันมีสีเหลืองออกสีน้ำตาลและหักง่าย (dentinogenesis imperfecta) เป็นต้น ระดับความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับชนิดของโรค OI ซึ่งปัจจุบันแบ่งออกเป็น 19 ชนิด มียีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค OI อย่างน้อย 18 ยีน โดยมีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR) และ X-linked (XL) ดังตารางที่ 4⁽²⁵⁻²⁸⁾ โดยพบว่าร้อยละ 85 เกิดจากความผิดปกติของยีน *COL1A1* และ *COL1A2*⁽²⁵⁻²⁷⁾ ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง pro-alpha 1 chain และ pro-alpha 2 chain ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type 1) ที่พบได้มากที่สุดในร่างกายมนุษย์และเป็นโครงสร้างหลักของกระดูก ผิวหนัง และเอ็น โครงสร้างของคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีลักษณะเป็น triple helix ประกอบด้วยสาย polypeptide จำนวน 3 สาย คือ pro-alpha 1 จำนวน 2 สาย และ pro-alpha 2 จำนวน 1 สาย ที่พันเกลียวกันได้พอดี แต่ละสายของคอลลาเจนจะประกอบไปด้วยลำดับที่ซ้ำกันของ Gly-X-Y โดย Gly คือกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ส่วน X และ Y คือกรดอะมิโนชนิดอื่นซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นโพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ส่วนมากจะพบการรายงานว่ามี การกลายพันธุ์เกิดขึ้นบริเวณ Gly-X-Y repeats แบบแทนที่ (substitution) กรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ทำให้โครงสร้างสูญเสียความเสถียรส่งผลให้กระดูกไม่แข็งแรงและแตกหักง่าย^(25, 27)

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เคยรายงานการพบการกลายพันธุ์ในยีน *COL1A1* ในผู้ป่วยโรค OI ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบการกลายพันธุ์ในยีนอื่นๆ ด้วย เช่น *MBTPS2*, *BMP1*, *WNT1* และ *P4HB* รายละเอียดดังตารางที่ 5⁽²⁹⁻³³⁾ การรักษาผู้ป่วยโรค OI จะรักษาโดยการให้ยา pamidronate ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยมีอัตราการหักของกระดูกลดลง⁽²⁶⁻²⁸⁾

ตารางที่ 4 รายละเอียดยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค OI

Gene	Protein	Inheritance	OI type	OMIM
<i>COL1A1</i>	Collagen alpha 1, COL1A1	AD	I, II, III, IV	166200, 166210, 259420, 166220
<i>COL1A2</i>	Collagen alpha 2, COL1A2	AD	I, II, III, IV	166200, 166210, 259420, 166220
<i>IFITM5</i>	BRIL / IFM5	AD	V	610967
<i>SERPINF1</i>	PEDF	AR	VI	613982
<i>CRTAP</i>	CRTAP	AR	VII	610682
<i>P3H1</i>	P3H1	AR	VIII	610915
<i>PPIB</i>	PPlase B	AR	IX	259440
<i>SERPINH1</i>	Serpin H1, HSP47	AR	X	613848
<i>FKBP10</i>	FKBP65	AR	XI	610968
<i>BMP1</i>	BMP1	AR	XII	614856
<i>SP7</i>	SP7, osterix	AR	XIII	613849
<i>TMEM38B</i>	TRIC-B, TM38B	AR	XIV	615066
<i>WNT1</i>	WNT1	AR	XV	615220
<i>CREB3L1</i>	OASIS, CR3L1	AR	XVI	616229
<i>SPARC</i>	SPARC, osteonectin	AR	XVII	616507
<i>TENT5A</i>	TENT5A	AR	XVIII	617952
<i>MBTPS2</i>	S2P	XLR	XIX	301014
<i>PLOD2</i>	LH2	AR	No type	609220
<i>SEC24D</i>	SEC24D	AR	No type	616294
<i>P4HB</i>	PDI	AR	No type	112240

ตารางที่ 5 การกลายพันธุ์ของยีนที่พบในคนไข้โรค OI ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

Mutation			Inheritance	Reference
Gene	Nucleotide	Protein		
<i>MBTPS2</i>	c.1376A>G	p.N459S	XL	29
	c.1515G>C	p.L505F		
<i>BMP1</i>	c.796_797delTT	p.F266Rfs*25	AD (compound heterozygous)	30
	c.2108-2A>G	-		
<i>COL1A1</i>	c.1290delG	p.G431Vfs*110	AD	31
<i>WNT1</i>	c.6delG	p.L3Sfs*36	AR	32
<i>P4HB</i>	c.1178A>G	p.Y393C	AD	33

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) และได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย IRB 500/61 และ COE No. 027/2018 ลงวันที่รับรอง 15 สิงหาคม 2561

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) และ Mutagenesis
 - Thermal cycler รุ่น Mastercycler pro S (Eppendorf)
 - Centrifuge Minispin[®] รุ่น 5452 (Eppendorf)
 - Mini Centrifuge รุ่น C1301 (Labnet)
 - Vortex Mixer รุ่น G560E (Scientific Industries)
 - PCR cabinet (AUGUSTIN)
 - ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) และทิวป์ (Tip)
 - หลอด PCR (PCR tube) ขนาด 0.2 ml
 - หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.6 ml และ 1.5 ml
 - Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs)
 - Phusion DNA Polymerase (New England BioLabs)
 - Phusion HF Buffer (New England BioLabs)
 - DMSO (New England BioLabs)
 - *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific)
 - *Taq* Buffer with KCL (Thermo Scientific)
 - MgCl₂ (Thermo Scientific)
 - DMSO (Thermo Scientific)
 - Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) set (Thermo Scientific)

- Nuclease-Free Water (Qiagen)
 - ไพรมเมอร์ (Primers) รายละเอียดดังตารางที่ 6
- ตารางที่ 6 รายละเอียดของไพรมเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-->3')
1	LHX4_Check_WT_3'_F LHX4_Check_WT_R	GACAGGACAATCCTATCAGG CCCTGCTGGCAGGCCGTGCA
2	LHX4_R122W_F LHX4_R122W_R	CATCTGCAACTGGCAGCTGGC ATGCAAGCAAAGCAGTGCAG
3	LHX4_L190R_F LHX4_L190R_R	AGGGAGCAGCGGTCCTCAGAGACAG CACGTGCCGGGCAGGCTT
4	LHX4_T163P_F LHX4_T163P_R	GCCCCGGACCCCATCACAGC CGCTTAGCTCCAGCCTCTG
5	LHX4_Check_MT_F	AACCAGCACATCCTGGACAAG
6	GH1_F GH1_R	AGATCTCAATCTATTGGCTGTGCTTG AAGCTTGATCCTTGAGCTGGTCT
7	POU1F1_F POU1F1_R	AGATCTGGCACAGAGTCTAGCTT AAGCTTTCTGAGGCACCAGGAG
8	TSHB_BglII_F TSHB_HindIII_R	ACCCAGATCTAATGGTGCTGAGATAACTGGC ACCCAAGCTTCTTACTTTGCATTGGTGAGCA
9	Cloning Analysis_F Cloning Analysis_R	ACCTGCCAACCAAAGCGAGAAC TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG
10	T7promoter SP6	TAATACGACTCACTATAGGG ATTTAGGTGACACTATAG
11	pTSHB_Ter_F	ACCCATAATGGAGCTGTCATCC
12	RVprimer3 pGL4.10(luc2)_R	CTAGCAAATAGGCTGTCCC TTCATGGCTTTGTGCAGCTG

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำ Agarose gel electrophoresis
 - LE Agarose (Theera Trading)
 - Tris (Vivantis)
 - Boric acid (Vivantis)
 - EDTA (Vivantis)
 - น้ำกลั่น (Distilled water)
 - RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology)
 - Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs)
 - 1 kb DNA Ladder with stain (SibEnzyme) และ 100 bp DNA Ladder (BioEntist)
 - เครื่องซังดิจิตอลความละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (KERN)
 - Microwave (SHARP)
 - Gel cassette, gel tray, comb, electrophoresis chamber และ power supply (Bio-Rad)
 - Molecular Imager® Gel Doc XR System (Bio-Rad)
3. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์
 - GenepHlow™ Gel Extraction Kit (Geneaid)
 - Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs)
4. สารเคมีสำหรับตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme digestion)
 - *Bgl*III (New England BioLabs)
 - *Hind*III (New England BioLabs)
5. สารเคมีสำหรับทำ Ligation และ Transformation
 - NEB® PCR Cloning Kit (New England BioLabs)
 - NEB® 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) (New England BioLabs)
 - NEB® 10-beta Stable Outgrowth Medium (New England BioLabs)
 - NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) (New England BioLabs)
 - SOC Outgrowth Medium (New England BioLabs)
 - pGL4.10[*luc2*] vector (Promega)
 - Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) (New England BioLabs)
 - T4 DNA Ligase (New England BioLabs)

- T4 DNA Ligase Buffer (New England BioLabs)
 - Nuclease-Free Water (Qiagen)
 - Yeast Extract Power (Affymetrix)
 - Casein Hydrolysate Enzymatic Digest (Affymetrix)
 - Sodium chloride (VWR Chemicals)
 - Agar agar powder (TM Media)
 - น้ำกลั่น (Distilled water)
 - Ampicillin (General Drugs House)
6. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด
- Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)
 - Geneaid™ Plasmid Maxi Kit (Endotoxin Free) (Geneaid)
 - Ethanol absolute (VWR Chemicals)
 - 2-Propanol (VWR Chemicals)
 - Nuclease-Free Water (Qiagen)
7. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์
- Chinese hamster ovary (CHO) -K1 cells (ATCC® CCL-61™)
 - Nutrient Mixture F-12 Media (HyClone™)
 - Fetal Bovine Serum (HyClone™)
 - Penicillin-Streptomycin Solution (HyClone™)
 - DPBS (10X) Liquid (HyClone™)
 - Trypsin 0.25% (1X) (HyClone™)
 - Trypan Blue Stain (0.4%) (Gibco®)
 - น้ำกลั่น (Distilled water)
 - CO₂ Incubator รุ่น Forma Steri-Cycle i160 (Thermo Scientific™)
 - EVOS FLC Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific)
 - Motic AE31 Elite Binocular Compound Microscopes (Motic)
 - Class II Biological Safety Cabinet รุ่น NU-427 (NuAire)
 - Heated Water Bath รุ่น PRECISTERM (J.P Selecta)

- Centrifuge รุ่น 5702 (Eppendorf)
 - Countess™ Cell Counting Chamber Slide (Invitrogen)
 - Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen)
 - Pipette Filler รุ่น F1 (Thermo Scientific™)
 - Disposable Serological Pipette ขนาด 2, 5, 10 และ 25 ml (Costar®)
 - Disposable Syringe ขนาด 25 ml (Nipro)
 - Minisart® Syringe Filter ขนาด 0.45 µm (Sartorius)
 - Cell Culture Flask ขนาด 25 cm² (T-25 Flask) และ 75 cm² (T-75 Flask) (Nest®)
 - หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15 ml และ 50 ml
 - Cryovial ขนาด 1.8 ml (SPL Life Sciences)
8. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับ Transfection
- X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche)
 - Nutrient Mixture F-12 Media (HyClone™)
 - 12-well multidish (Thermo Scientific)
9. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับ Luciferase assay
- 5X Passive Lysis Buffer (Promega)
 - Luciferase assay system (Promega)
 - 96-well plate white flat bottom (Costar®)
 - SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices)
10. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - 96-well plate clear flat bottom (Greiner)
 - Sealing Tape (Thermo Scientific™)
 - Heating Block Shaker (M.Biotech)
 - SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices)
11. วัสดุอุปกรณ์ทั่วไปสำหรับงานวิจัย
- เครื่องซังดิจิตอลความละเอียดสูงทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A-FR (Precisa)
 - Autoclave รุ่น HVE-50 (Hirayama)

- Centrifuge รุ่น UNIVERSAL 320R (Hettich)
 - Centrifuge รุ่น MIKRO 120 (Hettich)
 - Dry Block Heater รุ่น D1200 (Labnet)
 - Hot Air Sterilizer รุ่น SNB 100 (Mettler)
 - NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™)
 - Shaking Incubator รุ่น S16-2 (SHEL LAB)
 - Vortex Mixer รุ่น G560E (Scientific Industries)
 - Pipette Filler รุ่น F1 (Thermo Scientific™)
 - Disposable Serological Pipette ขนาด 2, 5, 10 และ 25 ml (Costar®)
 - ตู้เย็น (Refrigerator) อุณหภูมิ 2-8 °C
 - ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -20 °C และ -80 °C
 - นาฬิกาจับเวลา (Timer)
 - ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) และทิว (Tip)
 - หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.6 ml และ 1.5 ml
 - หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15 ml และ 50 ml
 - Rack สำหรับวางหลอดทดลอง
 - กล่องสำหรับเก็บหลอดทดลอง
 - ตะเกียงแอลกอฮอล์และไฟแช็ค
 - แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
 - จานเพาะเชื้อแบบพลาสติก (Petri dish)
 - ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask)
 - บีกเกอร์ (Beaker)
 - กระจกตวง (Cylinder)
 - ขวดแลบฟลาเกลียว (Laboratory bottle)
 - ถังมือยาง
 - ปากกาไม่ละลายน้ำ
12. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัย
- BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.2.5)

- Oligo Primer Design Software (Version 9.1)
- Oligo Calculator (<http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.html>)
- Chromas (Version 2.6.2)
- SnapGene[®] Viewer (Version 3.3.3)
- NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com/>)
- NEBioCalculator v1.8.1 (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>)
- SoftMax Pro (Version 5.4.1)
- IBM SPSS Statistics (Version 22)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การตรวจสอบพลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type

พลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type (pTracer-*LHX4*_WT-HA) ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Marie Legendre ประเทศฝรั่งเศส พลาสมิด pTracer-*LHX4*_WT-HA จะถูกเพิ่มปริมาณด้วยการทำ transformation และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ก่อนนำไปใช้ในงานวิจัย ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pTracer-*LHX4*_WT-HA ด้วยเทคนิค Sanger sequencing
 - 1.1.1 ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LHX4* (NM_033343.3) โดยใช้โปรแกรม Oligo Primer Design Software (Version 9.1) และ Oligo Calculator
 - 1.1.2 สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์กับบริษัท Ward Medic โดยเลือกแบบ Purification Standard Desalting จำนวน 2 เส้น คือ *LHX4*_Check_WT_3'_F และ *LHX4*_Check_WT_R รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 1
- 1.2 ทำ transformation เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli*
 - 1.2.1 นำ NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำให้ละลายในน้ำแข็ง
 - 1.2.2 เติมพลาสมิด pTracer-*LHX4*_WT-HA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงใน NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli*
 - 1.2.3 นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

- 1.2.4 Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.2.5 นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 1.2.6 เติม SOC Outgrowth Medium ปริมาตร 950 ไมโครลิตร
- 1.2.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที
- 1.2.8 เกลี่ย (spread) เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 เพลท คือ
 - เพลทที่ 1 ใช้เชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร
 - เพลทที่ 2 ใช้เชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 1.2.9 นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 1.2.10 เก็บเชื้อที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 1.3 เลือกลโคไลนีเดียมาเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid) เพื่อนำพลาสมิดไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์
- 1.4 เตรียมพลาสมิดสำหรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing และวิเคราะห์ผล
 - 1.4.1 เตรียมพลาสมิดให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ไพรเมอร์
 - 1.4.2 เตรียมไพรเมอร์ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง
 - 1.4.3 เตรียมเอกสารและกรอกรายละเอียดต่างๆ ของตัวอย่าง
 - 1.4.4 ส่งตัวอย่างไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้
 - 1.4.5 วิเคราะห์ผล Sanger sequencing โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 และ Chromas 2.6.2
 - 1.4.6 สร้างแบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิดด้วยโปรแกรม SnapGene® Viewer 3.3.3
- 1.5 เพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Geneaid™ Maxi Plasmid Kit (Geneaid)

2. การสร้างพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant

พลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant จะถูกสร้างขึ้น โดยใช้เทคนิค Site-directed mutagenesis ด้วยชุดน้ำยา Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) พลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant ที่ต้องการศึกษา คือ *LHX4_R122W* (c.364C>T, p.R122W) ส่วนพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant ที่ใช้สำหรับควบคุมการทดลองซึ่งเคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้และให้ผลการศึกษาแบบ loss of function มี 2 ชนิด ได้แก่ *LHX4_T163P* (c.487A>C, p.T163P)⁽²⁴⁾ และ *LHX4_L190R* (c.569T>G, p.L190R)⁽¹⁴⁾ โดยมีขั้นตอนการสร้างพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant ดังต่อไปนี้

2.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสร้างพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant

2.1.1 ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LHX4* (NM_033343.3) โดยใช้ NEBaseChanger ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์ออนไลน์ที่ผู้ผลิตชุดน้ำยาแนะนำ

2.1.2 สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์กับบริษัท ชีระเทรคดิง จำกัด โดยเลือกการ purify แบบ HPLC จำนวน 3 คู่

(1) ไพรเมอร์สำหรับสร้างพลาสมิด *LHX4_R122W* คือ LHX4_R122W_F และ LHX4_R122W_R

(2) ไพรเมอร์สำหรับสร้างพลาสมิด *LHX4_T163P* คือ LHX4_T163P_F และ LHX4_T163P_R

(3) ไพรเมอร์สำหรับสร้างพลาสมิด *LHX4_L190R* คือ LHX4_L190R_F และ LHX4_L190P_R

รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 2-4

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR (exponential amplification)

ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยใช้ pTracer-*LHX4*_WT-HA เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ข้อ 2.1.2 ปริมาณสารต่างๆ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ดังตารางที่ 7-8

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ *LHX4* ชนิด mutant

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (μ l)
Q5 Hot Start High-Fidelity	1X	12.5
2X Master Mix		
10 μ M Primer F	0.5 μ M	1.25
10 μ M Primer R	0.5 μ M	1.25
Template DNA (25 ng/ μ l)	25 ng/ 25 μ l	1
Nuclease-free water	-	9.0
Total volume	-	25

ตารางที่ 8 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ *LHX4* ชนิด mutant

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial Denaturation	98°C	30 วินาที
Denaturation	98°C	10 วินาที
Annealing	R122W T163P L190R 67°C 69°C 72°C	30 วินาที
Extension	72°C	3.30 นาที
Final Extension	72°C	2 นาที
Hold	4°C	∞

} ทำซ้ำ
25 รอบ

2.3 ทำ phosphorylation, ligation และ template removal

การทำ phosphorylation, ligation และ template removal คือ เติมหมู่ฟอสเฟตให้ ดีเอ็นเอด้วย Kinase จากนั้นเชื่อมดีเอ็นเอให้เป็นวงด้วย Ligase และกำจัดดีเอ็นเอต้นแบบด้วย *DpnI* ซึ่งขั้นตอนทั้ง 3 ขั้นตอนรวมอยู่ในปฏิกิริยาเดียวกันโดยใช้เอนไซม์ KLD ที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.1 เติมสารที่จะใช้ในการทำ phosphorylation, ligation และ template removal ลงในหลอด PCR ใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังตารางที่ 9 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์
คลุกขึ้นลง

2.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 9 สารเคมีที่ใช้ในการทำ phosphorylation, ligation และ template removal

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (μl)
PCR Product	-	1
2X KLD Reaction Buffer	1X	5
10X KLD Enzyme Mix	1X	1
Nuclease-free Water	-	3
<u>Total volume</u>	-	<u>10</u>

2.4 ทำ transformation เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli*

2.4.1 นำ NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำให้ละลายในน้ำแข็ง

2.4.2 เติม KLD mix จากข้อ 2.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli*

2.4.3 นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2.4.4 Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

2.4.5 นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

2.4.6 เติม SOC Outgrowth Medium ปริมาตร 950 ไมโครลิตร

2.4.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

2.4.8 เกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 เพลท คือ

- เพลทที่ 1 ใช้เชื้อปริมาณ 50 ไมโครลิตร

- เพลทที่ 2 ใช้เชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร

2.4.9 นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.4.10 เก็บเชื้อที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5 เลือกโคโลนีเดี่ยวมาเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Presto[™] Mini Plasmid Kit (Geneaid) เพื่อนำพลาสมิดไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

2.6 เตรียมพลาสมิดสำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing และวิเคราะห์ผล Sanger sequencing ปฏิบัติตามรายละเอียดข้อ 1.4 โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด

3 เส้น ได้แก่ LHX4_Check_WT_3'_F, LHX4_Check_WT_R และ LHX4_Check_MT_F
รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 1 และ 5

2.7 เพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยชุด Geneaid™ Maxi Plasmid Kit (Geneaid)

3. การสร้างพลาสมิด luciferase reporter

พลาสมิด luciferase reporter จะถูกสร้างขึ้นโดยการเชื่อมโปรโมเตอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของต่อมใต้สมองที่ถูกควบคุมโดยยีน *LHX4* เข้ากับเวกเตอร์ pGL4.10[luc2] โดยโปรโมเตอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นโปรโมเตอร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ของผู้ป่วย ได้แก่ โปรโมเตอร์ยีน *GHI* (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -446 to +20; NM_000515.4, NG_011676.1)⁽²⁴⁾, *POUIF1* (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -840 to +6; NM_000306.3, NG_008225.2)^(12, 24, 34) และ *TSHB* (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -1236 to +37; NM_000549.4, NG_015891.1)^(14, 20, 34) โดยตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ +1 เริ่มจาก transcription start site สุดท้ายจะได้พลาสมิด 3 ชนิด คือ pGL4.10[luc2]_GHI, pGL4.10[luc2]_POUIF1 และ pGL4.10[luc2]_TSHB ตามลำดับ ซึ่งมีขั้นตอนการสร้างพลาสมิด luciferase reporter ดังนี้

3.1 ออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์ที่ต้องการ

3.1.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์ที่ต้องการด้วยโปรแกรม Oligo Primer Design Software (Version 9.1) และ Oligo Calculator

3.1.2 ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการโดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

(1) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *GHI* คือ GHI_F และ GHI_R โดย PCR product จะมีขนาดประมาณ 478 bp

(2) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* คือ POUIF1_F และ POUIF1_R โดย PCR product จะมีขนาดประมาณ 858 bp

(3) ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *TSHB* คือ TSHB_BglIII_F และ TSHB_HindIII_R โดย PCR product จะมีขนาดประมาณ 1,293 bp

รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 6-8 ปริมาณสารต่างๆ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ดังตารางที่ 10-15

ตารางที่ 10 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *GHI*

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (μ l)
5X Phusion HF Buffer	1X	5
10 mM dNTPs	200 μ M	0.5
10 μ M GH1_F	0.5 μ M	1.25
10 μ M GH1_R	0.5 μ M	1.25
100% DMSO	3%	0.75
2 U/ μ l Phusion DNA Polymerase	1.0 units/ 50 μ l PCR	0.25
Nuclease-Free Water	-	14
50 ng/ μ l Template DNA	4 ng	2
Total volume	-	25

ตารางที่ 11 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *GHI*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial Denaturation	98°C	30 วินาที
Denaturation	98°C	10 วินาที
Annealing	70°C	30 วินาที
Extension	72°C	15 วินาที
Final Extension	72°C	10 นาที
Hold	4°C	∞

} ทำซ้ำ 35 รอบ

ตารางที่ 12 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *POU1F1*

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (μl)
5X Phusion HF Buffer	1X	5
10 mM dNTPs	200 μM	0.5
10 μM POU1F1_F	0.2 μM	0.5
10 μM POU1F1_R	0.2 μM	0.5
100% DMSO	3%	0.75
2 U/μl Phusion DNA Polymerase	1.0 units/ 50 μl PCR	0.25
Nuclease-Free Water	-	16.5
50 ng/μl Template DNA	2 ng	1
Total volume	-	25

ตารางที่ 13 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *POU1F1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial Denaturation	98°C	30 วินาที
Denaturation	98°C	10 วินาที
Annealing	71°C	30 วินาที
Extension	72°C	30 วินาที
Final Extension	72°C	10 นาที
Hold	4°C	∞

} ทำซ้ำ 35 รอบ

ตารางที่ 14 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *TSHB*

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (μl)
5X Phusion HF Buffer	1X	5
10 mM dNTPs	200 μM	0.5
10 μM TSHB_BglII_F	0.2 μM	0.5
10 μM TSHB_HindIII_R	0.2 μM	0.5
100% DMSO	3%	0.75
2 U/μl Phusion DNA Polymerase	1 units/25 μl PCR	0.5
Nuclease-Free Water	-	16.25
50 ng/μl Template DNA	2 ng	1
Total volume	-	25

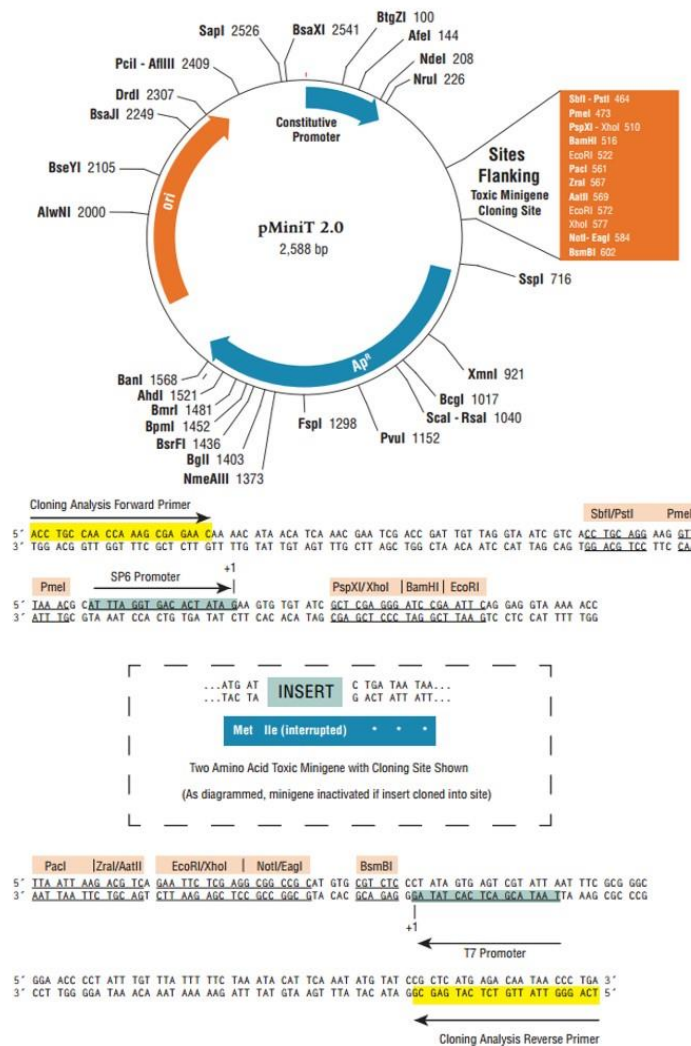
ตารางที่ 15 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณโปรโมเตอร์ของยีน *TSHB*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Initial Denaturation	98°C	30 seconds	
Denaturation	98°C	10 seconds	
Annealing	65°C	30 seconds	
Extension	72°C	10 seconds	
Final Extension	72°C	10 minutes	
Hold	4°C	∞	

3.2 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้เจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

3.3 ทำ ligation เพื่อเชื่อมโปรโมเตอร์ของยีนที่สนใจเข้ากับ pMiniT2.0 vector

ทำ ligation เพื่อเชื่อมโปรโมเตอร์ของยีนทั้ง 3 ยีนเข้ากับ pMiniT2.0 vector (รูปที่ 6) ด้วยชุด NEB PCR Cloning kit โดยใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังตารางที่ 16 จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่อง thermal cycler



รูปที่ 6 โครงสร้างและรายละเอียดของ pMiniT2.0 vector

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 16 สารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation เพื่อเชื่อมโปรโมเตอร์เข้ากับ pMiniT2.0 vector

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
Linearized pMiniT2.0 Vector	1
Insert: target promoter	1
H ₂ O	3
Cloning Mix 1	4
Cloning Mix 2	1
Total volume	10

- 3.4 ทำ transformation เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดใน *E. coli*
- 3.4.1 นำ NEB[®] 10-beta competent *E. coli* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งให้มากับชุด NEB[®] PCR Cloning kit มาละลายในน้ำแข็ง
 - 3.4.2 เติม ligation mixture ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน NEB[®] 10-beta competent *E. coli*
 - 3.4.3 นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
 - 3.4.4 Heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 - 3.4.5 นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
 - 3.4.6 เติม NEB[®] 10-beta Stable Outgrowth Medium ปริมาตร 950 ไมโครลิตร
 - 3.4.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที
 - 3.4.8 เกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 เพลท คือ
 - เพลทที่ 1 ใช้เชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร
 - เพลทที่ 2 ใช้เชื้อทั้งหมดโดยนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งให้เหลือประมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.4.9 นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 3.5 คัดเลือกโคลนที่มีซันดิเอ็นเอที่ต้องการ
- 3.5.1 เลือกโคโลนีเดี่ยวมาผสมกับ nuclease-free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากัน
 - 3.5.2 นำไปคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Cloning Analysis_F และ Cloning Analysis_R รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 9 ใช้ปริมาณสารต่างๆ อุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR ดังตารางที่ 17-18

ตารางที่ 17 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการ

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้ (μl)
10X <i>Taq</i> Buffer	1X	2
25 mM MgCl ₂	0.5 mM	2
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.4
10 μM Cloning Analysis_F	0.15 μM	0.3
10 μM Cloning Analysis_R	0.15 μM	0.3
<i>Taq</i> DNA Polymerase (Thermo Scientific)	0.025	0.1
Nuclease-Free Water	-	12.9
Single colony	-	2
Total volume	-	20

ตารางที่ 18 อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
Initial Denaturation	95°C	5 วินาที	
Denaturation	95°C	30 วินาที	} ทำซ้ำ 30 รอบ
Annealing	53°C	30 วินาที	
Extension	72°C	15 30 40 วินาที	
Final Extension	72°C	7 นาที	
Hold	15°C	∞	

3.5.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.6 เพิ่มปริมาณ โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)

3.7 คัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

- 3.7.1 ตรวจสอบโคลนที่คัดเลือกอีกครั้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bg*III และ *Hind*III โดยใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังตารางที่ 19
- 3.7.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3.7.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 19 สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
Plasmid (100 ng/μl)	2
10X NEBuffer: NEBuffer 3.1	2
Restriction Enzyme: <i>Hind</i> III (10U/μl)	1
Restriction Enzyme: <i>Bg</i> III (10U/μl)	1
Nuclease-Free water	14
Total volume	20

- 3.8 เตรียมพลาสมิดสำหรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing และวิเคราะห์ผล ปฏิบัติตามรายละเอียดข้อ 1.4 โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้
- pMiniT2.0_ *GHI* และ pMiniT2.0_ *POUIF1* ใช้ไพรเมอร์ T7promoter และ SP6 ซึ่งเป็น universal primers รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 10
 - pMiniT2.0_ *TSHB* ใช้ไพรเมอร์ T7promoter, SP6 และ pTSHB_Ter_F รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 10-11
- 3.9 เพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยชุดสกัด Geneaid™ Maxi Plasmid Kit (Geneaid) เพื่อใช้ในการ Subcloning
- 3.10 Subcloning เพื่อย้ายโปรโมเตอร์จาก pMiniT2.0 vector เข้าสู่ pGL4.10[*luc2*] vector
- 3.10.1 ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก pMiniT2.0 vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bg*III และ *Hind*III ทำโปรโมเตอร์ละ 10 หลอด โดยใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังตารางที่ 20 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

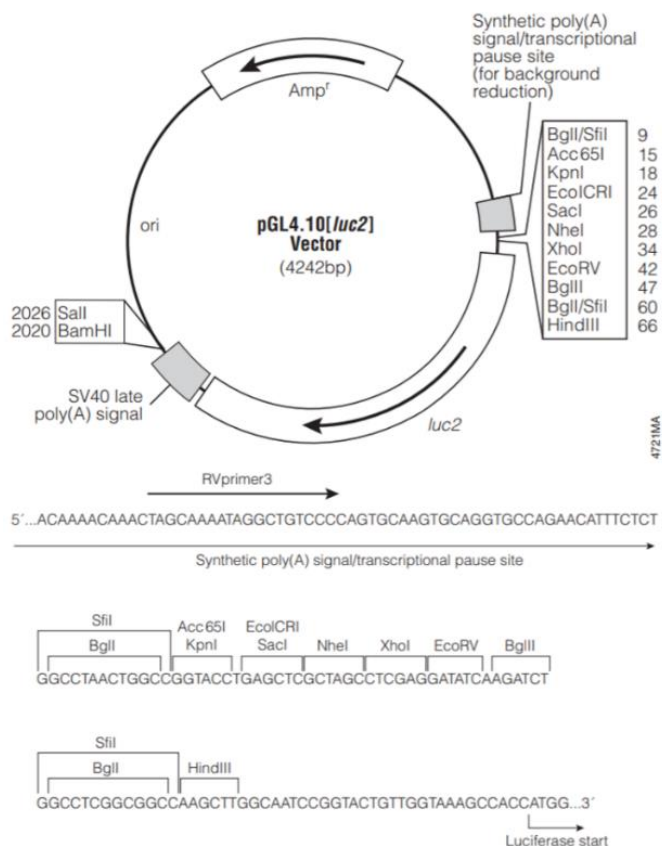
ตารางที่ 20 สารเคมีที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก pMiniT2.0 vector

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
Plasmid (100 ng/μl)	10
10X NEBuffer: NEBuffer 3.1	2
Restriction Enzyme: <i>Hind</i> III (10U/μl)	1
Restriction Enzyme: <i>Bgl</i> II (10U/μl)	1
Nuclease-Free water	6
Total volume	20

3.10.2 ตัด pGL4.10[*luc2*] vector (รูปที่ 7) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Hind*III เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ที่ต้องการ ทำโปรโมเตอร์ละ 4 หลอด โดยใช้ปริมาณสารต่างๆ ดังตารางที่ 21 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ตารางที่ 21 สารเคมีที่ใช้ในการตัด pGL4.10[*luc2*] vector

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
pGL4.10[<i>luc2</i>] vector (500 ng/μl)	2
10X NEBuffer: NEBuffer 3.1	2
Restriction Enzyme: <i>Hind</i> III (10U/μl)	1
Restriction Enzyme: <i>Bgl</i> II (10U/μl)	1
Nuclease-Free water	14
Total volume	20



รูปที่ 7 โครงสร้างและรายละเอียดของ pGL4.10[luc2] vector

3.10.3 ทำ dephosphorylation เพื่อป้องกันการเกิด recircularization ในขั้นตอน ligation โดยการนำ pGL4.10[luc2] vector ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมา treat ด้วย Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น Inactivate ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง thermal cycler

3.10.4 นำพลาสมิดทั้งหมดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Hind*III มาทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้เจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.11 สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัด GenepHlow™ Gel Extraction Kit (Geneaid) สำหรับโปรโมเตอร์ของยีน *GHI* และ *POU1F1* และชุดสกัด Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs) สำหรับโปรโมเตอร์ของยีน *TSHB*

3.12 ทำ ligation และ transformation เพื่อเชื่อมโปรโมเตอร์ที่สนใจเข้ากับ pGL4.10[luc2] vector

3.12.1 คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่จะใช้ในการทำ ligation โดยใช้โปรแกรม NEBioCalculator v1.8.1

3.12.2 ทำ ligation เพื่อเชื่อมโปรโมเตอร์เข้ากับ pGL4.10[luc2] vector โดยใช้ T4 DNA Ligase (New England BioLabs) และใช้อัตราส่วน insert : vector ดังนี้

3.4.1 *GHI* promoter : pGL4.10[luc2] vector เท่ากับ 7:1

3.4.2 *POU1F1* promoter : pGL4.10[luc2] vector เท่ากับ 7:1

3.4.3 *TSHB* promoter : pGL4.10[luc2] vector เท่ากับ 3:1

รายละเอียดของสารที่ใช้ในการทำ ligation ดังตารางที่ 22-24

ตารางที่ 22 สารเคมีที่ใช้ทำ ligation เพื่อเชื่อม *GHI* promoter กับ pGL4.10[luc2] vector

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
Linearized vector DNA: pGL4.10[luc2] vector (200 ng)	3.1
Insert DNA: <i>GHI</i> Promoter (157.8 ng)	16.6
10X T4 DNA Ligase Buffer	2.5
T4 DNA Ligase	2
Nuclease-Free water	0.8
Total volume	25

ตารางที่ 23 สารเคมีที่ใช้ทำ ligation เพื่อเชื่อม *POU1F1* promoter กับ pGL4.10 [luc2] vector

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
Linearized vector DNA: pGL4.10[luc2] vector (200 ng)	8
Insert DNA: <i>POU1F1</i> Promoter (283.2 ng)	15
10X T4 DNA Ligase Buffer	3
T4 DNA Ligase	2
Nuclease-Free water	2
Total volume	30

ตารางที่ 24 สารเคมีที่ใช้ทำ ligation เพื่อเชื่อม *TSHB* promoter กับ pGL4.10[*luc2*] vector

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
Linearized vector DNA: pGL4.10[<i>luc2</i>] vector (500 ng)	1.37
Insert DNA: <i>TSHB</i> Promoter (455.1 ng)	1.44
10X T4 DNA Ligase Buffer	0.5
T4 DNA Ligase	1
Nuclease-Free water	0.69
Total volume	5

3.12.3 นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- สำหรับ *GHI* และ *POU1F1* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง thermal cycler
- สำหรับ *TSHB* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.12.4 นำไป Inactivate ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง thermal cycler

3.13 ทำ transformation เพื่อเพิ่มปริมาณใน *E. coli* ปฏิบัติตามรายละเอียดข้อ 3.4

3.14 นำโคโลนีเดี่ยวมาเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)

3.15 คัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Hind*III ปฏิบัติตามรายละเอียดตามข้อ 3.7

3.16 เตรียมพลาสมิดสำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing และการวิเคราะห์ผล ปฏิบัติตามรายละเอียดตามข้อ 1.4 โดยใช้ไพรเมอร์ RVprimer3 ซึ่งเป็น universal primer และ pGL4.10(*luc2*)_R รายละเอียดไพรเมอร์ดังตารางที่ 6 ลำดับที่ 12

3.17 เพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Geneaid™ Maxi Plasmid DNA Kit (Geneaid) เพื่อใช้ในการทำ transfection

4. การเลี้ยงเซลล์และการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยการทำ transfection

เซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือเซลล์ Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) (ATCC® CCL-61™) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่าการใช้เซลล์ CHO ในการทำ luciferase activity assays ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าการใช้เซลล์ Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T)⁽²⁴⁾ และใน

การศึกษานี้จะใช้ X-tremeGENE™ 9 DNA Transfection Reagent (Roche) เป็น transfection reagent โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

- 4.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ CHO-K1 ซึ่งประกอบด้วย nutrient mixture F-12 media ที่เติม 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% v/v penicillin-streptomycin
- 4.1.2 เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงใน flask สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์มี pH ประมาณ 7.0-7.6
- 4.1.3 นำเซลล์ที่แช่แข็งมาทำให้ละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว (ใช้เวลาประมาณ 2 นาที) โดยให้ฝาหลอดอยู่เหนือน้ำเพื่อป้องกันการปนเปื้อน
- 4.1.4 เมื่อเซลล์ละลายแล้วให้เอาออกจาก water bath และเช็ดหลอดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- 4.1.5 คูดเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอดเข็นตริฟิวจขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 125 x g เป็นเวลา 5 นาที
- 4.1.6 คูดสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 4.1.7 เติมน้ำเซลล์ลงใน flask สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25) ที่เตรียมไว้ข้อ 4.1.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์

4.2 การ subculture เซลล์

- 4.2.1 คูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นเติม 1X dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ จากนั้นคูด DPBS ทิ้ง
- 4.2.2 เติมน้ำ 0.25% trypsin ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเซลล์หลุดดีหรือไม่
- 4.2.3 ใช้ปิเปตต์คูดเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวได้ดีขึ้น จากนั้นเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin

- 4.2.4 ดูดเซลล์ใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 125 x g เป็นเวลา 5 นาที
- 4.2.5 ดูดสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 4.2.6 เติมเซลล์ลง flask สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์
- 4.3 การเก็บรักษาเซลล์
- 4.3.1 เตรียม freezing media ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม 10% DMSO
- 4.3.2 ปฏิบัติตามขั้นตอนการ subculture เซลล์ข้อ 4.2.1-4.2.4
- 4.3.3 ดูดสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย freezing media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 4.3.4 นับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง Countess™ Automated Cell Counter ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
- 3.4.4 ผสมเซลล์ CHO-K1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับ trypan blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 นาที
- 3.4.5 หยดเซลล์ CHO-K1 ที่ผสมกับ trypan blue ปริมาตร 10 µl ลงบน Countess™ Cell Counting Chamber Slide
- 3.4.6 นำสไลด์เข้าเครื่อง Countess™ Automated Cell Counter ปรับโฟกัสให้ชัดเจน จากนั้นกด count cells บันทึกผล
- 4.3.5 เจือจางเซลล์ด้วย freezing media ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร
- 4.3.6 ดูดเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ cryotube ขนาด 1.8 ml นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- 4.4 การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยการทำให้ transfection
- 4.4.1 เตรียมเซลล์ CHO-K1 สำหรับทำ transfection โดยใช้ CHO-K1 cells ที่มี confluent ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์
- (1) ปฏิบัติตามขั้นตอนการ subculture เซลล์ข้อ 4.2.1-4.2.5
 - (2) นับจำนวนเซลล์โดยใช้เครื่อง Countess™ Automated Cell Counter
 - (3) เจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์ 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- (4) ดูดเซลล์ลงเพลทชนิด 12 หลุม หลุมละ 2 มิลลิลิตร (100,000 เซลล์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4.2 เตรียม Nucleic acid complex (DNA complex) ซึ่งประกอบด้วยพลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type (*LHX4*_WT) หรือชนิด mutant (*LHX4*_R122W, *LHX4*_T163P, *LHX4*_L190R) หรือพลาสมิด pTracer-CMV (empty vector) ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ผสมกับพลาสมิด luciferase reporter ที่มีโปรโมเตอร์ของยีน *GHI*, *POU1F1* หรือ *TSHB* ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร มีขั้นตอนดังนี้

- (1) เจือจางพลาสมิดให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
- (2) เตรียม DNA complex สำหรับทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำ รายละเอียดดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 การเตรียม DNA complex ที่ใช้ในการทำ transfection

จำนวนปฏิกิริยา	พลาสมิด ความเข้มข้น และปริมาณที่ใช้
1 ปฏิกิริยา	expression vector + luciferase reporter vector 200 ng + 200 ng = 400 ng 4 ul + 4 ul = 8 ul
3.2 ปฏิกิริยา	expression vector + luciferase reporter vector 640 + 640 ng = 1,280 ng 12.8 ul + 12.8 ul = 25.6 ul

สำหรับการทดลอง haploinsufficiency ให้เตรียม DNA complex ดังตารางที่ 25 แต่ในส่วนของการ expression vector ให้ใช้พลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม รวมกับพลาสมิดชนิด mutant หรือพลาสมิด pTracer-CMV (empty vector) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมแทน

4.4.3 เตรียม X-tremeGENE reagent โดยใช้อัตราส่วน reagent : DNA เท่ากับ 3:1 (reagent 3 μ l : DNA 1 μ g, reagent 1.2 μ l : DNA 400 μ l) รายละเอียดดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 การเตรียม X-tremeGENE reagent ที่ใช้ในการทำ transfection

จำนวนปฏิกิริยา	ปริมาณที่ใช้	
	X-tremeGENE™ 9 DNA Transfection Reagent	Nutrient Mixture F-12 Media
1 ปฏิกิริยา	1.2 µl	92 µl
3.2 ปฏิกิริยา	3.84 µl	294.4 µl

- 4.4.4 เติม X-tremeGENE reagent ลงหลอด Nucleic acid complex สำหรับทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำ หลอดละ 294.4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- 4.4.5 หยด X-tremeGENE reagent-Nucleic acid complex ลงเพลทเซลล์ CHO-K1 ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.1 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยหยดให้กระจายทั่วทั้งหลุม เขย่าเพลทเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 4.4.6 นำไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับ transcription และตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

5. การตรวจวัดการแสดงออกของยีนและการตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค Luciferase reporter assay โดยใช้ชุด Luciferase assay system (Promega) และ normalize luciferase activity ด้วยปริมาณ โปรตีน ทั้งหมด โดยใช้เทคนิค BCA Protein Assay ใช้ชุด Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) ทำการทดสอบแยกกันทั้งหมด 3 ครั้ง และแต่ละการทดสอบทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1 การเก็บเซลล์จากการทำ transfection และการทำให้เซลล์แตก

- 5.1.1 เตรียม 1X Passive Lysis Buffer (PLB) โดยเจือจาง 5X PLB ด้วยน้ำกลั่น ตัวอย่าง 1 ตัวอย่างจะใช้ 1X PLB ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
- 5.1.2 คุดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเพลทเซลล์ CHO-K1 ที่ทำ transfection เรียบร้อยแล้ว
- 5.1.3 ล้างเซลล์ด้วย 1X DPBS โดยค่อยๆ เติม 1X DPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ระวังไม่ให้เซลล์หลุด จากนั้นค่อยๆ คุดู 1X DPBS ที่

- 5.1.4 ทำให้เซลล์แตกโดยการเติม 1X PLB ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- 5.1.5 คูด lysate ใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งเพื่อนำไปทำ luciferase reporter assay และหาปริมาณ โปรตีนทั้งหมด หรือนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้
- 5.2 การทำ Luciferase reporter assay โดยใช้ชุด Luciferase assay system (Promega)
 - 5.2.1 เปิดเครื่อง SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader และเปิดโปรแกรม SoftMax Pro 5.4.1 เลือก Reporter Assays และ Dual-Glo Luciferase ที่แถบ Protocols จากนั้นตั้งค่า template เฉพาะ PlateA_Firefly
 - 5.2.2 เติมตัวอย่าง (PLB lysate) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลง 96-well plate white flat bottom หลุมละ 1 ตัวอย่าง ในแต่ละการทดลองจะต้องประกอบไปด้วย 1X PLB จำนวน 1 หลุม ซึ่งใช้สำหรับเป็น blank ในแต่ละการทดลอง
 - 5.2.3 เติม Luciferase Assay Reagent (LAR) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
 - 5.2.4 นำเพลทเข้าเครื่อง SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader กด Read ที่โปรแกรมเพื่อให้เครื่องอ่านค่า firefly luciferase ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จากนั้นกดบันทึกผล
- 5.3 การตรวจวัดปริมาณ โปรตีนทั้งหมดโดยใช้ชุด Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - 5.3.1 เปิดเครื่อง SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader และเปิดโปรแกรม SoftMax Pro 5.4.1 เลือก Protein Quant และ BCA ที่แถบ Protocols จากนั้นตั้งค่า template เลือกชนิดของเพลท และเลือกความยาวคลื่นที่ 562 นาโนเมตร
 - 5.3.2 เตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) Standard โดยใช้หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร รายละเอียดดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 การเตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) Standard

หลอด	ปริมาตร PLB	ปริมาตรและที่มาของ BSA	ความเข้มข้นสุดท้าย
A	0 µl	300 µl จาก BSA stock	2000 µg/ml
B	125 µl	375 µl จาก BSA stock	1500 µg/ml
C	325 µl	325 µl จาก BSA stock	1000 µg/ml
D	175 µl	175 µl จากหลอด B	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl จากหลอด C	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl จากหลอด E	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl จากหลอด F	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl จากหลอด G	25 µg/ml
I	400 µl	0 µl	0 µg/ml = Blank

5.3.3 เตรียม Working Reagent (WR) โดยการผสม BCA Reagent A 50 ส่วน กับ BCA Reagent B 1 ส่วน (ตัวอย่างเช่น ผสม Reagent A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ Reagent B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) เมื่อผสมเรียบร้อยแล้วจะได้สารละลายสีเขียว

5.3.4 เติม Standard และตัวอย่าง (PLB lysate) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลง 96-well plate clear flat bottom (Greiner) หลุมละ 1 ตัวอย่าง

5.3.5 เติม WR ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย plate shaker เป็นเวลา 30 วินาที

5.3.6 ปิดฝาเพลทด้วย Sealing film นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.3.7 นำเพลทเข้าเครื่อง SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader กด Read ที่โปรแกรม จากนั้นกดบันทึกผล

5.4 การคำนวณค่า Relative Luciferase Activity

5.4.1 คำนวณค่า Relative Luciferase Activity จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Relative Luciferase Activity} = \frac{\text{Firefly Relative luminometer units (RLU)}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ng/20 µl)}}$$

5.4.2 นำค่า Relative Luciferase Activity ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบในแต่ละการทดลอง และนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษานี้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 และใช้ independent samples t-test ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ Relative Luciferase Activity ในแต่ละการทดลอง โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ($P < 0.01$)



บทที่ 4

ผลการวิจัย

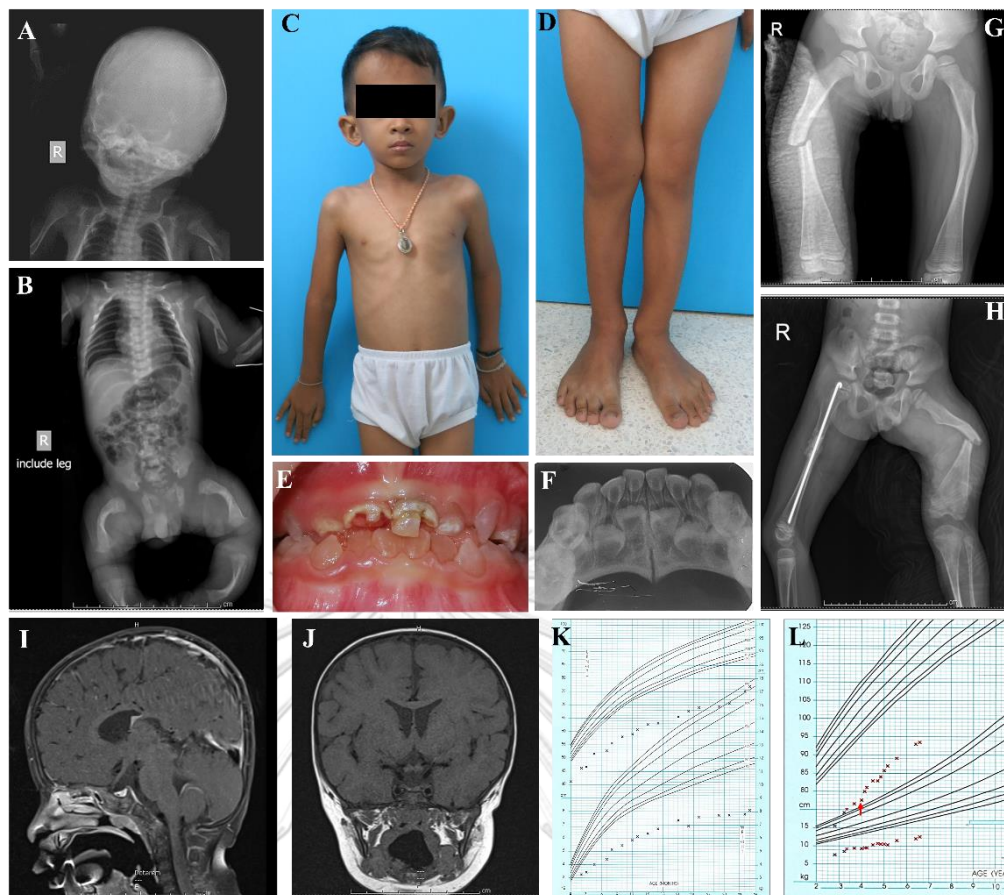
1. ข้อมูลของผู้ป่วย

1.1 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

ผู้ป่วยเป็นเพศชาย สัญชาติไทย คลอดตามกำหนดตอนอายุครรภ์ 37 สัปดาห์ โดยการผ่าตัดคลอด (cesarean section) เนื่องจากทารกไม่กลับหัว คลอดโดยการเอาก้นออก (breech presentation) มีภาวะเจริญเติบโตช้าในครรภ์แบบไม่ได้สัดส่วน (asymmetrical IUGR) และมีภาวะน้ำคร่ำน้อยกว่าปกติ (oligohydramnios) น้ำหนักแรกเกิด 1,840 กรัม (น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 3) ความยาว 41 เซนติเมตร (น้อยกว่าเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 3) เส้นรอบศีรษะ (head circumference) ยาว 32 เซนติเมตร (เปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25-50) แรกเกิดพบกระดูกต้นแขนซ้ายซ้ายหัก (left humerus) กระดูกหน้าแข้ง (tibia) และกระดูกต้นขา (femur) โค้งงอมากกว่าปกติ (รูปที่ 8A-B) หน้าผากโหนก (frontal bossing) และตาขาวมีสีฟ้าอ่อน (blue sclerae) นอกจากนี้ยังพบภาวะติดเชื้อในทารกแรกเกิด (neonatal sepsis) อาการชัก (seizure) และภาวะหายใจลำบาก (respiratory distress) โดยพบชายโครงบานขณะหายใจเข้า (subcostal retraction) และผนังทรวงอกเสถียร (chest wall instability) ผู้ป่วยเริ่มเดินได้เมื่ออายุ 2 ปี แต่มีลักษณะการเดินที่ผิดปกติ เมื่ออายุ 3 ปี พบภาวะกระดูกหน้าอกและซี่โครงโป่งยื่นออกมาคล้ายอกไก่ (pectus carinatum) ดังรูปที่ 8C และพบเท้าแบน (flat feet) ดังรูปที่ 8D ผู้ป่วยเริ่มมีฟันขึ้นเมื่ออายุ 1 ปี และเมื่ออายุ 4 ปี เริ่มพบความผิดปกติของฟันโดยพบภาวะ dentinogenesis imperfecta (DI) ดังรูปที่ 8E-F ผลตรวจการมองเห็นและการได้ยินเป็นปกติ จากลักษณะทางคลินิกดังกล่าวแพทย์จึงวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรค OI ชนิดที่ 3 ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการให้ pamidronate (7.2 mg/kg/year IV) ทุกๆ 2 เดือน ตั้งแต่อายุได้ 2 เดือน หลังจากให้การรักษาด้วย pamidronate พบว่า bone mineral density (BMD) มีค่าสูงขึ้นร้อยละ 42.9 โดยครั้งแรกตรวจเมื่ออายุ 1 ปี 7 เดือน มีค่า BMD เท่ากับ 0.343 g/cm^2 ($<-3\text{SD}$) ครั้งล่าสุดตรวจเมื่ออายุ 4 ปี 7 เดือน มีค่า BMD เท่ากับ 0.491 g/cm^2 (-2SD) ระหว่างการรักษาผู้ป่วยมีประวัติกระดูกหักสองครั้งจากการล้ม คือ เมื่ออายุ 5 ปี 11 เดือน กระดูกต้นขาข้างขวา (right femur) หัก และเมื่ออายุ 6 ปี 2 เดือน กระดูกต้นขาข้างซ้าย (left femur) หัก ดังรูปที่ 8G-H

นอกจากลักษณะทางคลินิกที่กล่าวมาแล้วยังพบว่าผู้ป่วยมีส่วนสูงที่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนของผู้ป่วยเมื่ออายุ 3 ปี 5 เดือนพบว่าผู้ป่วยมีระดับ FT4, IGF1, IGFBP3 และ GH หลังจากการกระตุ้นต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ในขณะที่ระดับ TSH, ACTH และ cortisol อยู่ในเกณฑ์ปกติ รายละเอียดดังตารางที่ 28 ผลจากการทำ MRI พบว่าต่อมใต้สมองและก้านของต่อมใต้สมองมีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ (hypoplasia of pituitary gland and stalk) ดังรูปที่ 8I-J จากข้อมูลดังกล่าวแพทย์จึงวินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีภาวะพร่องโกรทฮอร์โมนและไทรอยด์ฮอร์โมน ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยให้ growth hormone (Norditropin[®] 0.3 mg/day subcutaneous) และ thyroid hormone (Eltroxin, 25 ug/day) ตั้งแต่อายุ 3 ปี 9 เดือน ซึ่งผู้ป่วยตอบสนองต่อการรักษาได้ดีดังจะเห็นได้จากกราฟแสดงเกณฑ์อ้างอิงการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 8K-L และตารางที่ 28

ผู้ป่วยเป็นลูกชายคนเดียว ขณะที่ตั้งครรภ์แม่และพ่ออายุ 31 ปี มีสุขภาพดี ไม่มี ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ แม่มีความสูง 159 เซนติเมตร ส่วนพ่อมีความสูง 164.8 เซนติเมตร ผลการตรวจวัดระดับฮอร์โมนของพ่อเมื่ออายุ 38 ปี พบว่าระดับของ IGF1, FT4, TSH และ FSH อยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่วนระดับ testosterone สูงกว่าค่ามาตรฐาน แต่ไม่พบปัญหาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์



รูปที่ 8 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย โดย A และ B แสดงการหักของกระดูกต้นแขนข้างซ้าย (left humerus) และการโค้งของกระดูกหน้าแข้ง (tibia) และกระดูกต้นขา (femur) ตั้งแต่แรกเกิด, C แสดงภาวะกระดูกหน้าอกและซี่โครงโป่งยื่นออกมาคล้ายอกไก่ (pectus carinatum), D แสดงลักษณะเท้าแบน (flat feet), E และ F แสดงความผิดปกติของฟันและภาวะ dentinogenesis imperfecta (DI), G แสดงการหักของกระดูกต้นขาข้างขวา (right femur) เมื่ออายุ 5 ปี 11 เดือน, H แสดงการหักของกระดูกต้นขาข้างซ้าย (left femur) เมื่ออายุ 6 ปี 2 เดือน, I และ J ผล MRI แสดงต่อมใต้สมองและก้านของต่อมใต้สมองที่พัฒนาไม่สมบูรณ์ (hypoplasia of pituitary gland and stalk), K กราฟแสดงเกณฑ์อ้างอิงการเจริญเติบโตตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 3 ปี, L กราฟแสดงเกณฑ์อ้างอิงการเจริญเติบโตตั้งแต่อายุ 3 ปีจนถึง 6 ปี 7 เดือน ลูกศรสีแดงระบุช่วงที่เริ่มรักษาโดยการให้ฮอร์โมนทดแทน

ตารางที่ 28 ระดับฮอร์โมนของผู้ป่วย

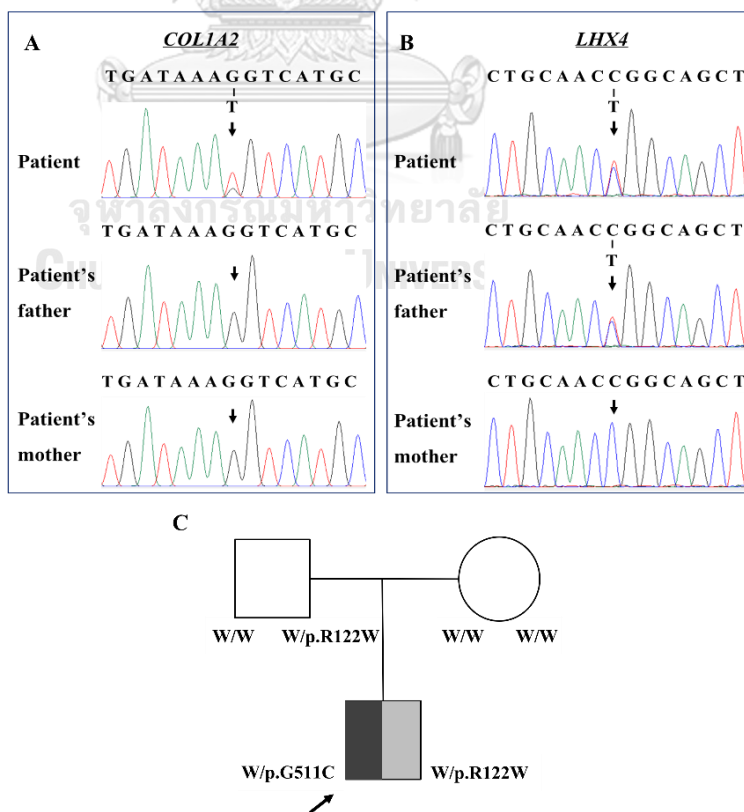
Hormone	Age		
	3 years 5 months	3 years 6 months	6 years 10 months
TSH (uIU/mL)	4.3 (0.7-6.0)	5.09 (0.7-6.0)	-
FT4 (ng/dL)	0.51 (1.0-1.8) *	0.62 (1.0-1.8) *	1.77 (1.0-1.7)
IGF1 (ng/mL)	<25 (22-229) *	-	79.6 (47-275)
IGFBP3 (ug/mL)	0.9 (0.9-4.3)	-	-
GH stimulation test (ng/mL)	-	0.50 [1] (>10) *	-
		0.66 [2] (>10) *	
		0.88 [3] (>10) *	
		0.85 [4] (>10) *	
		1.01 [5] (>10) *	
Cortisol (ug/dL) (morning)	4.2 (normal 5-25) *	6.2 [1] (7-25) *	-
		16.6 [2] (7-25)	
ACTH (pg/mL)	-	29.9(7.2-63)	-

ค่าในวงเล็บคือค่าปกติ ส่วน * แสดงค่าที่ต่ำกว่าเกณฑ์ปกติ

1.2 ข้อมูลทางพันธุกรรมของผู้ป่วย

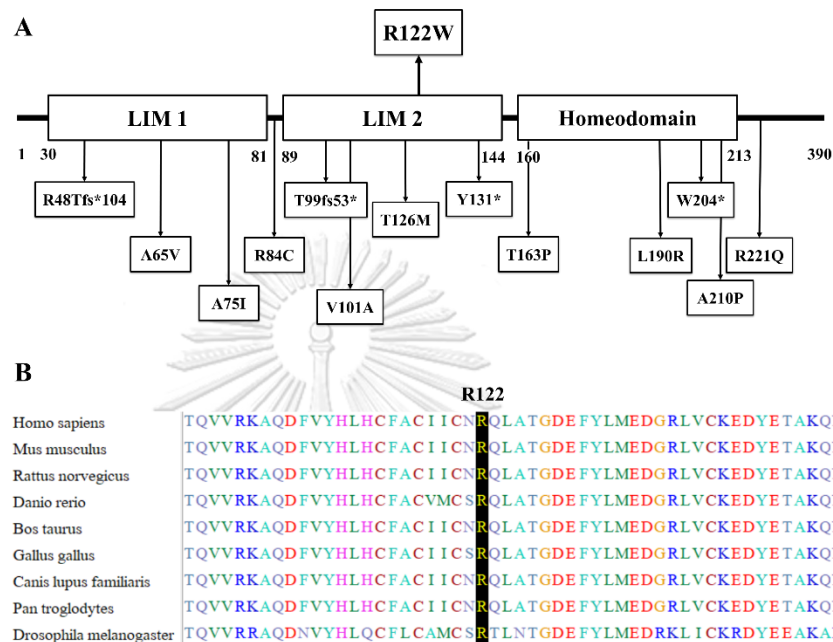
การตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมโดยการทำ whole exome sequencing จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยและการทำ Sanger sequencing จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยและพ่อแม่ของผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยมีความผิดปกติในยีน *COL1A2* ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค OI ความผิดปกตินี้เป็นแบบ heterozygous missense ชนิด p.G511C (c.1531G>T) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1,531 จากกวานีน (guanine) เปลี่ยนเป็นไทมีน (thymine) ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 511 เปลี่ยนจากไกลซีน (glycine) เป็นซิสเทอีน (cysteine) โดยไม่พบความผิดปกติในพ่อแม่และผู้ป่วย (*de novo* mutation) ดังรูปที่ 9A และการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน (novel mutation) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W (c.364C>T) แบบ heterozygous missense ในยีน *LHX4* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญ

ในการพัฒนาต่อมได้สมองและระบบประสาท และเคยมีรายงานว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค CPHD การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสใน exon 3 ที่ตำแหน่ง 364 จากไซโตซีน (cytosine) เปลี่ยนเป็นไทมีน (thymine) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 122 จากกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) นอกจากนี้จะพบการเปลี่ยนแปลงนี้ในผู้ป่วยแล้วยังพบการเปลี่ยนแปลงนี้ในพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรงด้วย ดังรูปที่ 9B การเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W เกิดขึ้นบริเวณ LIM2 domain ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของโปรตีน LHX4 ดังรูปที่ 10A-B การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ไม่พบในฐานข้อมูล Thai WES จำนวน 1,876 คน แต่พบในฐานข้อมูลของ ExAC จำนวน 1 อัลลีลใน 121,208 อัลลีล ซึ่งพบในคนที่มีสุขภาพดี และยังไม่เคยมีการศึกษาและการรายงานที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมามาก่อน การทำนายผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 ชนิดของซอฟต์แวร์ SIFT, PolyPhen-2 และ M-CAP พบว่าให้ผลเป็นไปในทางเดียวกันคือการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 ชนิดนี้อาจส่งผลกระทบต่อทำให้เกิดโรคได้ พงสาวรีของครอบครัวผู้ป่วยดังรูปที่ 9C



รูปที่ 9 ผล Sanger sequencing และพงสาวรี (pedigree) ของผู้ป่วยและครอบครัว

A แสดงการเปลี่ยนแปลงชนิด p.G511C (c.1531G>T) ในยีน *COL1A2*, B แสดงการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W (c.364C>T) ในยีน *LHX4*, C แสดงพงศาวรีของครอบครัวผู้ป่วย โดยสัญลักษณ์สีดำแทนโรค OL, สีเทาแทนโรค CPHD, สีขาวแทนสุขภาพดี, ลูกศรแทนผู้ป่วย และ W แทนอัลลีลชนิด wild type



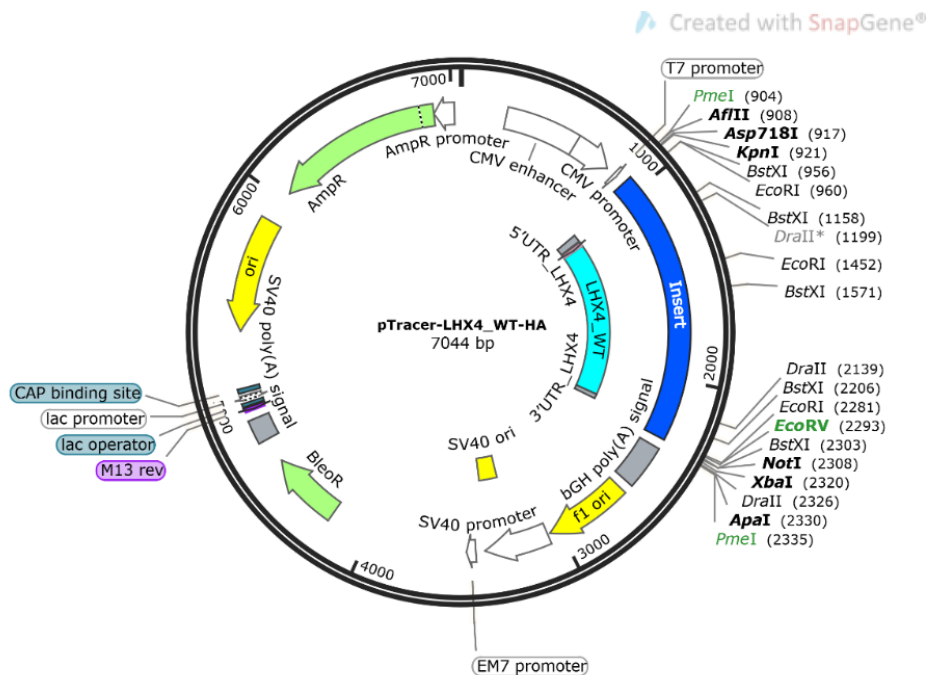
รูปที่ 10 ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W โดย A เป็นแผนภาพแสดงโดเมนของโปรตีน LHX4 ด้านบนคือการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนด้านล่างประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรค CPHD ที่เคยมีการศึกษาการทำงานแล้ว, B แสดงผลการ alignment ของโปรตีน LHX4 ในสปีชีส์ต่างๆ ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region)

2. การตรวจสอบพลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type

ผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type (pTracer-*LHX4*_WT-HA) ด้วยเทคนิค Sanger sequencing พบว่าพลาสมิด pTracer-*LHX4*_WT-HA มี insert ขนาด 1,376 bp เชื่อมกับ pTracer-CMV vector โดย insert ประกอบด้วย

- cDNA ของยีน *LHX4* ขนาด 1,173 bp
- 3'-UTR และ 5'-UTR ของยีน *LHX4*
- HA-Tag

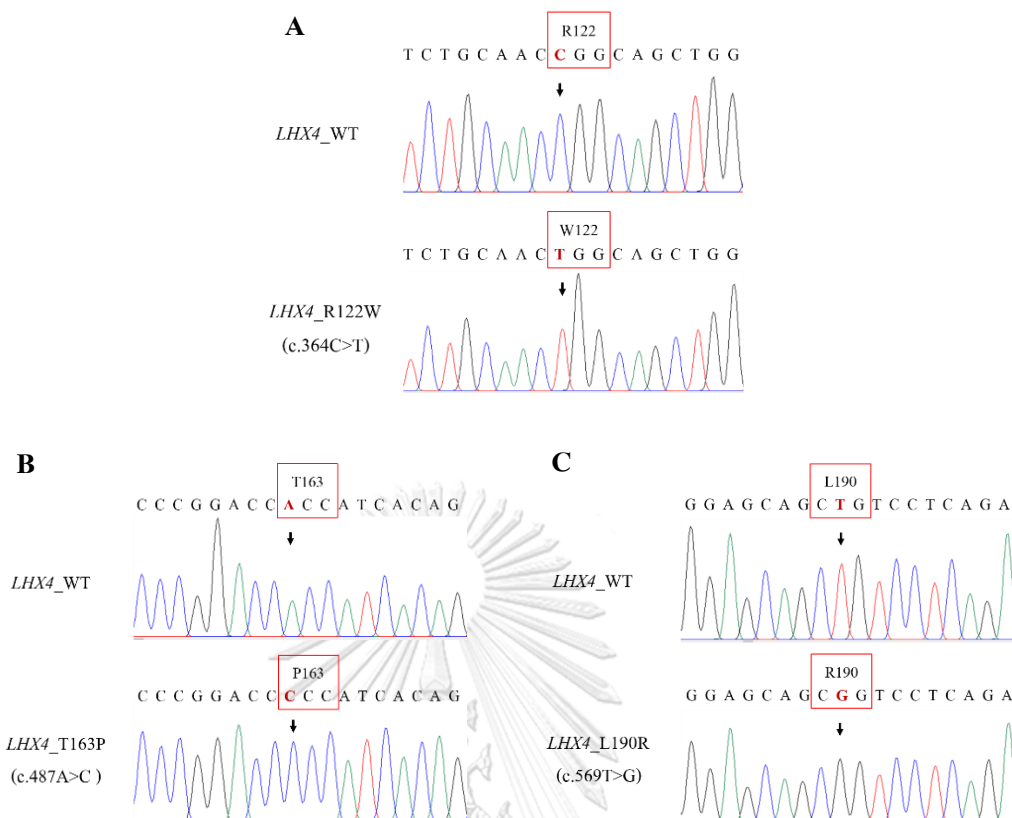
รายละเอียดดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 โครงสร้างและรายละเอียดของ pTracer-LHX4_WT-HA

3. การสร้างพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant

พลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant ถูกสร้างขึ้น โดยใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ซึ่งประกอบด้วยพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant ที่ต้องการศึกษา คือ *LHX4*_R122W (c.364C>T, p.R122W) และพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant ที่ใช้สำหรับควบคุมการทดลอง 2 ชนิด ได้แก่ *LHX4*_T163P (c.487A>C, p.T163P) และ *LHX4*_L190R (c.569T>G, p.L190R) พลาสมิด ทั้ง 3 ชนิดถูกส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing รายละเอียดผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังรูปที่ 12 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบตำแหน่งที่ต้องการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant กับพลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด *LHX4* ชนิด mutant เปรียบเทียบกับพลาสมิด *LHX4* ชนิด wild type โดย A คือ mutant ชนิด p.R122W, B คือ mutant ชนิด p.T163P และ C คือ mutant ชนิด p.L190R

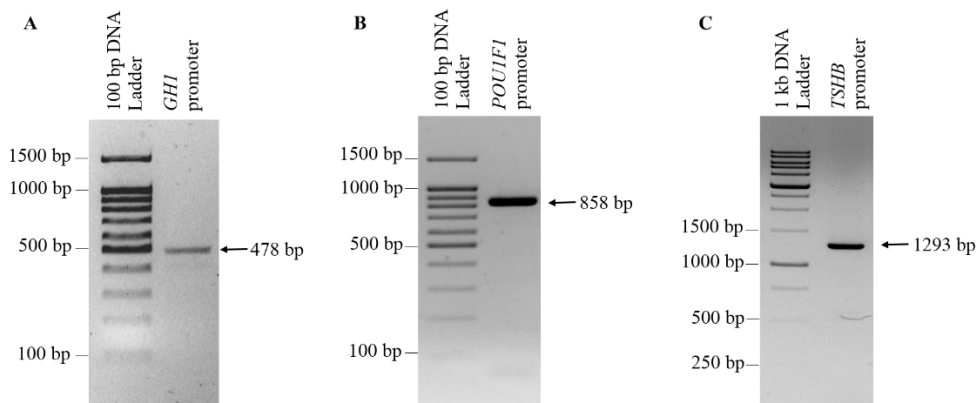
4. การสร้างพลาสมิด luciferase reporter

4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์

โปรโมเตอร์ของยีน *GHI*, *POUIF1* และ *TSHB* ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยขนาดของโปรโมเตอร์ของยีนที่ต้องการมีขนาดดังนี้

- โปรโมเตอร์ของยีน *GHI* มีขนาดประมาณ 478 bp
- โปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* มีขนาดประมาณ 858 bp
- โปรโมเตอร์ของยีน *TSHB* มีขนาดประมาณ 1,293 bp

รายละเอียดดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบขนาดของโปรโมเตอร์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดย A คือ โปรโมเตอร์ *GHI*, B คือ โปรโมเตอร์ *POU1F1* และ C คือ โปรโมเตอร์ *TSHB*

4.2 การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการที่เชื่อมต่อกับ pMiniT2.0 vector

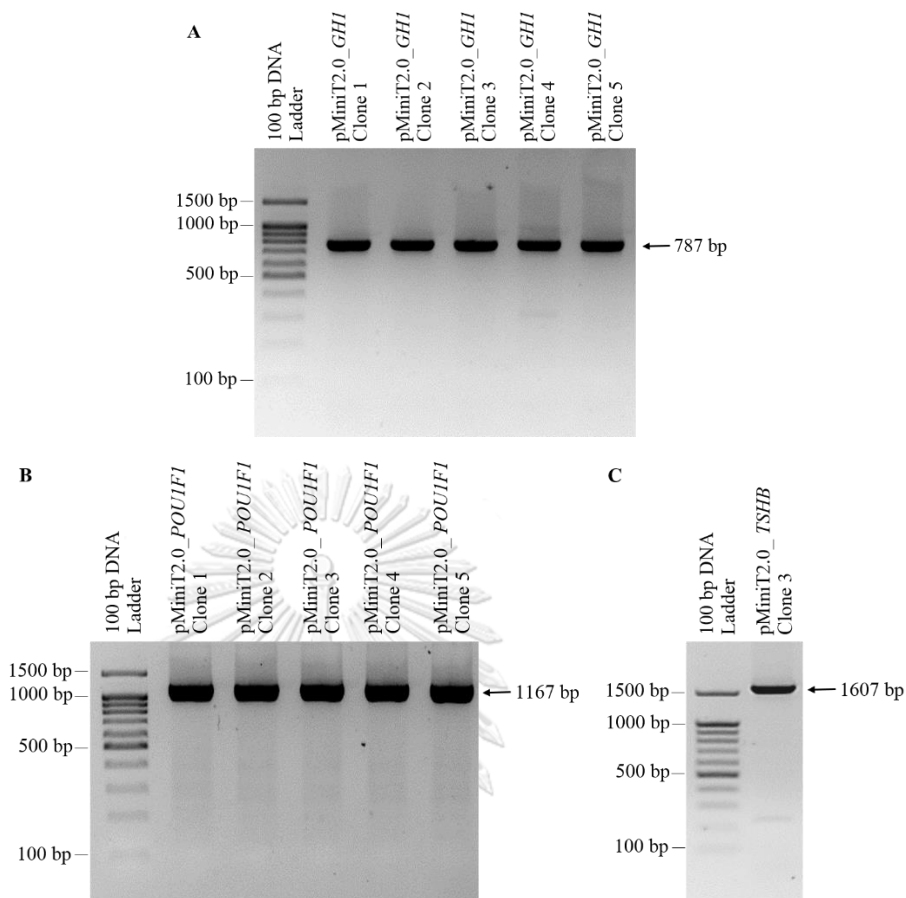
โปรโมเตอร์ของยีน *GHI*, *POU1F1* และ *TSHB* ที่เชื่อมต่อกับ pMiniT2.0 vector จะถูกคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.2.1 การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

Cloning Analysis_F และ Cloning Analysis_R ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมีขนาดดังนี้

- pMiniT2.0_ *GHI* มีขนาดประมาณ 787 bp
- pMiniT2.0_ *POU1F1* มีขนาดประมาณ 1,167 bp
- pMiniT2.0_ *TSHB* มีขนาดประมาณ 1,607 bp

โคลนของ pMiniT2.0_ *GHI* และ pMiniT2.0_ *POU1F1* ถูกคัดเลือกมาอย่างละ 5 โคลน เมื่อนำมาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทั้งหมด 5 โคลน ส่วนโคลนของ pMiniT2.0_ *TSHB* ถูกคัดเลือกมา 3 โคลน แต่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพียง 1 โคลน รายละเอียดดังรูปที่ 14

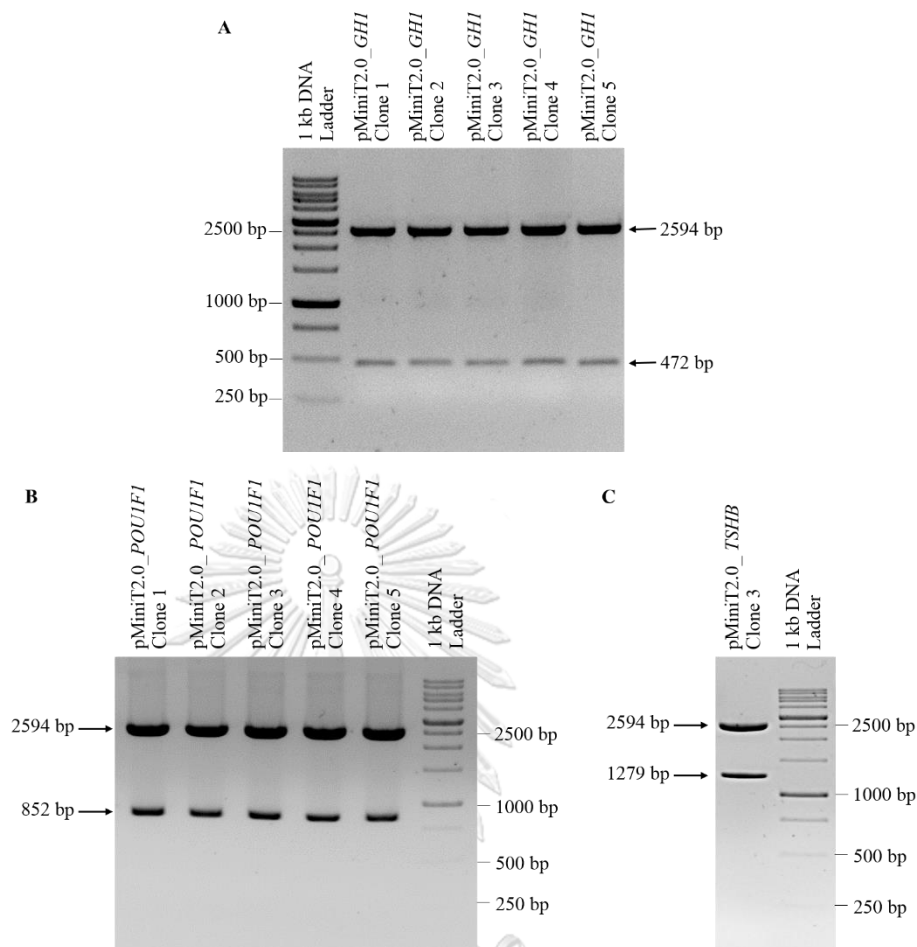


รูปที่ 14 ผลการคัดเลือกโคลนที่เชื่อม pMiniT2.0 vector เข้ากับโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดย A คือ โปรโมเตอร์ *GHI*, B คือ โปรโมเตอร์ *POUIF1* และ C คือ โปรโมเตอร์ *TSHB*

4.2.2 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BgIII* และ *HindIII* โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมีขนาดดังนี้

- pMiniT2.0_ *GHI* มีขนาดประมาณ 2,594 bp และ 472 bp
- pMiniT2.0_ *POUIF1* มีขนาดประมาณ 2,594 bp และ 852 bp
- pMiniT2.0_ *TSHB* มีขนาดประมาณ 2,594 bp และ 1,279 bp

เมื่อนำพลาสมิด pMiniT2.0_ *GHI* และ pMiniT2.0_ *POUIF1* ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR มาคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่า มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทั้งหมด 5 โคลน ส่วนพลาสมิด pMiniT2.0_ *TSHB* มีเพียง 1 โคลนเท่านั้นที่ผ่านการคัดเลือก รายละเอียดดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลการคัดเลือกโคลนที่เชื่อม pMiniT2.0 vector เข้ากับโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Hind*III โดย A คือ โปรโมเตอร์ *GHI*, B คือ โปรโมเตอร์ *POU1F1* และ C คือ โปรโมเตอร์ *TSHB*

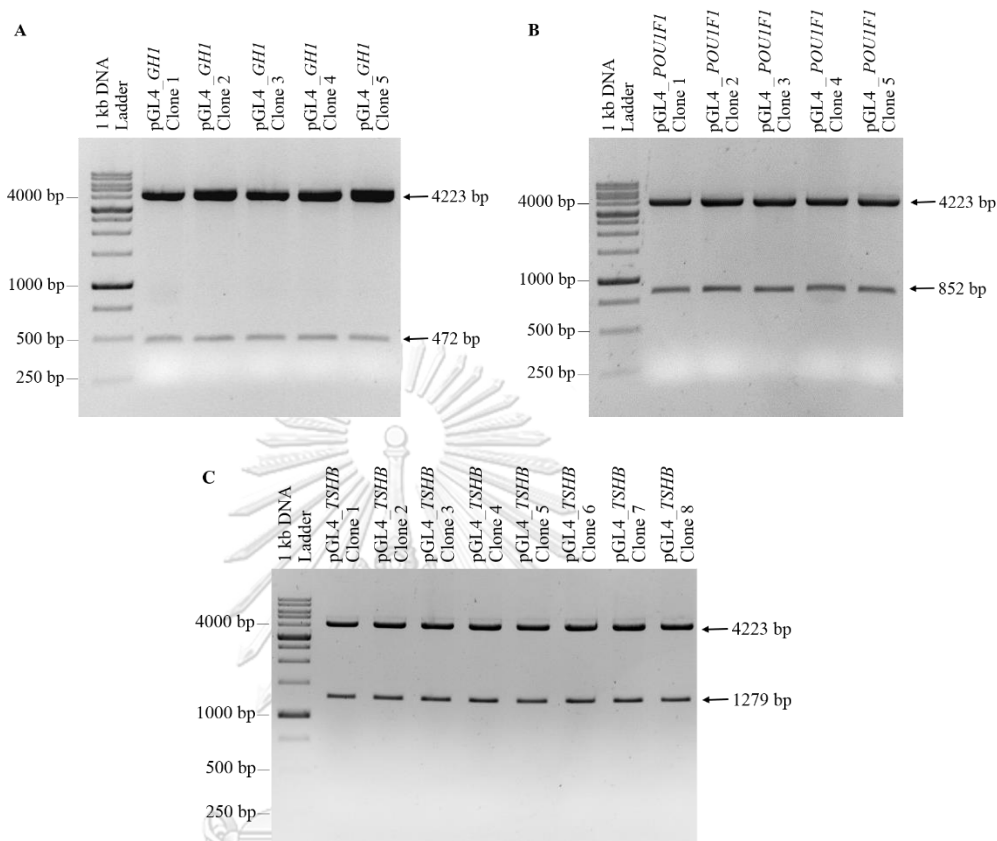
4.3 การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการที่เชื่อมต่อกับ pGL4.10[*luc2*] vector

พลาสมิดที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *GHI*, *POU1F1* หรือ *TSHB* ที่เชื่อมต่อกับ pGL4.10[*luc2*] vector ถูกคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bgl*III และ *Hind*III โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมีขนาดดังนี้

- pGL4.10[*luc2*]_{GHI} มีขนาดประมาณ 4,223 bp และ 472 bp
- pGL4.10[*luc2*]_{POU1F1} มีขนาดประมาณ 4,223 bp และ 852 bp
- pGL4.10[*luc2*]_{TSHB} มีขนาดประมาณ 4,223 bp และ 1,279 bp

เมื่อนำพลาสมิด pGL4.10[*luc2*]_{GHI} และ pGL4.10[*luc2*]_{POU1F1} ชนิดละ 5 โคลน มาคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการทั้งหมด ส่วนพลาสมิด

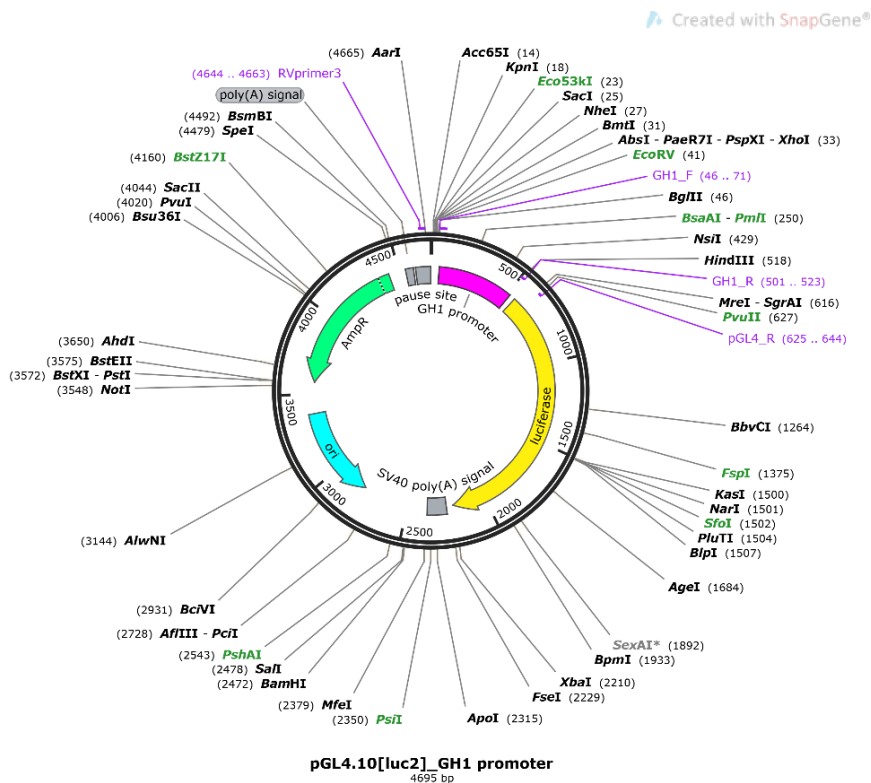
pGL4.10[*luc2*]*_TSHB* ถูกนำมาคัดเลือกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 8 โคลน พบว่า พลาสมิดทั้ง 8 โคลนมีชั้นดีเอ็นเอที่ต้องการ รายละเอียดดังรูปที่ 16



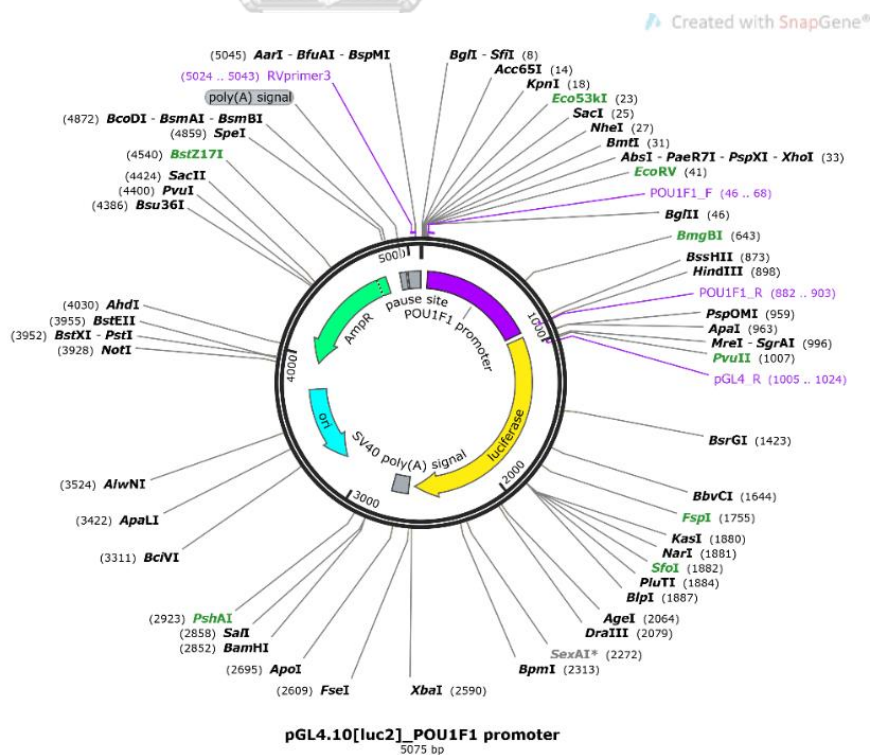
รูปที่ 16 ผลการคัดเลือกโคลนที่เชื่อม pGL4.10[*luc2*] vector เข้ากับโปรโมเตอร์ที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Hind*III โดย A คือ โปรโมเตอร์ *GHI*, B คือ โปรโมเตอร์ *POU1F1* และ C คือ โปรโมเตอร์ *TSHB*

4.4 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด Luciferase reporter

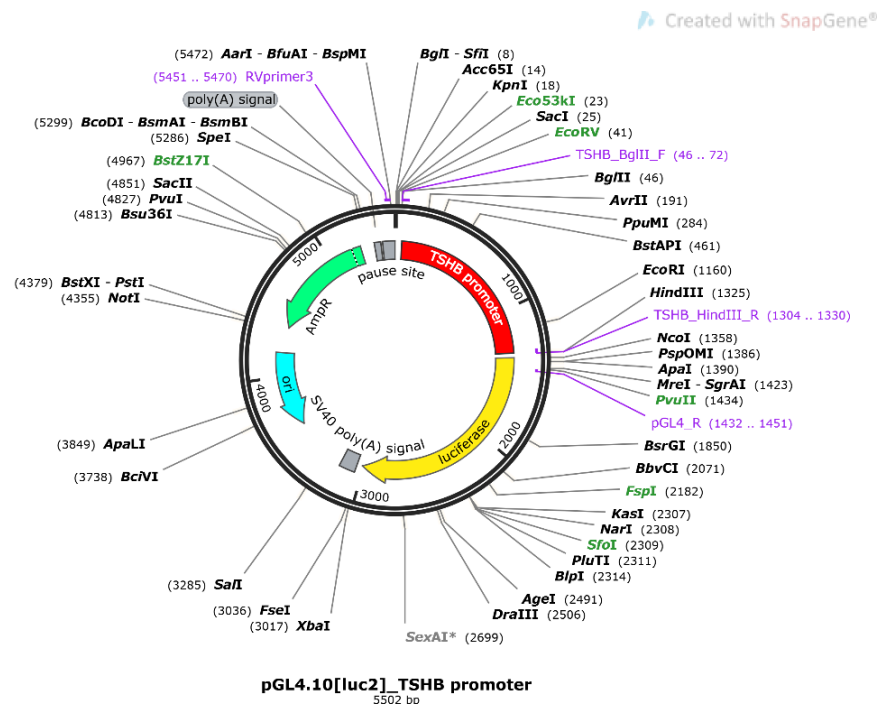
พลาสมิดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ pGL4.10[*luc2*]*_GHI*, pGL4.10[*luc2*]*_POU1F1* และ pGL4.10[*luc2*]*_TSHB* ที่ผ่านการคัดเลือกโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing จากนั้นวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิดด้วยโปรแกรม SnapGene® Viewer 3.3.3 โดยมีรายละเอียดดังรูปที่ 17-19



รูปที่ 17 แบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิด pGL4.10[luc2]_GH1



รูปที่ 18 แบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิด pGL4.10[luc2]_POU1F1



รูปที่ 19 แบบจำลองโครงสร้างของพลาสมิด pGL4.10[luc2]_TSHB

5. การตรวจวัดการแสดงออกของยีนและการตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

เซลล์ CHO-K1 ถูกนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยการทำ transfection เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมงถูกนำมาตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ด้วยเทคนิค Luciferase reporter assay และ normalize luciferase activity ด้วยปริมาณ โปรตีนทั้งหมดโดยใช้เทคนิค BCA Protein Assay ผลการทดลองพบว่าโปรตีน LHX4 ชนิด mutant ที่ต้องการศึกษา คือ p.R122W และโปรตีน LHX4 ชนิด mutant ซึ่งเป็นตัวควบคุมการทดลองที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ 2 ชนิด ได้แก่ p.T163P และ p.L190R มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *GHI*, *POUIF1* และ *TSHB* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type รายละเอียดดังตารางที่ 29-30 และรูปที่ 20 ซึ่งผลการทดลองในส่วน of ตัวควบคุม ได้แก่ p.T163P และ p.L190R ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้^(14, 24)

การทดลอง haploinsufficiency พบว่าโปรตีน LHX4 ชนิด wild type ร่วมกับชนิด mutant ทั้ง 3 ชนิด (WT+R122W, WT+T163P และ WT+L190R) ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน LHX4 ชนิด wild type ร่วมกับ

empty pTracer-CMV expression vector (WT+EV) ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานที่ผิดปกติของโปรตีน LHX4 ชนิด p.R122W ไม่ได้เกิดจาก dominant negative effect แต่เกิดจากการที่โปรตีน LHX4 ชนิด p.R122W มีความสามารถในการทำงานลดลง (loss of functions) แบบ haploinsufficiency ดังตารางที่ 29-30 และรูปที่ 20

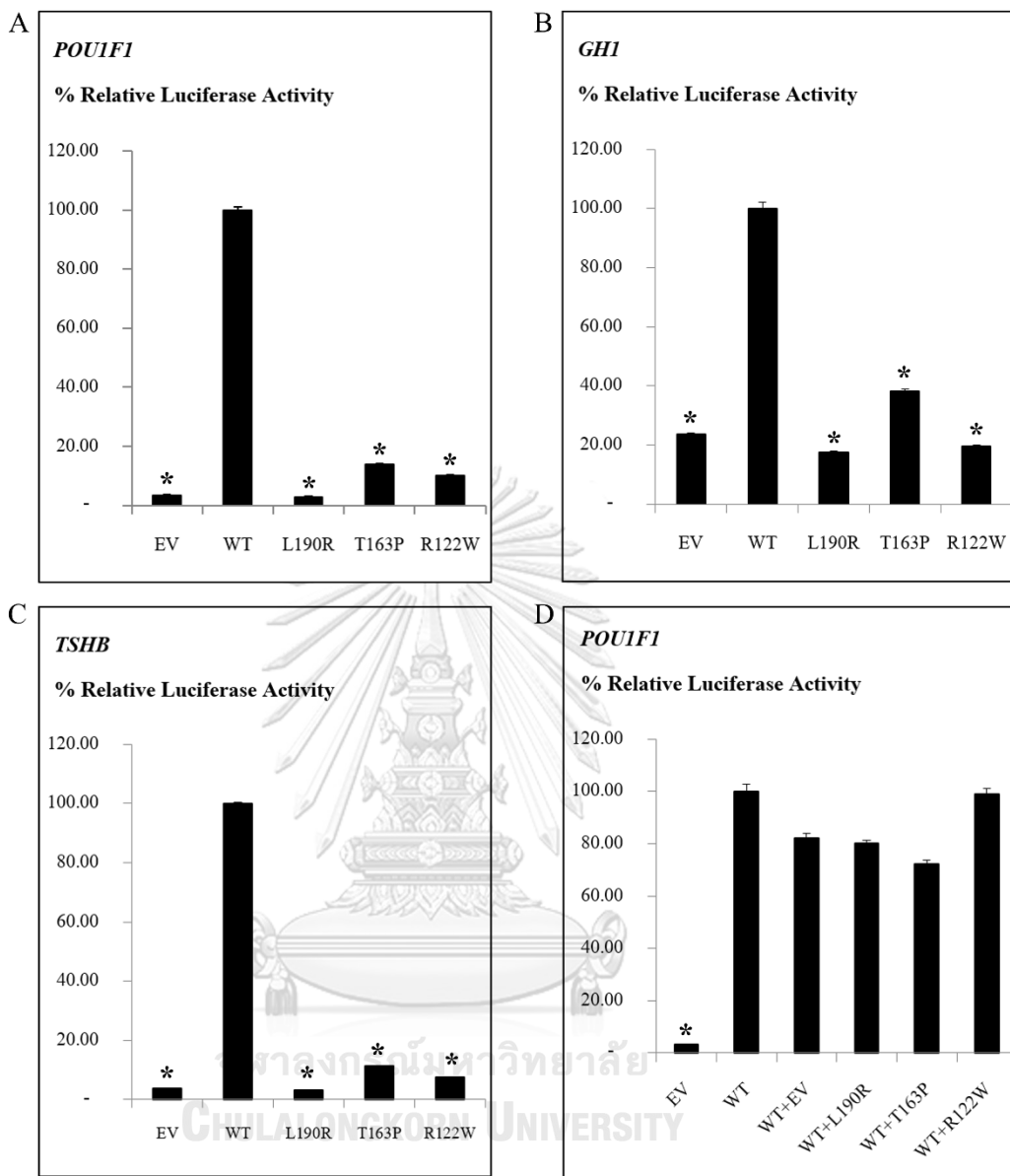
ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระดับ transcription โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

Promoter	Construct	N	Mean of RLU	Standard Deviation	Standard Error Mean
<i>POU1F1</i>	EV	9	0.35	0.06	0.02
	WT	9	10.11	1.15	0.38
	L190R	9	0.30	0.05	0.02
	T163P	9	1.40	0.25	0.08
	R122W	9	1.03	0.16	0.05
<i>GHI</i>	EV	9	2.45	0.46	0.15
	WT	9	10.41	2.18	0.73
	L190R	9	1.82	0.32	0.11
	T163P	9	3.98	0.65	0.22
	R122W	9	2.03	0.67	0.22
<i>TSHB</i>	EV	9	0.08	0.01	0.00
	WT	9	2.18	0.31	0.10
	L190R	9	0.07	0.01	0.00
	T163P	9	0.25	0.05	0.02
	R122W	9	0.16	0.04	0.01
<i>POU1F1</i> (haploinsufficiency)	EV	9	0.32	0.05	0.02
	WT	9	9.30	2.74	0.91
	WT+EV	9	7.64	1.89	0.63
	WT+L190R	9	7.46	1.23	0.41
	WT+T163P	9	6.71	1.64	0.55
	WT+R122W	9	9.21	2.19	0.73

ตารางที่ 30 ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในระดับ transcription ด้วย independent samples t-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

Comparison	t	df	Mean Difference	Standard Error Difference	p-value	Significant
<i>POU1F1</i> promoter						
WT vs EV	25.34	8.05	9.76	0.39	<0.01	**
WT vs L190R	25.50	8.03	9.82	0.38	<0.01	**
WT vs T163P	22.14	8.76	8.71	0.39	<0.01	**
WT vs R122W	23.40	8.31	9.08	0.39	<0.01	**
<i>GHI</i> promoter						
WT vs EV	10.73	8.70	7.96	0.74	<0.01	**
WT vs L190R	11.71	8.35	8.60	0.73	<0.01	**
WT vs T163P	8.49	9.41	6.43	0.76	<0.01	**
WT vs R122W	11.05	9.49	8.39	0.76	<0.01	**
<i>TSHB</i> promoter						
WT vs EV	20.47	8.03	2.10	0.10	<0.01	**
WT vs L190R	20.59	8.02	2.12	0.10	<0.01	**
WT vs T163P	18.65	8.38	1.94	0.10	<0.01	**
WT vs R122W	19.56	8.22	2.02	0.10	<0.01	**
<i>POU1F1</i> promoter (haploinsufficiency)						
WT+EV vs EV	11.61	8.01	7.32	0.63	<0.01	**
WT+EV vs WT	-1.50	16	-1.66	1.11	0.16	-
WT+EV vs WT+L190R	0.24	16	0.18	0.75	0.82	-
WT+EV vs WT+T163P	1.12	16	0.93	0.84	0.28	-
WT+EV vs WT+R122W	-1.63	16	-1.57	0.96	0.12	-

** แทน $P < 0.01$



รูปที่ 20 transcription activity ของ LHX4 ต่อโปรโมเตอร์ที่สนใจ โดย A-C แสดง transcription activity ของ LHX4 ชนิด wild type และ mutant ต่อโปรโมเตอร์ *POU1F1*, *GHI* และ *TSHB* ตามลำดับ (*) แทน $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ LHX4 ชนิด wild type, D แสดง luciferase activity ของการทดลอง haploinsufficiency โดย (*) แทน $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ LHX4 ชนิด wild type ร่วมกับ empty pTracer-CMV expression vector (WT+EV) ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ซึ่งพบในผู้ป่วยไทยรายแรกที่ได้รับการวินิจฉัยจากคณะแพทย์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ว่าเป็นโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ชนิดที่ 3 (OI type III) และโรคต่อมใต้สมองทำงานลดลง (CPHD) ผู้ป่วยมีกระดูกหักตั้งแต่แรกเกิด กระดูกโค้งงอผิดปกติ ตาขาวเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ตัวเตี้ย พันมีสีเหลือง ออกน้ำตาลและหักง่าย ซึ่งเป็นอาการของโรค OI ชนิดที่ 3 ในส่วนของโรค CPHD ผู้ป่วยมีภาวะพร่อง GH และ TSH ผลจากการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมโดยวิธี whole exome sequencing และ Sanger sequencing พบการเปลี่ยนแปลงแบบ *de novo* novel heterozygous missense mutation ชนิด c.1531G>T (p.G511C) ในยีน *COL1A2* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค OI และพบการเปลี่ยนแปลงแบบ heterozygous missense mutation ชนิด c.364C>T (p.R122W) ในยีน *LHX4* ที่เคยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค CPHD โดยพบว่าผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรมนี้มาจากพ่อของผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี สมมติฐานว่าการแสดงออกของยีน *LHX4* มีลักษณะเป็น incomplete penetrance

ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบในยีน *COL1A2* ชนิด p.G511C เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ส่งผลให้กรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ที่ตำแหน่ง 511 เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) โดยยีน *COL1A2* ทำหน้าที่สร้าง pro-alpha 2 chain ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับที่ซ้ำกันของ Gly-X-Y และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญชนิดหนึ่งของโครงสร้าง triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 คาดว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็กที่สุดเป็นกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) จะเป็นอุปสรรคในการสร้าง triple helix ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ส่งผลให้โครงสร้างสูญเสียความเสถียรหรือมีโครงสร้างที่ผิดปกติไปและเป็นสาเหตุให้เกิดโรค OI การรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสาเหตุของการเกิดโรค OI ร้อยละ 85 เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *COL1A1* และ *COL1A2* การกลายพันธุ์ส่วนมากจะเกิดจากการแทนที่กรดอะมิโนไกลซีน (glycine)⁽²⁵⁻²⁷⁾ และเกือบร้อยละ 100 พบว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองที่ไม่พบในครอบครัว (*de novo* mutation)⁽²⁸⁾

ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบในยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 122 จากกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) ซึ่งมีโซ่ข้าง (side chain) เป็นเบส (basic) เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) ซึ่งมีโซ่ข้าง

(side chain) ชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobic) การทำนายผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของซอฟต์แวร์ SIFT, PolyPhen-2 และ M-CAP พบว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดนี้อาจส่งผลกระทบต่อที่ก่อให้เกิดโรคได้ การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นบริเวณ LIM2 domain ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน *LHX4* และเป็นบริเวณที่มีบทบาทสำคัญต่อการมีปฏิสัมพันธ์กันของโปรตีน (protein-protein interaction) *LHX4* กับ โปรตีนอื่น เช่น *ISL2* และ *LHX3*⁽²⁴⁾ การรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *LHX4* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค CPHD และมีลักษณะเป็น incomplete penetrance ค่อนข้างสูง^(18, 19, 22, 24) การเปลี่ยนแปลงชนิดนี้ไม่พบในฐานข้อมูล Thai WES จำนวน 1,876 คน แต่พบในฐานข้อมูลของ ExAC จำนวน 1 อัลลีลใน 121,208 อัลลีล ซึ่งพบในคนที่มีความผิดปกติ และยังไม่เคยมีการศึกษาและการรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมามาก่อน ดังนั้นผลจากการทำ whole exome sequencing และ Sanger sequencing อาจจะไม่เพียงพอที่จะสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวก่อให้เกิดโรค CPHD ได้ จึงต้องมีการศึกษาการทำงานเพิ่มเติมโดยทำการทดสอบกับ โปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1*, *GHI* และ *TSHB* ในเซลล์ CHO-K1 และวัดระดับการแสดงออกด้วยเทคนิค luciferase reporter assay

การศึกษาการทำงานของยีน *LHX4* ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W พบว่าโปรตีน *LHX4* ชนิด p.R122W ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ *POUIF1*, *GHI* และ *TSHB* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับอาการของผู้ป่วยที่มีภาวะพร่อง GH และ TSH โดยโปรตีน *LHX4* ชนิด p.R122W มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ *POUIF1*, *GHI* และ *TSHB* ลดลงถึง 9.8 เท่า, 5.1 เท่า และ 13.5 เท่า ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานของโปรตีน *LHX4* ชนิด wild type ในขณะที่ p.T163P และ p.L190R ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้^(14, 24) ประกอบกับผลการทดลอง haploinsufficiency พบว่าโปรตีน *LHX4* ชนิด wild type ร่วมกับโปรตีน *LHX4* ชนิด p.R122W ในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *POUIF1* ได้ตามปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานที่ผิดปกติของโปรตีน *LHX4* ชนิด p.R122W ไม่ได้เกิดจาก dominant negative effect แต่เกิดจากการที่โปรตีน *LHX4* ชนิด p.R122W มีความสามารถในการทำงานลดลง (loss of functions) แบบ haploinsufficiency

การศึกษาก่อนหน้านี้พบการกลายพันธุ์ของยีน *LHX4* ที่บริเวณ LIM2 domain และมีการศึกษาการทำงานของยีนแล้วทั้งหมด 4 ชนิด คือ p.T99fs53*, p.V101A, p.T126M และ p.Y131*^(15, 16, 22, 24) โดย p.T126M เป็นการกลายพันธุ์ชนิดแรกที่เป็น homozygous missense mutation ที่ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตหลังจากคลอดได้ไม่นาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะที่พบว่าหนูที่มีความผิดปกติของยีน *LHX4* แบบ homozygous mutation จะเสียชีวิตหลังจาก

คลอดได้ไม่นานเช่นกัน⁽²¹⁾ การศึกษาครั้งนี้ช่วยเพิ่มชนิดของการกลายพันธุ์บริเวณ LIM2 domain ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีน *LHX4* ที่มีบทบาทสำคัญต่อการมีปฏิสัมพันธ์กันของโปรตีน

ปัจจุบันพบการรายงานความผิดปกติในยีน *LHX4* ที่มีความสัมพันธ์กับโรค CPHD ทั้งหมด 19 ชนิด แบ่งออกเป็นความผิดปกติแบบ microdeletion จำนวน 2 ชนิด^(17, 18) ความผิดปกติบริเวณ intron จำนวน 3 ชนิด^(8, 19, 24) และความผิดปกติบริเวณ exon จำนวน 14 ชนิด^(13-16, 19, 20, 22, 24) โดยพบว่ามีการศึกษาการทำงานของยีนแล้วจำนวน 13 ชนิด^(14, 16, 19, 20, 22, 24) นอกจากนี้ยังพบว่ามี การแสดงออกแบบ incomplete penetrance จำนวน 8 ใน 19 ชนิด ซึ่งมีการศึกษาการทำงานแล้ว จำนวน 6 ชนิด คือ p.V75I, p.T126M, p.T163P, p.R221Q, p. R48Tfs*104 และ p.Y131*^(19, 22, 24) โดย p.R122W ที่พบในการศึกษาครั้งนี้จัดเป็นความผิดปกติในยีน *LHX4* ที่มีความสัมพันธ์กับโรค CPHD และมีการแสดงออกแบบ incomplete penetrance ที่มีการศึกษาการทำงานแล้ว

พ่อของผู้ป่วยที่พบที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* เช่นเดียวกับผู้ป่วย แต่ไม่มีการแสดงอาการของโรค CPHD คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *LHX4* แบบ incomplete penetrance ที่เกิดจากการแสดงออกของอัลลีลที่ปกติของยีน *LHX4* เพียงอัลลีลเดียว และเป็นการแสดงออกที่เกิดจากการสุ่ม (random monoallelic expression)⁽³⁵⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ว่ายีน *LHX4* มีลักษณะเป็น incomplete penetrance ก่อนข้างสูง⁽²⁴⁾

การศึกษานี้สรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงชนิด p.R122W ในยีน *LHX4* ก่อให้เกิดโรคต่อมไต้สมองทำงานลดลง โดยความผิดปกติที่เกิดขึ้นในยีน *LHX4* นี้จะส่งผลกระทบต่อ การพัฒนาของต่อมไต้สมองและทำให้เกิดโรคต่อมไต้สมองทำงานลดลงในที่สุด การศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อครอบครัวผู้ป่วยในแง่ของการให้คำปรึกษาด้านการวางแผนครอบครัว สำหรับการมีบุตรคนต่อไป และจะเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในแง่ของการตรวจวินิจฉัยโรคต่อมไต้สมองทำงานลดลงให้ดียิ่งขึ้น และอาจจะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาหรือวิธีการรักษาโรคต่อมไต้สมองทำงานลดลงได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. *Early Hum Dev* 2009;85:705-12.
2. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 2009;30:790-829.
3. Prince KL, Walvoord EC, Rhodes SJ. The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:727.
4. Reynaud R, Saveanu A, Barlier A, Enjalbert A, Brue T. Pituitary hormone deficiencies due to transcription factor gene alterations. *Growth Horm IGF Res* 2004;14:442-8.
5. Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LY, et al. Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. *Endocr Rev* 2016;37:636-75.
6. Giordano M. Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30:679-91.
7. Pfaffle R, Klammt J. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:43-60.
8. Machinis K, Pantel J, Netchine I, Leger J, Camand OJ, Sobrier ML, et al. Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *Am J Hum Genet* 2001;69:961-8.
9. Mullen RD, Colvin SC, Hunter CS, Savage JJ, Walvoord EC, Bhangoo AP, et al. Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. *Mol Cell Endocrinol* 2007;265-266:190-5.
10. Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, et al. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 1997;278:1809-12.
11. Kelberman D, Dattani MT. Role of transcription factors in midline central nervous system and pituitary defects. *Endocr Dev* 2009;14:67-82.
12. Machinis K, Amselem S. Functional relationship between LHX4 and POU1F1 in light of the LHX4 mutation identified in patients with pituitary defects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5456-62.

13. Tajima T, Hattori T, Nakajima T, Okuhara K, Tsubaki J, Fujieda K. A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocr J* 2007;54:637-41.
14. Pfaeffle RW, Hunter CS, Savage JJ, Duran-Prado M, Mullen RD, Neeb ZP, et al. Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1062-71.
15. Castinetti F, Saveanu A, Reynaud R, Quentien MH, Buffin A, Brauner R, et al. A novel dysfunctional LHX4 mutation with high phenotypical variability in patients with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2790-9.
16. Tajima T, Yorifuji T, Ishizu K, Fujieda K. A novel mutation (V101A) of the LHX4 gene in a Japanese patient with combined pituitary hormone deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118:405-9.
17. Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, et al. Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with LHX4 deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4043-7.
18. Filges I, Bischof-Renner A, Rothlisberger B, Pothhoff C, Glanzmann R, Gunthard J, et al. Panhypopituitarism presenting as life-threatening heart failure caused by an inherited microdeletion in 1q25 including LHX4. *Pediatrics* 2012;129:e529-34.
19. Takagi M, Ishii T, Inokuchi M, Amano N, Narumi S, Asakura Y, et al. Gradual loss of ACTH due to a novel mutation in LHX4: comprehensive mutation screening in Japanese patients with congenital hypopituitarism. *PLoS One* 2012;7:e46008.
20. Rochette C, Jullien N, Saveanu A, Caldagues E, Bergada I, Braslavsky D, et al. Identifying the Deleterious Effect of Rare LHX4 Allelic Variants, a Challenging Issue. *PLoS One* 2015;10:e0126648.
21. Li H, Witte DP, Branford WW, Aronow BJ, Weinstein M, Kaur S, et al. Gsh-4 encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival. *EMBO J* 1994;13:2876-85.
22. Gregory LC, Humayun KN, Turton JP, McCabe MJ, Rhodes SJ, Dattani MT. Novel Lethal

- Form of Congenital Hypopituitarism Associated With the First Recessive LHX4 Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:2158-64.
23. De Rienzo F, Mellone S, Bellone S, Babu D, Fusco I, Prodam F, et al. Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;83:849-60.
 24. Cohen E, Maghnie M, Collot N, Leger J, Dastot F, Polak M, et al. Contribution of LHX4 Mutations to Pituitary Deficits in a Cohort of 417 Unrelated Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:290-301.
 25. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe AD, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews Disease Primers* 2017;3:17052.
 26. Palomo T, Vilaca T, Lazaretti-Castro M. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2017;24:381-8.
 27. Morello R. Osteogenesis imperfecta and therapeutics. *Matrix Biol* 2018;71-72:294-312.
 28. Sam JE, Dharmalingam M. Osteogenesis Imperfecta. *Indian J Endocrinol Metab* 2017;21:903-8.
 29. Lindert U, Cabral WA, Ausavarat S, Tongkobpetch S, Ludin K, Barnes AM, et al. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. *Nat Commun* 2016;7:11920.
 30. Sangsin A, Kuptanon C, Srichomthong C, Pongpanich M, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Two novel compound heterozygous BMP1 mutations in a patient with osteogenesis imperfecta: a case report. *BMC Med Genet* 2017;18:25.
 31. Tongkobpetch S, Limpaphayom N, Sangsin A, Porntaveetus T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. A novel de novo COL1A1 mutation in a Thai boy with osteogenesis imperfecta born to consanguineous parents. *Genet Mol Biol* 2017;40:763-7.
 32. Kuptanon C, Srichomthong C, Sangsin A, Kovitvanitcha D, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. The most 5' truncating homozygous mutation of WNT1 in siblings with osteogenesis imperfecta with a variable degree of brain anomalies: a case report. *BMC Med Genet* 2018;19:117.
 33. Porntaveetus T, Theerapanon T, Srichomthong C, Shotelersuk V. Cole-Carpenter syndrome in a patient from Thailand. *Am J Med Genet A* 2018;176:1706-10.
 34. Tenenbaum-Rakover Y, Sobrier ML, Amselem S. A novel POU1F1 mutation

(p.Thr168IlefsX7) associated with an early and severe form of combined pituitary hormone deficiency: functional analysis and follow-up from infancy to adulthood. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:214-9.

35. Savova V, Chun S, Sohail M, McCole RB, Witwicki R, Gai L, et al. Genes with monoallelic expression contribute disproportionately to genetic diversity in humans. *Nat Genet* 2016;48:231-7.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5. การเตรียม Freezing media

- Complete growth medium 9 มิลลิลิตร
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก 2 การใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและการทำ agarose gel electrophoresis

1. การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)

- 1.1 นำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150-180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 1.2 เก็บ stock เชื้อ โดยการนำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 14-16,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งให้หมด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตรที่ผสมกับ glycerol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- 1.3 ดูดเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดทิ้ง ทำซ้ำจนกว่าเชื้อจะหมดโดยใช้หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดเดิม
- 1.4 เติม PD1 Buffer (ที่เติม RNase A เรียบร้อยแล้ว) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม TrueBlue Lysis Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 1.5 เติม PD1 Buffer ที่ผสมกับ TrueBlue Lysis Buffer ลงในหลอดที่มีตะกอนของเซลล์ จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer หรือไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลงจนตะกอนละลายหมด
- 1.6 เติม PD2 Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา 10 ครั้ง (ห้าม vortex) หรือจนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที (ห้ามเกิน 5 นาที)
- 1.7 เติม PD3 Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา 10 ครั้ง (ห้าม vortex) หรือจนกว่าสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสีทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

- 1.8 เตรียมคอลัมน์โดยการวาง PDH Column บน Collection Tube ขนาด 2 ml
 - 1.9 ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน PDH Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ที่งัดแล้ววาง PDH Column บน Collection Tube เหมือนเดิม
 - 1.10 เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงใน PDH Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ที่งัดแล้ววาง PDH Column บน Collection Tube เหมือนเดิม
 - 1.11 เติม Wash Buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน PDH Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ที่งัดแล้ววาง PDH Column บน Collection Tube เหมือนเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
 - 1.12 วาง PDH Column บนหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Elution Buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงตรงกลาง PDH Column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
 - 1.13 นำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer
2. การเพิ่มปริมาณพลาสมิดและการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Geneaid™ Maxi Plasmid Kit (Geneaid)
- 2.1 นำ stock เชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150-180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
 - 2.2 เก็บ stock เชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด จากนั้นถ่ายเชื้อส่วนที่เหลือลงหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $\geq 3,000$ x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทั้งหมดทิ้ง

- 2.3 เตรียมคอลัมน์โดยการวาง Plasmid Maxi Column บนหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม PEQ Buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนหมด เทสารละลายทิ้ง แล้ววาง Plasmid Maxi Column บนหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดเดิม
- 2.4 เติม PM1 Buffer (ที่เติม RNase A เรียบร้อยแล้ว) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม TrueBlue Lysis Buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.5 เติม PM1 Buffer ที่ผสมกับ TrueBlue Lysis Buffer ลงในหลอดที่มีตะกอนหลอดที่ 1 จากนั้นผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer จนตะกอนละลายหมด ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ลงหลอดที่มีตะกอนหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำจนถึงหลอดที่ 4 สุดท้ายจะเหลือสารละลาย 1 หลอด
- 2.6 เติม PM2 Buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมา 10 ครั้ง (ห้าม vortex) หรือจนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที (ห้ามเกิน 5 นาที)
- 2.7 เติม PM3 Buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมา 10 ครั้ง (ห้าม vortex) หรือจนกว่าสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสีทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $\geq 3,000 \times g$ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- 2.8 ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน Plasmid Maxi Column ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนหมด เทสารละลายทิ้ง แล้ววาง Plasmid Maxi Column บนหลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดเดิม
- 2.9 เติม PW Buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงใน Plasmid Maxi Column ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนหมด เทสารละลายและหลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดเดิมทิ้ง
- 2.10 วาง Plasmid Maxi Column บนหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม PEL Buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตรลงใน Plasmid Maxi Column ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนหมด จากนั้นทิ้ง Plasmid Maxi Column

- 2.11 เติม Isopropanol (2-Propanol) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (0.75 เท่า) ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่มีสารละลายจากข้อ 2.10 ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $\geq 3,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
 - 2.12 ค่อยๆ เทหรือดูดสารละลายทิ้ง โดยระวังไม่ให้ตะกอนหลุด จากนั้นเติม 75% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $\geq 3,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 - 2.13 ค่อยๆ เทหรือดูดสารละลายทิ้ง โดยระวังไม่ให้ตะกอนหลุด จากนั้น air-dry เพื่อให้ตะกอนแห้งเป็นเวลา 10 นาที
 - 2.14 ละลายตะกอนด้วย nuclease-free water ปริมาตร 0.5-2 มิลลิลิตร
 - 2.15 นำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer
3. การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis
 - 3.1 เตรียมเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่ง agarose 1.5 กรัม ลงใน flask จากนั้นเติม 1X TBE (Tris-borate-EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
 - 3.2 นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจนเจลละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนอุณหภูมิของเจลประมาณ 65 องศาเซลเซียส
 - 3.3 เตรียมอุปกรณ์สำหรับเทเจล ซึ่งประกอบด้วย gel cassette, gel tray และ comb
 - 3.4 เติม RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร ลงในเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทเจลลงถาดที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 20-30 นาที
 - 3.5 นำถาดที่มีเจลวางลงใน gel chamber จากนั้นเติม 1X TBE ลงใน electrophoresis chamber จนท่วมเจล
 - 3.6 หยอดดีเอ็นเอ 20 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ 6X loading dye เรียบร้อยแล้วลงในเจล
 - 3.7 หยอด 100 bp DNA ladder หรือ 1 kb DNA Ladder ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในเจล
 - 3.8 ปิดฝา electrophoresis chamber แล้วต่อขั้ว electrodes เข้ากับ power supply ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ และตั้งเวลาที่ 50-80 นาที จากนั้นกดให้เครื่องทำงาน
 - 3.9 นำเจลที่ผ่านกระแสไฟฟ้าเรียบร้อยแล้วไปส่องดูภายใต้รังสี UV ด้วยเครื่อง Molecular Imager® Gel Doc XR System

4. การสกัดดีเอ็นเอจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด GenepHlow™ Gel Extraction Kit (Geneaid)
 - 4.1 ตัดแบน DNA ที่ต้องการจากเจลใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลโดยน้ำหนักเจลต้องไม่เกิน 300 มิลลิกรัมต่อหลอด
 - 4.2 เติม QG Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
 - 4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด ระหว่างบ่มให้พลิกหลอดกลับไปมาทุก 2-3 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
 - 4.4 เตรียมคอลัมน์โดยวาง DFH Column บน Collection Tube ขนาด 2 ml
 - 4.5 ดูดตัวอย่างปริมาตร 800 ไมโครลิตรลงใน DFH Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ที่วาง DFH Column บน Collection Tube เหมือนเดิม
 - 4.6 เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงใน DFH Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ที่วาง DFH Column บน Collection Tube เหมือนเดิม
 - 4.7 เติม Wash Buffer (เติม absolute ethanol แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน DFH Column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน Collection Tube ที่วาง DFH Column บน Collection Tube เหมือนเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g เป็นเวลา 3 นาที
 - 4.8 วาง DFH Column บนหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงตรงกลาง DFH Column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14-16,000 x g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
 - 4.9 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer

5. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs) (ใช้สำหรับโปรโมเตอร์ของยีน *TSHB*)
 - 5.1 ตัดแบน DNA ที่ต้องการจากเจลใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจล
 - 5.2 เติม Gel Dissolving Buffer ปริมาตร 4 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดมา (เจลหนัก 100 มิลลิกรัม หรือ 100 ไมโครลิตร ให้เติมบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตร)
 - 5.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37-55 องศาเซลเซียส (โดยทั่วไปใช้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด ระหว่างบ่มผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
 - 5.4 เตรียมคอลัมน์โดยวาง column บน collection tube
 - 5.5 ดูดตัวอย่างลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง แล้ววาง column บน collection tube เหมือนเดิม
 - 5.6 เติม DNA Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง แล้ววาง column บน collection tube เหมือนเดิม
 - 5.7 ทำข้อ 5.6 ซ้ำอีกหนึ่งครั้ง
 - 5.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
 - 5.9 วาง column บนหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม DNA Elution Buffer ปริมาตร ≥ 6 ไมโครลิตรลงตรงกลาง column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 x g เป็นเวลา 1 นาที
 - 5.10 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 Spectrophotometer

ภาคผนวก 3 ข้อมูลดิบของการตรวจวัดการแสดงออกของยีนและการตรวจวัดปริมาณโปรตีน
ทั้งหมด

1. ข้อมูลดิบของค่า Firefly Relative luminometer units (RLU) และปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่นำไปคำนวณหา transcriptional activity ของ LHX4 ชนิด wild type และ mutant ต่อโปรโมเตอร์ *POU1F1*

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
EV_1.1	5,514.41	0.81	0.81	923.52	917.94
EV_1.2	4,830.55	0.72	0.73	827.31	828.70
EV_1.3	4,725.70	0.73	0.73	834.00	831.35
EV_2.1	6,523.44	0.73	0.74	835.89	832.79
EV_2.2	6,202.45	0.74	0.75	846.71	850.24
EV_2.3	6,635.23	0.74	0.75	848.49	849.13
EV_3.1	6,423.45	0.70	0.70	798.21	797.56
EV_3.2	4,885.53	0.70	0.71	801.67	801.54
EV_3.3	7,592.08	0.72	0.73	822.63	824.84
LHX4_WT_1.1	166,379.19	0.68	0.68	780.60	771.50
LHX4_WT_1.2	163,232.50	0.69	0.70	788.07	788.06
LHX4_WT_1.3	165,922.78	0.68	0.69	779.37	778.46
LHX4_WT_2.1	161,216.16	0.83	0.84	949.94	944.99
LHX4_WT_2.2	175,586.91	0.75	0.76	856.18	857.09
LHX4_WT_2.3	175,463.97	0.76	0.76	867.89	864.48
LHX4_WT_3.1	144,356.58	0.79	0.80	905.79	906.23
LHX4_WT_3.2	207,094.70	0.78	0.79	890.07	891.21
LHX4_WT_3.3	201,962.95	0.82	0.83	935.89	937.04
LHX4_L190R_1.1	3,598.31	0.66	0.67	740.42	742.34
LHX4_L190R_1.2	3,853.14	0.73	0.74	821.77	824.62
LHX4_L190R_1.3	3,645.08	0.68	0.68	757.23	758.77

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
LHX4_L190R_2.1	5,496.63	0.68	0.68	759.58	755.86
LHX4_L190R_2.2	6,090.67	0.74	0.75	835.29	833.13
LHX4_L190R_2.3	5,309.78	0.81	0.81	913.00	911.33
LHX4_L190R_3.1	5,887.13	0.90	0.91	1,024.33	1,020.77
LHX4_L190R_3.2	5,061.92	0.71	0.71	801.90	796.07
LHX4_L190R_3.3	4,694.28	0.65	0.66	730.66	730.57
LHX4_T163P_1.1	28,988.30	0.80	0.81	904.77	902.83
LHX4_T163P_1.2	27,222.13	0.80	0.81	907.00	906.79
LHX4_T163P_1.3	20,036.11	0.90	0.91	1,017.27	1,024.27
LHX4_T163P_2.1	19,599.89	0.78	0.79	884.08	886.16
LHX4_T163P_2.2	21,110.91	0.78	0.79	882.43	880.10
LHX4_T163P_2.3	25,435.64	0.75	0.76	849.51	850.84
LHX4_T163P_3.1	30,536.94	0.79	0.80	890.07	890.82
LHX4_T163P_3.2	28,992.33	0.80	0.80	899.01	893.04
LHX4_T163P_3.3	24,448.12	0.79	0.79	887.13	882.78
LHX4_R122W_1.1	18,691.58	0.62	0.64	718.39	722.91
LHX4_R122W_1.2	18,128.69	0.67	0.68	765.77	767.19
LHX4_R122W_1.3	15,046.48	0.79	0.79	899.33	894.19
LHX4_R122W_2.1	15,271.41	0.66	0.66	759.86	753.05
LHX4_R122W_2.2	16,521.80	0.70	0.71	801.89	803.19
LHX4_R122W_2.3	14,258.95	0.67	0.68	768.89	769.29
LHX4_R122W_3.1	15,738.89	0.87	0.89	993.20	1,002.20
LHX4_R122W_3.2	16,068.22	0.67	0.67	763.32	762.55
LHX4_R122W_3.3	17,439.86	0.68	0.68	778.70	774.81

ค่า R^2 ของ standard ในการหาปริมาณ โปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.993-1

2. ข้อมูลดิบของค่า Firefly Relative luminometer units (RLU) และปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่นำไปคำนวณหา transcriptional activity ของ LHX4 ชนิด wild type และ mutant ต่อโปรโมเตอร์ *GHI*

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
EV_1.1	37,436.50	0.83	0.84	960.67	967.44
EV_1.2	51,067.52	0.65	0.66	749.72	760.58
EV_1.3	38,134.20	0.72	0.73	832.49	839.71
EV_2.1	38,546.28	0.72	0.72	828.22	832.47
EV_2.2	41,926.78	0.72	0.72	826.44	831.75
EV_2.3	39,515.56	0.74	0.75	856.56	864.55
EV_3.1	38,932.31	0.87	0.88	1,012.37	1,020.55
EV_3.2	36,394.09	0.62	0.62	710.47	712.70
EV_3.3	45,011.22	0.68	0.69	786.12	789.10
LHX4_WT_1.1	152,700.06	0.72	0.73	827.03	835.08
LHX4_WT_1.2	173,601.03	0.74	0.75	858.57	867.87
LHX4_WT_1.3	174,506.81	0.96	0.98	1,117.67	1,130.82
LHX4_WT_2.1	247,139.55	0.84	0.85	977.16	984.43
LHX4_WT_2.2	235,823.30	0.77	0.78	894.03	904.11
LHX4_WT_2.3	232,198.45	0.76	0.77	880.16	886.77
LHX4_WT_3.1	178,415.23	0.80	0.81	928.66	935.72
LHX4_WT_3.2	197,442.45	0.78	0.79	906.24	911.84
LHX4_WT_3.3	129,307.20	0.75	0.76	866.40	873.70
LHX4_L190R_1.1	22,963.73	0.85	0.85	932.62	930.43
LHX4_L190R_1.2	26,993.19	0.78	0.78	862.54	862.04
LHX4_L190R_1.3	27,335.64	0.79	0.80	873.48	875.28
LHX4_L190R_2.1	32,617.08	0.81	0.82	898.46	899.32
LHX4_L190R_2.2	37,567.25	0.75	0.75	832.14	827.18

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
LHX4_L190R_2.3	32,270.77	0.70	0.70	774.44	772.36
LHX4_L190R_3.1	28,422.08	0.72	0.73	798.54	798.95
LHX4_L190R_3.2	34,808.27	0.79	0.79	868.18	868.33
LHX4_L190R_3.3	29,822.03	0.66	0.66	723.05	726.26
LHX4_T163P_1.1	63,388.61	0.81	0.82	893.38	897.23
LHX4_T163P_1.2	64,218.77	0.83	0.84	917.80	920.94
LHX4_T163P_1.3	57,772.55	0.87	0.88	963.12	964.07
LHX4_T163P_2.1	75,710.42	0.93	0.93	1,021.26	1,022.09
LHX4_T163P_2.2	88,507.74	0.81	0.81	894.81	894.80
LHX4_T163P_2.3	72,378.49	0.82	0.83	902.22	908.59
LHX4_T163P_3.1	88,867.48	0.82	0.82	900.56	903.84
LHX4_T163P_3.2	64,636.28	0.69	0.69	761.07	762.44
LHX4_T163P_3.3	70,520.89	0.80	0.81	881.77	885.31
LHX4_R122W_1.1	26,847.56	0.73	0.74	844.70	855.99
LHX4_R122W_1.2	30,224.11	0.71	0.72	818.26	827.00
LHX4_R122W_1.3	31,909.19	0.78	0.79	904.23	910.29
LHX4_R122W_2.1	25,419.17	0.70	0.71	811.74	820.35
LHX4_R122W_2.2	26,587.55	0.78	0.79	900.91	912.91
LHX4_R122W_2.3	25,746.06	0.78	0.79	903.99	912.31
LHX4_R122W_3.1	47,182.47	0.79	0.80	916.68	924.55
LHX4_R122W_3.2	57,228.80	0.76	0.77	877.90	885.22
LHX4_R122W_3.3	46,524.47	0.72	0.73	830.35	836.98

ค่า R² ของ standard ในการหาปริมาณ โปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.995-0.999

3. ข้อมูลดิบของค่า Firefly Relative luminometer units (RLU) และปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่นำไปคำนวณ transcriptional activity ของ LHX4 ชนิด wild type และ mutant ต่อโปรโมเตอร์ *TSHB*

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
EV_1.1	1,656.19	0.84	0.85	977.55	987.50
EV_1.2	1,339.47	0.76	0.78	884.26	902.87
EV_1.3	1,309.78	0.58	0.59	677.80	682.75
EV_2.1	1,082.72	0.75	0.75	875.52	862.97
EV_2.2	1,027.28	0.63	0.64	737.15	737.98
EV_2.3	1,216.44	0.74	0.75	860.68	866.32
EV_3.1	1,803.56	0.77	0.78	891.05	899.87
EV_3.2	1,392.69	0.72	0.73	841.13	841.75
EV_3.3	1,565.94	0.79	0.80	911.64	922.01
LHX4_WT_1.1	32,450.48	0.67	0.67	773.96	776.72
LHX4_WT_1.2	38,497.86	0.72	0.74	838.25	852.71
LHX4_WT_1.3	32,775.45	0.65	0.66	756.82	761.27
LHX4_WT_2.1	36,492.75	0.67	0.67	772.58	774.07
LHX4_WT_2.2	38,030.39	0.85	0.85	980.65	981.28
LHX4_WT_2.3	28,747.41	0.72	0.72	833.31	837.14
LHX4_WT_3.1	41,674.59	0.69	0.69	797.31	804.16
LHX4_WT_3.2	42,222.42	0.69	0.70	804.90	815.70
LHX4_WT_3.3	34,760.73	0.78	0.80	908.42	922.59
LHX4_L190R_1.1	1,115.59	0.78	0.80	905.90	910.16
LHX4_L190R_1.2	1,183.59	0.76	0.77	882.88	884.20
LHX4_L190R_1.3	1,491.24	0.81	0.83	951.21	954.05
LHX4_L190R_2.1	1,085.50	0.72	0.73	835.08	837.40
LHX4_L190R_2.2	1,095.42	0.75	0.76	871.38	870.11

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
LHX4_L190R_2.3	1,259.23	0.73	0.75	854.77	858.93
LHX4_L190R_3.1	1,280.75	0.69	0.70	800.68	801.19
LHX4_L190R_3.2	1,237.73	0.68	0.69	786.20	791.06
LHX4_L190R_3.3	1,103.70	0.76	0.77	883.12	885.71
LHX4_T163P_1.1	4,138.97	0.83	0.84	968.89	965.93
LHX4_T163P_1.2	4,850.66	0.80	0.81	936.86	932.86
LHX4_T163P_1.3	4,967.09	0.79	0.80	923.10	918.54
LHX4_T163P_2.1	3,634.27	0.72	0.73	833.42	835.77
LHX4_T163P_2.2	3,037.88	0.71	0.73	832.82	831.34
LHX4_T163P_2.3	4,097.58	0.82	0.83	957.62	950.21
LHX4_T163P_3.1	5,812.84	0.80	0.82	939.94	942.06
LHX4_T163P_3.2	5,423.47	0.71	0.73	833.06	835.77
LHX4_T163P_3.3	4,560.91	0.81	0.84	948.96	958.24
LHX4_R122W_1.1	3,064.92	0.79	0.80	912.67	923.74
LHX4_R122W_1.2	2,705.31	0.76	0.77	883.69	887.53
LHX4_R122W_1.3	2,489.22	0.79	0.80	918.54	920.97
LHX4_R122W_2.1	2,269.80	0.83	0.85	965.93	978.97
LHX4_R122W_2.2	2,643.20	0.84	0.84	977.55	973.67
LHX4_R122W_2.3	2,478.52	0.74	0.74	854.82	856.05
LHX4_R122W_3.1	2,945.41	0.77	0.78	898.53	904.02
LHX4_R122W_3.2	3,418.98	0.69	0.71	805.47	824.23
LHX4_R122W_3.3	4,017.97	0.74	0.75	856.66	867.12

ค่า R^2 ของ standard ในการหาปริมาณ โปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.997-0.998

4. ข้อมูลดิบของค่า Firefly Relative luminometer units (RLU) และปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่นำไปคำนวณหา transcriptional activity ของ LHX4 ชนิด wild type และ mutant ต่อโปรโมเตอร์ *POU1F1* ในการทดลอง haploinsufficiency

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
EV_1.1	5,290.77	0.68	0.69	803.82	810.48
EV_1.2	5,131.47	0.64	0.65	758.44	752.47
EV_1.3	4,682.86	0.69	0.69	813.50	805.70
EV_2.1	6,303.42	0.77	0.78	914.43	917.05
EV_2.2	5,495.56	0.77	0.79	918.77	929.56
EV_2.3	4,014.80	0.75	0.77	891.49	901.72
EV_3.1	7,663.91	0.76	0.77	902.90	905.52
EV_3.2	5,211.13	0.76	0.77	899.18	904.30
EV_3.3	5,536.20	0.72	0.73	857.39	851.19
WT_1.1	192,798.59	0.60	0.62	707.36	716.90
WT_1.2	217,481.06	0.67	0.69	795.39	800.42
WT_1.3	173,225.09	0.67	0.68	791.80	799.44
WT_2.1	137,151.03	0.79	0.79	935.63	930.17
WT_2.2	135,328.13	0.78	0.81	930.79	958.26
WT_2.3	122,051.81	0.77	0.78	918.89	921.71
WT_3.1	153,757.41	0.71	0.72	841.39	841.75
WT_3.2	130,025.44	0.69	0.70	818.21	816.86
WT_3.3	132,279.63	0.75	0.76	886.90	893.51
WT+EV_1.1	161,642.52	0.62	0.63	726.58	733.95
WT+EV_1.2	154,463.52	0.64	0.65	748.90	752.47
WT+EV_1.3	121,332.39	0.65	0.66	762.29	769.76
WT+EV_2.1	124,875.73	0.76	0.76	902.40	894.24

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
WT+EV_2.2	110,385.92	0.78	0.79	923.73	929.19
WT+EV_2.3	87,459.67	0.71	0.69	838.05	809.25
WT+EV_3.1	116,449.17	0.72	0.73	849.21	855.98
WT+EV_3.2	112,190.58	0.67	0.68	797.38	790.86
WT+EV_3.3	119,692.55	0.68	0.70	806.68	814.53
WT+L190R_1.1	140,835.80	0.71	0.72	836.93	846.29
WT+L190R_1.2	164,728.61	0.74	0.76	879.09	887.74
WT+L190R_1.3	162,340.14	0.75	0.77	893.35	899.76
WT+L190R_2.1	106,195.67	0.65	0.66	770.10	772.71
WT+L190R_2.2	130,068.83	0.78	0.80	933.52	936.43
WT+L190R_2.3	115,769.20	0.86	0.88	1,028.62	1,037.48
WT+L190R_3.1	114,454.45	0.74	0.76	881.44	888.23
WT+L190R_3.2	128,016.45	0.77	0.79	918.39	928.46
WT+L190R_3.3	116,339.67	0.65	0.66	763.40	770.38
WT+T163P_1.1	169,460.03	0.79	0.80	940.46	943.79
WT+T163P_1.2	125,530.00	0.69	0.70	818.83	820.41
WT+T163P_1.3	153,029.50	0.71	0.74	845.24	863.09
WT+T163P_2.1	125,690.69	0.73	0.73	860.37	853.40
WT+T163P_2.2	91,931.19	0.80	0.83	950.01	974.69
WT+T163P_2.3	84,710.31	0.71	0.72	839.66	847.52
WT+T163P_3.1	103,728.13	0.80	0.82	958.44	965.62
WT+T163P_3.2	120,965.34	0.75	0.76	884.92	889.70
WT+T163P_3.3	91,954.13	0.72	0.72	851.56	845.92
WT+R122W_1.1	212,517.50	0.64	0.66	758.44	767.43
WT+R122W_1.2	134,762.94	0.62	0.63	728.81	732.48

Construct	Firefly RLU	Total Proteins			
		OD Values		Concentration (ng/ul)	
		Repeat 1	Repeat 2	Repeat 1	Repeat 2
WT+R122W_1.3	154,322.91	0.60	0.61	705.87	708.69
WT+R122W_2.1	129,191.19	0.78	0.80	924.59	946.85
WT+R122W_2.2	136,821.69	0.78	0.80	925.96	939.25
WT+R122W_2.3	137,452.41	0.69	0.71	812.01	825.81
WT+R122W_3.1	136,408.34	0.68	0.69	800.97	804.22
WT+R122W_3.2	141,761.13	0.60	0.61	703.14	706.24
WT+R122W_3.3	136,210.59	0.74	0.77	874.75	900.13

ค่า R^2 ของ standard ในการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.991



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นลินี เหมวงศ์
วัน เดือน ปี เกิด	4 เมษายน 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดระยอง
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน สำเร็จการศึกษาวันที่ 15 มีนาคม 2553
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 36/2 หมู่ที่ 6 ตำบลเชิงเนิน อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง 21000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY