



การตรวจกรองการผ่าเหล่าและความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในคนไทยที่เป็นออทิซึม
**Mutation Screening and Association Study of the *FMR1* gene in
Thai Patients with Autism**

จารุณี มหารัตน์
Charunee Maharat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Molecular Biology and Bioinformatics
Prince of Songkla University**

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจกรองการผ่าเหล่าและความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในคนไทย
ที่เป็นออทิซึม

ผู้เขียน นางสาวจารุณี มหารัตน์

สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพต ลี้มประเสริฐ) (รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

..... กรรมการ
(ดร.อรุณรัศมี วณิชชานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพต ลี้มประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
โมเลกุลและชีวสารสนเทศ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจกรองการผ่าเหล่าและความสัมพันธ์ของยีน <i>FMR1</i> ในคนไทยที่เป็นออทิซึม
ผู้เขียน	นางสาวจารุณี มหารัตน์
สาขาวิชา	ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

ออทิซึมเป็นภาวะที่จำแนกได้จากความผิดปกติ 3 ด้านหลัก ได้แก่ ภาษาและการสื่อสาร การสร้างสัมพันธภาพระหว่างบุคคล และพฤติกรรมและความสนใจแบบจำเพาะซ้ำเติม พันธุกรรมเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะออทิซึมจากการศึกษาในพี่น้องและฝาแฝดกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (Fragile X syndrome) ที่มีสาเหตุจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ CGG ในยีนเอฟเอ็มอาร์ 1 (*FMR1*) พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับออทิซึม เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะบางรายมีพฤติกรรมของออทิซึม และพบการผ่าเหล่าของยีน *FMR1* ในผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมและ PDD-NOS การตรวจวินิจฉัยทางคลินิกอาจไม่สามารถจำแนกพฤติกรรมระหว่างกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะและออทิซึมได้ในบางราย ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจกรองผู้ป่วยออทิซึมและ PDD-NOS ทั้งผู้หญิงและผู้ชายทั้งหมด 151 ราย ด้วยวิธีพีซีอาร์สำหรับทดสอบจำนวนซ้ำ CGG และวิธีเมทิลเลชันสเปซิฟิกพีซีอาร์ (Methylation-Specific PCR) ผลการศึกษาไม่พบผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ CGG ในยีน *FMR1* แต่พบผู้ป่วย 3 ราย ที่มีอัลลีลอยู่ในช่วงอินเตอร์มีเดียต (intermediate) คือ 44 46 และ 52 ซ้ำ และในการศึกษานี้ได้ทดสอบจีโนไทป์ของสไนป์ส์ที่ครอบคลุมทั้งยีน *FMR1* (WEX44-WEX70-WEX82-WEX5-ATL1-rs25702) ด้วยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ (Biallelic-ARMS PCR) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละสไนป์ส์และแฮพโลไทป์จำเพาะผู้ชายในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมและ PDD-NOS 128 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ผลการทดสอบความสัมพันธ์แต่ละสไนป์ส์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่การทดสอบความสัมพันธ์แฮพโลไทป์พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแฮพโลไทป์ TGAG (WEX82-WEX5-ATL1-rs25702) ซึ่งพบในผู้ป่วย 4 ราย (ร้อยละ 3.1) แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม ($P = 0.0282$, $P_{corrected} = 0.039$) ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญและควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้จึงยังสรุปไม่ได้ว่ายีน *FMR1* เป็นปัจจัยส่งเสริมที่ทำให้เกิดภาวะออทิซึมในคนไทย

Thesis Title Mutation Screening and Association Study of the *FMR1* gene in Thai Patients with Autism
Author Miss Charunee Maharat
Major Program Molecular Biology and Bioinformatics
Academic Year 2008

ABSTRACT

Autism is a common neurodevelopmental disorder characterized by impairments in communication, social interactions, and repetitive and stereotypic behaviors. The presence of a genetic contribution to autism has been indicated by sibling and twin studies. Fragile X syndrome (FXS) is one of the most common single gene defects associated with autism. Some patients diagnosed as having autism or PDD-NOS have had FXS with expanded CGG repeats in the *FMR1* gene. Normally, FXS patients show some autistic behaviors and may be difficult to distinguish at a young age from autistic children. In an attempt to elucidate these connections, we screened 151 unrelated patients with autism and PDD-NOS using PCR for CGG repeats and Methylation-Specific PCR. No positive FXS was found in individuals diagnosed with autism. However, we found three autistic patients with intermediate CGG repeats (42, 44 and 52 CGG repeats). SNP haplotypes of the *FMR1* gene were analyzed (WEX44-WEX70-WEX82-WEX5-ATL1-rs25702) using Biallelic-ARMS PCR in 128 male patients with autism and PDD-NOS, comparing them to 152 normal male controls. No statistically significant differences between cases and controls were found in single SNPs associations ($P > 0.05$). A significant haplotype-based association was detected in a rare haplotype (TGAG, WEX82-WEX5-ATL1-rs25702) which was found in four autistic patients, but in no controls ($P = 0.0282$, $P_{corrected} = 0.039$). This may have been simply a chance finding and further studies will be required to confirm an association.

Consequently, we could not conclude from this study that the *FMR1* gene is a susceptible genetic factor in Thai autistic patients.

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนสนับสนุนในการทำให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้ประสบความสำเร็จ บุคคลที่สำคัญคือ รองศาสตราจารย์ ดร.ชาคริต ทองอุไร ผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา ประธานหลักสูตร และอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.พรพรด ลิ้มประเสริฐ ที่ให้การสนับสนุน การให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะจนงานสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณ ดร.อรุณรัศมี วัฒนชานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่สละเวลาในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำนงค์ นพรัตน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิภา ปุรินทรภิบาล ที่ให้คำแนะนำและข้อชี้แนะในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณผู้บริหารและบุคลากรศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ทั้งในงานชีวโมเลกุล คุณพจนารถ พัทบุรี และคุณเอื้อมนัส อินทรผาด ที่ปฏิบัติงานแทนขณะลาศึกษาต่อ ขอขอบคุณคุณนวรรตน์ มโนมัยสันติภาพ คุณพัชรา สุกลรัตน์ และผู้ร่วมงานท่านอื่นที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ขอขอบคุณ ดร.ธัญญา ศรีโพธิ์ คุณวรรณมา สุทธิภรณ์ และ ดร.วรรณรัตน์ แซ่ซุ่น ที่ให้คำปรึกษาและข้อชี้แนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณนักศึกษาและผู้ช่วยวิจัย คุณอรุณวรรณ ปลั่งอ่อน คุณกอบกุล ทองสิพพัญญู คุณวราพงศ์ สุวรรณรัตน์ คุณวรทัย ไหมศรีขาว และคุณเชษฐตุล พูลจันทร์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ และความมีน้ำใจช่วยเหลืองานต่างๆ จนทำให้งานครั้งนี้ประสบความสำเร็จ รวมถึงการมีส่วนร่วมทำให้มีความสุขในการทำงาน ขอขอบคุณคุณจันทร์เพ็ญ ธนกิจโกเศศฐ์ ที่ให้ข้อชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นและให้การช่วยเหลือในทุกๆด้านด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณคณาจารย์ผู้สอนวิชาและเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศในการเอื้ออำนวยความสะดวกและการดำเนินการด้านเอกสาร ขอขอบคุณน้องนักศึกษาหลักสูตรวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศรุ่น 2 รวมถึงขอขอบคุณรุ่นพี่ และรุ่นน้องและเพื่อนสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณความรักและกำลังใจที่สำคัญจากบุคคลในครอบครัวทุกท่านทั้งคุณแม่ พี่ๆ และหลานๆ รวมถึงเพื่อนๆที่เปรียบเสมือนคนในครอบครัว

โครงการนี้จะสำเร็จไม่ได้ถ้าไม่ได้การสนับสนุนจากงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย ประจำปี 2550 ทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ BT-B-01-MG-18-4814) และภาควิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จารุณี มหารัตน์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(11)
เนื้อเรื่อง	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	18
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	19
วัสดุและอุปกรณ์	19
วิธีดำเนินการ	26
บทที่ 3 ผลการวิจัย	44
บทที่ 4 บทวิจารณ์	77
บทที่ 5 บทสรุป	93
รายการเอกสารอ้างอิง	94
ภาคผนวก	109
ประวัติผู้เขียน	119

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การผ่าเหล่าในตำแหน่งที่แปลงเป็นโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอในยีน <i>FMR1</i> ที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ	8
2. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่มีพฤติกรรมออทิซึม	12
3. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายที่มีพฤติกรรมออทิซึมจากสาเหตุความผิดปกติของโครโมโซมตำแหน่ง Xq27.3 ด้วยวิธีการตรวจโครโมโซม	13
4. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายที่มีพฤติกรรมออทิซึมที่มีสาเหตุจากความผิดปกติของยีน <i>FMR1</i> ด้วยการทดสอบดีเอ็นเอ	14
5. จำนวนผู้ป่วยออทิซึม ผู้ป่วย PDD-NOS และกลุ่มควบคุม	20
6. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ	22
7. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับทดสอบจีโนไทป์ของสนิปส์	23
8. ตำแหน่งสนิปส์บนยีน <i>FMR1</i>	33
9. สภาวะและขนาดของผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์	38
10. การเปรียบเทียบการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในตัวอย่างผู้ชายคนไทยปกติ จากภาคกลาง ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือด้วยการทดสอบ Chi square	48
11. การเปรียบเทียบการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ระหว่างผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด 128 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของคนไทยทั้งหมด 200 ราย ด้วยการทดสอบ Chi-square	49
12. ค่าเฉลี่ยของ non verbal IQ ในแต่ละกลุ่มของจำนวนซ้ำ CGG ในผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด	50
13. ผลการทดสอบฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กและความถี่อัลลีลของแต่ละสนิปส์	58
14. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสนิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702)บนยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	60
15. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสนิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702)บนยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายจำเพาะออทิซึมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	61

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702)บน ยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	62
17. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702)บน ยีน <i>FMR1</i> ในผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าใน ครอบครัวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	63
18. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	65
19. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายจำเพาะออทิซึม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	66
20. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview	67
21. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน <i>FMR1</i> ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีประวัติ พัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ โปรแกรม Haploview	68
22. ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยออทิซึมที่มีจำนวนซ้ำ CGG ในช่วง intermediate	79
23. ความถี่ของจำนวนซ้ำ CGG ในกลุ่มควบคุมผู้ชาย	80
24. ความถี่ของจำนวนซ้ำ CGG เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด 128 ราย กับกลุ่มควบคุมทั้งหมด 663 ราย	81
25. ความถี่อัลลีลของสลิปส์ในแต่ละเชื้อชาติ	87
26. การเปรียบเทียบความถี่อัลลีลแต่ละเชื้อชาติ	88
27. ประวัติของผู้ป่วยออทิซึม และ PDD-NOS ที่มีแฮพโลไทป์ TGAG	92
28. ความชุกของออทิซึมในแต่ละประเทศ	110
29. ยีนที่คาดว่าจะก่อให้เกิดภาวะออทิซึม	112
30. ตำแหน่งสลิปส์บนยีน <i>FMR1</i>	114

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. ความถี่ของผู้ป่วยชายที่มีพฤติกรรมออทิซึมซึ่งตรวจพบการผ่าเหล่าในยีน <i>FMR1</i> และผู้ป่วยชายกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่มีพฤติกรรมออทิซึม	16
2. แผนผังแสดงขั้นตอนการตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึม	27
3. แผนผังแสดงขั้นตอนวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน <i>FMR1</i> ในผู้ป่วยออทิซึม ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	28
4. ภาพแสดงตำแหน่งที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อทดสอบจำนวนซ้ำของ CGG	29
5. ภาพแสดงตำแหน่งของที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Methylation-Specific PCR	31
6. ตำแหน่งสนิปส์ที่ครอบคลุมทั้งยีน <i>FMR1</i>	34
7. ภาพแสดงไพรเมอร์ 4 ตำแหน่งในการทดสอบด้วยวิธี Biallelic-ARMS PCR	36
8. ภาพแสดงหน้าจอหลักของโปรแกรม Haploview V4.0	42
9. ภาพแสดงตัวอย่างผลการตรวจกรองจำนวนซ้ำด้วยวิธีพีซีอาร์สำหรับการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG (Brown et al., 1993)	45
10. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของตัวอย่างผู้ชายที่มีจำนวนซ้ำ CGG อยู่ในช่วง intermediate ที่ถ่ายทอดจากแม่ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์	46
11. การกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในตัวอย่างผู้ชายทั้งหมด 128 ราย	47
12. ภาพแสดงผลเจลอะกาโรสของวิธี Methylation-Specific PCR	51
13. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ WEX44	52
14. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ WEX70	53
15. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ WEX82	54
16. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ WEX5	55
17. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ ATL1	56
18. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ rs25702	57
19. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (linkage disequilibrium map, LD) บนยีน <i>FMR1</i>	59
20. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ CGG 29 ซ้ำ	70
21. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ CGG 36 ซ้ำ	71
22. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ CGG 52 ซ้ำ	72
23. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของสนิปส์ WEX44	73
24. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของสนิปส์ WEX70	74

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของสไนป์ส์ WEX82	75
26. การเปรียบเทียบผลของจีโนไทป์ของสไนป์ส์ WEX44 WEX70 และ WEX82 กับสไนป์ส์ในฐานข้อมูล rs1868140 rs45631657 และ rs5904648 โดยใช้โปรแกรม ClustalX	76
27. แผนภูมิแสดงการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในคนไทยผู้ชายที่เป็นกลุ่มควบคุมทั้งหมด 663 อัลลีล	82
28. แผนภูมิแสดงการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ที่พบบ่อย	83

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

APS	=	ammonium persulfate
ARMS	=	amplification refractory mutation system
AGG	=	adenosine-adenosine-guanine
bp	=	base pair(s)
BSA	=	bovine serum albumin
°C	=	degree Celsius
CGG	=	cytosine-guanine-guanine
CpG	=	cytosine preceding guanine
dATP	=	deoxyadenosine-5'-triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine-5'-triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine-5'-triphosphate
7-deaza-dGTP	=	7-deaza- deoxyguanosine-5'-triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine-5'-triphosphate
dNTPs	=	dATP+ dCTP+ dGTP+ dTTP
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediamine tetra-acetic acid, disodium salt
et al.	=	et ali (Latin) and others
FM	=	full mutation
<i>FMR1</i>	=	<i>fragile X mental retardation 1</i>
FMRP	=	fragile X mental retardation protein
FXS	=	fragile X syndrome
Het	=	heterozygosity
IQ	=	intelligence quotient
Kb	=	kilobase pair (s)
LD	=	linkage disequilibrium
M	=	molar
MAF	=	minor allele frequency
min	=	minute (s)
μl	=	microliter

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

ml	=	milliliter
μ M	=	micromolar
mM	=	millimolar
MR	=	mental retardation
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
ng	=	nanogram
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
PM	=	premutation
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolution per minute
sec	=	second (s)
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SNP	=	single nucleotide polymorphism
TAE	=	tris acetate, EDTA
Taq	=	Thermus aquaticus
TBE	=	tris borate, EDTA
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylenediamine
U	=	unit (s)
UTR	=	untranslated region
UV	=	ultraviolet

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ออทิซึมเป็นภาวะความผิดปกติทางสมองที่ทำให้มีความบกพร่องของพัฒนาการสามด้านหลัก ได้แก่ ภาษาและการสื่อสาร การสร้างสัมพันธภาพระหว่างบุคคล รวมถึงความสนใจและพฤติกรรมที่จำเพาะซ้ำเติม อาการเหล่านี้เกิดในช่วงต้นของชีวิตมักเริ่มมีอาการก่อนอายุ 3 ขวบ ในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุสาเหตุที่แน่ชัดของออทิซึมได้ แต่จากการศึกษาในพี่น้อง และฝาแฝดพบว่าพันธุกรรมที่เกิดจากหลายยีนน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึมรวมถึงอาจมีปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย จากการตรวจสอบระดับพันธุกรรมในผู้ป่วยออทิซึมพบความผิดปกติที่มีสาเหตุจากยีนเดี่ยวหลายโรค เช่น กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ กลุ่มอาการเรตต์ และทูเบอร์รัสสโครโรซิส เป็นต้น

กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะเกิดจากการผ่าเหล่าที่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ CGG ในยีน *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) และมีการเติมหมู่เมทิลที่มากเกินไปที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ (CpG island) จึงยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน FMRP (*fragile X mental retardation protein*) ซึ่งส่งผลต่อการสื่อของเซลล์ประสาท (synapticity) การศึกษาพฤติกรรมในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะพบว่าร้อยละ 16-47 มีอาการที่ครอบคลุมตามเกณฑ์วินิจฉัยของออทิซึม และการตรวจกรองผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมพบว่าประมาณร้อยละ 1.9-12 มีสาเหตุมาจากการผ่าเหล่าของยีน *FMR1*

จากลักษณะทางคลินิกที่คล้ายคลึงกันในด้านพฤติกรรมบางอย่างระหว่างกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะและออทิซึม ภาวะออทิซึมมีจำนวนผู้ชายที่เป็นโรคมกกว่าผู้หญิง ข้อมูลสนับสนุนจากการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม (linkage study) ที่ครอบคลุมตำแหน่ง Xq27.3 ผลการศึกษาจีโนมไวด์สแกนที่พบในบริเวณ Xq รวมถึงมีรายงานการผ่าเหล่าของยีน *FMR1* ในผู้ป่วยออทิซึม เป็นประเด็นที่น่าสนใจว่ายีน *FMR1* อาจเป็นยีนหนึ่งในการส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึมแบบพหุปัจจัย ซึ่งที่ผ่านมามีเพียงรายงานเดียวที่ศึกษาสิทธิหนึ่งตำแหน่งในยีน *FMR1* ในผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษาในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* กับออทิซึม โดยใช้สิทธิที่ครอบคลุมทั่วทั้งยีนในการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมคนไทยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การตรวจเอกสาร

ออทิซึม

ออทิซึม (Online Mendelian in Man, OMIM 209850) เป็นภาวะที่มีพฤติกรรมซ้ำซ้อน (pervasive developmental disorder) จำแนกได้จากความผิดปกติจากการสื่อสาร ด้านสังคม และพฤติกรรมและความสนใจที่จำเพาะซ้ำเดิม นอกจากนี้ Pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) เป็นภาวะที่มีอาการไม่ครบทั้งสามด้านหรือมีแสดงอาการเมื่ออายุมากกว่าสามขวบ พื้นฐานของการวินิจฉัยดังกล่าวมาจากอาการชักในผู้ป่วยประมาณร้อยละ 30 และการมีภาวะปัญญาอ่อนจากการทดสอบระดับสติปัญญาโดยไม่ใช้ภาษา (non verbal IQ) ที่พบประมาณ ร้อยละ 70 ของผู้ป่วยทั้งหมด รวมถึงโรคเกี่ยวกับระบบประสาทอื่นๆ (Simonoff et al., 1996) ผู้ป่วยออทิซึมส่วนใหญ่มีพัฒนาการล่าช้าในระดับปานกลางถึงรุนแรง แต่พบว่าประมาณร้อยละ 20 ของผู้ป่วยออทิซึมมี IQ ในช่วงปกติ จากการประเมินด้วย standard cognitive tests และเรียกกลุ่มนี้ว่า high functioning autism (HFA) (Fombonne, 2003)

ในปี พ.ศ. 2546 (ค.ศ. 2003) Fombonne ได้รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลการสำรวจความชุกของออทิซึมทั่วโลกเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 (ค.ศ. 1966) พบว่า มีความชุกของออทิซึมสูงเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่กลางปี พ.ศ. 2523 (ค.ศ. 1980) จาก 3-5 คน เป็น 10 คน ต่อประชากร 10,000 คน และพบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงในอัตราส่วน 4:1 (Fombonne, 2002) การเพิ่มขึ้นนี้อาจมาจากการเปลี่ยนเกณฑ์การวินิจฉัยให้ครอบคลุมอาการของโรคมากขึ้น รวมถึงมีผู้สนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันเกณฑ์การวินิจฉัยที่ใช้เป็นมาตรฐาน ได้แก่ Autism Diagnostic Interview (ADI) Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) และ Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) เป็นต้น นอกจากนี้มาตรฐานการวินิจฉัย American Psychiatric Association Manual of Psychiatric Diseases, 4th edition (DSM-IV) เป็นมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไป (Clifford, 2007) สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานความชุกของออทิซึม 9.9 คน ต่อประชากร 10,000 คน (Poolsuppasit et al., 2005) โดยใช้อ้างอิงตามเกณฑ์ DSM-IV และผลการสำรวจความชุกแต่ละประเทศตามรายละเอียดที่แสดงในภาคผนวก ก

สาเหตุของออทิซึมแบ่งเป็นที่ไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) ร้อยละ 90-95 และจากปัจจัยอื่น (secondary) ร้อยละ 5-10 ออทิซึมที่ไม่ทราบสาเหตุอาจมาจากพันธุกรรมหรือความเสี่ยงจากสิ่งแวดล้อมหรือทั้งสองปัจจัยร่วมกัน การศึกษาในฝาแฝดไข่ร่วมใบที่มียีนร่วมกัน ร้อยละ 100 เป็นออทิซึมเหมือนกัน (concordance rates) ร้อยละ 60-90 (Bailey et al., 1995) และการศึกษาอัตราการเป็นซ้ำในพี่น้อง (recurrence rate) ประมาณร้อยละ 2-8 และอัตรา

พันธุกรรม (heritability) มากกว่าร้อยละ 90 (Bailey et al., 1998; Cook, 2001; Le Couteur et al., 1996; Freitag, 2007) เป็นหลักฐานว่าออทิซึมเป็นภาวะที่มีปัจจัยทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง การศึกษาทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลสำหรับผู้ช่วยออทิซึมที่ไม่ทราบสาเหตุ ใช้วิธีการวิเคราะห์การถ่ายทอดในครอบครัว (linkage analysis) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (association study) การวิเคราะห์การถ่ายทอดในพี่น้องที่เป็นออทิซึมในครอบครัวมีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ก่อให้เกิดโรค โดยศึกษาแนวโน้มของอัลลีลที่ใกล้เคียงกันมีการถ่ายทอดไปด้วยกัน เช่น การศึกษาทั้งจีโนมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่หนาแน่นครอบคลุมทุกโครโมโซม หรือศึกษาเฉพาะตำแหน่งที่สนใจ จากการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวพบว่าหลายโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับออทิซึม เช่น 1q 2q 7q 13q 16q 17q และ 19q เป็นต้น (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC), 1998; Collaborative Linkage Study of Autism (CLSA), 1999; Risch et al., 1999; Buxbaum et al., 2001; Liu et al., 2001; Auranen et al., 2000; Duvall et al., 2007) และพบหลักฐานอ้างอิงของออทิซึมกับโครโมโซมเอกซ์ในตำแหน่ง Xp และ Xq (Philippe et al., 1999; Shao et al., 2002; Yonan et al., 2003; Vincent et al., 2005)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใช้หลักการของเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค (disease-risk variant) ที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันเพื่อหา ยีนที่มีความน่าจะเป็นที่ก่อให้เกิดโรค (susceptibility gene) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในประชากรทั่วไป (population-based) เป็นการทดสอบว่าพบเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะในคนที่ เป็นโรคบ่อยกว่าในประชากรปกติ แต่หากการเลือกกลุ่มประชากรที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและแฝงอยู่ในประชากรที่ศึกษาโดยไม่ทราบมาก่อน (population stratification) อาจทำให้ผลการทดสอบมีกำลังลดลง ซึ่งกำลัง (power) เป็นความน่าจะเป็นของความถูกต้องของการทดสอบความสัมพันธ์ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในครอบครัว (family-based) เป็นวิธีการที่ไม่มีข้อผิดพลาดจากการเลือกกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์อัลลีลของพ่อและแม่ที่ถ่ายทอดให้ลูกที่เป็นโรค (transmitted) เปรียบเทียบกับอัลลีลที่ไม่ได้ถ่ายทอดเป็นกลุ่มควบคุม (not transmitted) ซึ่งใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ และมีการใช้วิธีนี้ อย่างแพร่หลายในการศึกษาโรคที่มีความซับซ้อน เช่น เบาหวาน มะเร็งเต้านม และอัลไซเมอร์ เป็นต้น แต่วิธีการนี้จะลดกำลังของการทดสอบเนื่องจากต้องเลือกตัวอย่างพ่อแม่ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส และขาดข้อมูลการศึกษาในตัวอย่างเป็นโฮโมไซกัส รวมถึงอาจได้ข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อและแม่ไม่ครบในกรณีศึกษาโรคที่แสดงอาการตอนอายุมาก (late onset disorder) (Cardon et al., 2001)

การศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะออทิซึมและยีนต่างๆ มีที่มาจากการศึกษาจีโนมไวต์สแกน การศึกษาหน้าที่ของยีน (functional study) หรือการศึกษาในสมองผู้ป่วย เป็นต้น จากรายงานที่ผ่านมาหลายยีนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง

กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมและกลุ่มควบคุมโดยใช้สปีชีส์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม เช่น ยีน *CNTNAP2* (*contactin associated protein-like 2*) ตำแหน่ง 7q35 ซึ่งมีการเลือกตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึมโดยใช้เกณฑ์อายุที่พูดคำแรก (age at first word) (Alarcon et al., 2008) ยีน *MET* (*met proto-oncogene*) ตำแหน่ง 7q31 ที่ศึกษาสปีชีส์ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ และได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีน *MET* พบว่ามีการสร้างโปรตีนลดลงในผู้ป่วยออทิซึม (Campbell et al., 2006) นอกจากนี้การศึกษาในยีน *RELN* (*reelin*) ตำแหน่ง 7q22 พบว่าจำนวนซ้ำของ GGC ในตำแหน่ง 5' UTR ที่มีจำนวนซ้ำมากกว่า 10 ซ้ำ เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนที่ลดลง (Persico et al., 2006) เป็นต้น

สำหรับปัจจัยอื่น (secondary autism) ที่เป็นสาเหตุของการแสดงพฤติกรรมออทิซึมพบในโรคที่เกิดจากพันธุกรรม เช่น กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (fragile X syndrome) ซึ่งที่พบบ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 1.9-12 และกลุ่มอาการเรตต์ (Rett syndrome) พบประมาณร้อยละ 0.5 สำหรับทูเบอร์ริส สเคอโรซิส (tuberous sclerosis) นิวโรไฟโบรมาโตซิส (neurofibromatosis) ฟีนิลคีโตนูเรีย (phenylketonuria) และความผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal abnormalities) เช่น การมีจำนวนซ้ำเพิ่มขึ้นของโครโมโซม 15q (duplication) พบประมาณร้อยละ 1-2 (Freitag, 2007; Abrahams et al., 2008) นอกจากนี้สาเหตุอื่นของออทิซึมที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม เช่น การรับประทานยาทาลิโดมายด์ กรดวาลโพรอิก การดื่มแอลกอฮอล์หรือการติดเชื้อไวรัสขณะที่มารดาตั้งครรภ์ ซึ่งสาเหตุเหล่านี้พบได้น้อยในกลุ่มออทิซึม อย่างไรก็ตามสภาวะเหล่านี้อาจเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องเนื่องมาจากมีพฤติกรรมที่เหมือนกันกับออทิซึม (phenocopies) (Moore et al., 2000; Williams et al., 2001; Fombonne, 2003)

จากข้อมูลของลักษณะทางคลินิก ลักษณะทางกายวิภาคของสมอง และข้อมูลของแต่ละรายงานที่พบว่ามีหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึม มีการตั้งสมมุติฐานของการเกิดภาวะออทิซึมว่าเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของยีน (gene-gene interaction) และยีนกับสิ่งแวดล้อม (gene-environment interaction) ซึ่งยีนที่สัมพันธ์กับออทิซึมโดยส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของสมองและการสื่อของเซลล์ประสาท กลุ่ม Neurotransmitter transporter เช่น ยีน *SLC6A4* ผลิต serotonin transporter (5-HTT) ที่ทำหน้าที่ในการสื่อของเซลล์ประสาทกับเซลล์อื่น และ GABA (γ -aminobutyric acid) ทำหน้าที่ยับยั้งการสื่อของเซลล์ประสาทในสมองของมนุษย์ ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับ secreted molecules เช่น *RELN* ที่ผลิตโปรตีน reelin ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนที่และการเชื่อมต่อของประสาท นอกจากนี้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครมาตินและการควบคุมการถอดรหัสที่พบในยีนบนโครโมโซมเอกซ์ ได้แก่ *MeCP2* และ *FMR1* เป็นสาเหตุของกลุ่มอาการเรตต์และกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะตามลำดับ เป็นสาเหตุหนึ่งพบในผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมออทิซึม (Persico et al., 2006) โดยข้อมูลของยีนที่คาดว่าก่อให้เกิดภาวะออทิซึมทั้งจากการศึกษาความสัมพันธ์

การถ่ายทอดไปด้วยกัน (transmission disequilibrium) การวิเคราะห์โดยใช้สไนป์ส์ และการผ่าเหล่าของยีนดังรายละเอียดที่แสดงในภาคผนวก ก

กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ

กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ เป็นภาวะปัญญาอ่อนที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุด ความชุกในผู้ชาย 1:4,000-6,000 และผู้หญิง 1:8,000 (Youings et al., 2000) ผู้ป่วยมีภาวะปัญญาอ่อนในระดับปานกลางถึงรุนแรง ค่าเฉลี่ยระดับสติปัญญา (IQ) ประมาณ 20-60 ลักษณะทางคลินิกในเด็กชายอายุน้อยหรือผู้หญิงอาจจะไม่ชัดเจน แต่ในผู้ชายจะเห็นได้ชัดเมื่อเข้าวัยรุ่น ลักษณะทั่วไปที่พบ ได้แก่ หน้ายาว หูกาง และอัมตะโต ผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะมีพฤติกรรมคล้ายออทิซึม เช่น ซนอยู่ไม่นิ่ง เรียนรู้ได้ยาก และมีปัญหาด้านภาษา เป็นต้น (Oostra et al., 2001; Hatton et al., 2006) ชื่อของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ มีที่มาจากจุดแตกหักปรากฏที่ปลายโครโมโซมเอกซ์จากการตรวจโครโมโซม (Cytogenetic analysis) เรียกว่า FRAXA (Fragile site, X chromosome, A site) อยู่บนตำแหน่ง Xq27.3 (Jin and Warren, 2000) สาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (ร้อยละ 99) เนื่องมาจากการเพิ่มของจำนวนซ้ำของไตรนิวคลีโอไทด์ CGG มากเกินปกติ (มากกว่า 200 ซ้ำ) ที่ตำแหน่ง 5' UTR ของเอกซอนแรกในยีน *FMR1* ซึ่งสัมพันธ์กับการเติมหมู่เมทิลมากเกินปกติในตำแหน่ง CpG island ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีน FMRP (fragile X mental retardation 1 protein) (Verkerk et al., 1991)

จำนวนซ้ำ CGG ในคนปกติอยู่ในช่วง 6-40 ซ้ำ คนที่มีอัลลีลในช่วงอินเตอร์มีเดียต (intermediate) มี 41-54 ซ้ำ และคนที่เรียกว่าเป็นพาหะ (premutation) มี 55-200 ซ้ำ นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยประมาณร้อยละ 40 มีความผิดปกติแบบโมเซอิก (mosaicism) ที่อาจมีอัลลีลทั้งในช่วงเป็นโรค พาหะ และปกติ หรือมีทั้งอัลลีลในช่วงที่เป็นโรคที่ถูกเมทิลเลชัน และไม่ถูกเมทิลเลชัน ถึงแม้ว่าคนที่เป็น premutation มีเมทิลเลชันที่ปกติในยีน *FMR1* แต่จำนวนซ้ำของ CGG อาจมีการเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการถ่ายทอดในรุ่นถัดไปผ่านทางมารดา (Feng et al., 1995; Jin and Warren, 2000) ซึ่งโอกาสที่มารดาเป็น premutation มีความเสี่ยงที่กลายเป็นโรคขึ้นกับขนาดของจำนวนซ้ำ หากจำนวนซ้ำ CGG เกิน 100 ซ้ำ มีโอกาสใกล้ร้อยละ 100 ที่จะมีบุตรที่เป็นโรค (Full mutation) แต่จากการรายงานของ Nolin และคณะ (2003) พบว่าจำนวนซ้ำ 59 ซ้ำ มีจำนวนซ้ำต่ำสุดที่เพิ่มขึ้นจนกลายเป็นโรคในช่วงรุ่นเดียว จากรายงานพบว่าคนที่มีอัลลีลในช่วง intermediate ประมาณร้อยละ 10-30 อาจมีโอกาสเพิ่มจำนวนซ้ำเมื่อถ่ายทอดเหมือนคนที่เป็นพาหะ (premutation) (Nolin et al., 2003) และผู้หญิงที่เป็นพาหะร้อยละ 21 ประจำเดือนจะหมดก่อนอายุ 40 ปี (Premature ovarian failure, POF) (Sullivan et al., 2005)

และในผู้ชายมีภาวะทางระบบประสาทมีอาการความจำเสื่อมและสั่นคล้ายโรคพาร์คินสัน เรียกว่า Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) จากการศึกษางานของระบบประสาทระดับโมเลกุลในผู้ป่วย FXTAS พบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอที่มี CGG ที่ยาวทำให้การเคลื่อนที่ของ 40S ribosomal subunit ช้าลง ทำให้ได้ระดับโปรตีนต่ำซึ่งจะส่งสัญญาณให้เพิ่มการถอดรหัสของยีน เมื่อมีการสะสมของเอ็มอาร์เอ็นเอเพิ่มมากขึ้นอาจมีการสะสมในสมอง ซึ่งส่งผลให้มีความผิดปกติในระบบประสาท (neurodegeneration) (Oostra and Willemsen, 2003)

การศึกษาจำนวนซ้ำของ CGG บนยีน *FMR1* ในคนปกติพบว่า มี AGG คั่นในทุกตำแหน่ง 9 หรือ 10 ของจำนวนซ้ำ CGG และที่ปลายทางด้าน 3' จะเป็นจำนวนซ้ำ CGG ที่ยาว ผลของการขาดการคั่นของ AGG มีผลสำคัญต่อการผ่าเหล่าที่มีโอกาสเพิ่มจำนวนซ้ำสูงขึ้นจนเป็นพาหะหรือเป็นโรค อัลลีลในช่วงที่เป็นพาหะจะไม่มี AGG หรือมีเพียง 1 ตำแหน่ง ที่ปลายทางด้าน 5' และที่ปลาย 3' มีจำนวน CGG ที่มีความยาวมากกว่า 34 ซ้ำ ดังนั้นโครงสร้างของจำนวนซ้ำ AGG จึงมีบทบาทสำคัญในการรักษาเสถียรภาพขณะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication) เพื่อป้องกันการโผล่ของดีเอ็นเอ (DNA slippage) ในช่วงไมโอซิสหรือก่อน embryonic development (Eichler et al., 1996; Crawford et al., 2000; Jin and Warren, 2000)

ช่วงเวลาและกลไกที่เกิดเมธิลเลชันในยีน *FMR1* ยังไม่ทราบชัดเจน การศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่าอัลลีลของ intact ovaries ของตัวอ่อนระยะฟีตัส (fetus) ที่เป็นกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะามีจำนวนซ้ำ CGG ที่อยู่ในช่วงเป็นโรคแต่ยังไม่มีเมธิลเลชัน และจากการศึกษาในชั้นเนื้อรกในช่วงเวลาของการพัฒนาที่แตกต่างกันพบว่ามี ความแตกต่างของแต่ระดับของเมธิลเลชัน ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเวลาการเกิดเมธิลเลชันเกิดในช่วงกว้างและมีความต่อเนื่อง ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาตัวอ่อนระยะฟีตัส (fetus) ผู้ชายที่เป็นกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะาไม่พบเมธิลเลชันในชั้นเนื้อรก (chorionic villi) ที่มีอายุ 10 สัปดาห์ แต่พบเมธิลเลชันในเนื้อเยื่อของตัวอ่อน (Sutherland et al., 1991) ซึ่งไม่แตกต่างจากการศึกษาของ Sutcliffe และคณะ (1992) ที่พบเมธิลเลชันไม่ครบทุกเซลล์ (mosaic methylation pattern) ในชั้นเนื้อรกของฟีตัสผู้ชายที่เป็นกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะาอายุ 11 สัปดาห์ แต่จากการตรวจชั้นเนื้อฟีตัสในตัวอย่างเดียวกันเมื่ออายุ 13 สัปดาห์ พบเมธิลเลชันแบบสมบูรณ์ และรายงานของ Willemsen และคณะ (2002) ที่ศึกษาปริมาณโปรตีน FMRP พบว่ามีการแสดงออกปกติในชั้นเนื้อรกในฟีตัสผู้ชายที่เป็นกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะาอายุ 10 สัปดาห์ แต่โปรตีนหายไปเมื่ออายุ 12.5 สัปดาห์ และในผู้หญิงที่เป็นโรคตรวจพบทั้งชั้นเนื้อรกที่มีการแสดงออกของโปรตีน FMRP และไม่มีแสดงออกเมื่ออายุมากกว่า 13 สัปดาห์ ซึ่งเกิดจากการกวดการทำงานของโครโมโซมเอกซ์แบบสุ่ม (random X-inactivation) กลไกของเมธิลเลชันในกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะาจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อมีการเติมหมู่เมธิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 บนวงแหวนไซโตซีนในตำแหน่งที่ C ติดกับ G (CpG) โดยเอนไซม์ DNA

methyltransferase โปรตีน MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) จะเข้าไปจับกับหมู่เมธิลบนดีเอ็นเอ และมีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนฮิสโตนโดย histone deacetylase และ histone methyltransferase ทำให้โครมาตินมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีการจับกันแน่นขึ้นระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีน รวมถึงการจับของ transcriptional repressor ส่งผลให้ transcription factor ไม่สามารถเข้ามาจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์จึงยับยั้งการแสดงออกของยีน (Costello and Plass, 2001; Fuks et al., 2003; Wade, 2005)

โปรตีน FMRP มีความสำคัญต่อการพัฒนาของสมอง (brain development) เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการสื่อของเซลล์ประสาท (synaptogenesis) ใน cerebral cortex cerebellum hippocampus และ synaptic pruning (Comery et al., 1997; Irwin et al., 2000; Oostra and Willemsen, 2003) ดังนั้นพัฒนาการล่าช้าในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เพราะมีสาเหตุเบื้องต้นจากการขาดโปรตีน FMRP และในผู้หญิงจะมีการแสดงอาการที่น้อยกว่าผู้ชายเนื่องจากมีโครโมโซมเอกซ์ 2 แท่ง ซึ่งอาจมียีน *FMR1* ที่ปกติอยู่บนโครโมโซมเอกซ์ที่ทำงาน (active) จึงมีการสร้างโปรตีน FMRP ได้บ้าง ดังนั้นผู้หญิงที่เป็นโรคเพียงร้อยละ 50-71 ที่พบความบกพร่องของสติปัญญาที่แสดงออกอย่างชัดเจน (de Vries et al., 1996)

มีรายงานน้อยกว่าร้อยละ 1 ที่พบความผิดปกติของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เพราะที่เกิดจากการผ่าเหล่าแบบ point mutation หรือการขาดหายไปไนยีน *FMR1* (de Boulle et al., 1993; Lugenbeel et al., 1995; Wöhrle et al., 1992; Meijer et al., 1994; Trottier et al., 1994; Hirst et al., 1995; de Graaff et al., 1995; Quan et al., 1995; Parvari et al., 1999) ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. การผ่าเหล่าในตำแหน่งที่แปลงเป็นโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอใน ยีน *FMR1* ที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ

ผู้รายงาน	การผ่าเหล่า
de Boulle et al., 1993	Exon 11 c.38395 A>T p.Ile367Asn
Lugenbeel et al., 1995	Exon 5 c.30814delA p.Thr125fs
	Exon 2 g.23714_23715GG>TA
Wöhrle et al., 1992	การขาดหายไป ~250 kb ครอบคลุมตั้งแต่ 5' UTR ถึง เอกซอนที่ 5
Meijer et al., 1994	การขาดหายไป 1.6 kb ครอบคลุมตำแหน่งโปรโมเตอร์ ถึงตำแหน่ง CGG repeat
Trottier et al., 1994	การขาดหายไปของบางส่วนของยีน <i>FMR1</i> และส่วน upstream ของโปรโมเตอร์ 70-100 kb
Hirst et al., 1995	การขาดหายไป 660 bp ครอบคลุมตำแหน่งโปรโมเตอร์ ถึงตำแหน่ง CGG
	การขาดหายไปของยีน 25 kb ครอบคลุมตั้งแต่ 5' UTR ถึงเอกซอน 11
de Graaff et al., 1995	การขาดหายไป 75-53 bp ใกล้กับตำแหน่ง CGG repeat
Quan et al., 1995	การขาดหายไป 9 Mb ตำแหน่ง Xq26.3-Xq28
Parvari et al., 1999	การขาดหายไป 8.5 Mb ตำแหน่ง Xq27.1-Xq28

del: deletion

fs: frameshift mutation

ยีน *FMR1*

ยีน *FMR1* ประกอบด้วย 17 เอกซอน ความยาวประมาณ 38 กิโลเบส อยู่บนโครโมโซมเอกซ์ตำแหน่ง Xq27.3 และพบตำแหน่ง splicing หลายตำแหน่งทางด้าน 3' จำนวนซ้ำของ CGG อยู่ในเอกซอนแรกของ 5' UTR ซึ่งอยู่ห่างจาก CpG island ที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีน *FMR1* ประมาณ 250 คู่เบส (Verkerk et al., 1991; Eichler et al., 1993) การศึกษาตำแหน่งการควบคุมการถอดรหัส (transcription regulation) โดยใช้วิธี footprint analysis พบว่ามีหลายตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่ transcription factor เข้าจับ ได้แก่ α -PAL/NRF Sp1 H4TF1/Sp1-like และ c-myc เป็นต้น ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 91 คู่เบส (-131 ถึง -30) ของโปรโมเตอร์ที่ตั้งอยู่ทางด้านบนห่างจากตำแหน่ง transcription start site ประมาณ 40 คู่เบส ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งของ cis-regulatory element ในการแสดงออกของยีน (Drouin et al., 1997) จากการศึกษาของ Beilina และคณะ (2004) ใช้วิธี 5' RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends) เพื่อทดสอบว่าจำนวนซ้ำ CGG มีผลต่อตำแหน่งที่เริ่มต้นการถอดรหัส (transcription site) พบว่ามีหลายตำแหน่งที่อยู่ในช่วงความยาวประมาณ 50 คู่เบส ซึ่งอยู่ก่อนตำแหน่งจำนวนซ้ำ CGG ประมาณ 130 คู่เบส ซึ่งถ้าเป็นอัลลีล CGG ปกติจะมีจุดเริ่มการถอดรหัสตำแหน่งเดียวกัน หากเป็นอัลลีลในช่วง premutation ตำแหน่งการเริ่มต้นการถอดรหัสจะอยู่ก่อนหน้าตำแหน่งปกติ จากผลการศึกษานี้ CGG อาจจะเป็น enhancer หรือ modulator ของการถอดรหัส

ยีน *FMR1* มีส่วนอนุรักษ์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบแต่ละสปีชีส์ พบความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ระหว่างมนุษย์และหนูร้อยละ 95 ในตำแหน่งที่มีการถอดรหัส (open reading frame, ORF) และมีกรดอะมิโนเหมือนกันร้อยละ 97 เช่นเดียวกับที่ศึกษาในไก่ *Xenopus leavis* และลิงที่มีจำนวนซ้ำ CGG ในตำแหน่ง 5' UTR เช่นกันแต่มีจำนวนซ้ำน้อยกว่าที่พบในมนุษย์ จากการศึกษาความเหมือนกันระหว่างสปีชีส์ในตำแหน่ง 5' UTR และ 3' UTR พบว่าเป็นตำแหน่งที่ควบคุมการทำงานของยีน (regulatory function) (reviewed in Oostra and Chiurazzi, 2001)

เอ็มอาร์เอ็นเอมีขนาด 4.4 กิโลเบส และโปรตีน FMRP มีหลายไอโซฟอร์มซึ่งมีความยาวสูงสุด 632 กรดอะมิโน มวล 70-80 กิโลดาลตัน (reviewed in Oostra and Chiurazzi, 2001) กรดอะมิโนประกอบด้วย RNA-binding motif 2 แบบ ได้แก่ ribonucleoprotein K homology domains และ arginine glycine glycine residues (RGG boxes) โดย ribonucleoprotein K homology domains มีทั้ง nuclear localization signal (NLS) และ nuclear export signal (NES) FMRP จึงเคลื่อนที่ระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม การศึกษาการผ่าเหล่าของโปรตีน FMRP ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่ง 304 จาก

Isoleucine เป็น Asparagine (Ile304Asn) ที่อยู่ใน KH domain ตำแหน่งที่ 2 ทำให้มีการม้วนผิดปกติของตำแหน่ง KH domain (de Boulle et al., 1993)

โปรตีน FMRP จับกับอาร์เอ็นเอในรูปของ messenger ribonucleoprotein complex ที่จับกับ polyribosome (Schaeffer et al., 2003) จากการศึกษานี้ของ Sung และคณะ (2000) พบ mRNA ของสมองที่จับกับ FMRP ได้แก่ NT2 EST และ Tip60a และการศึกษาของ Brown และคณะ (2001) โดยใช้ microarray พบการจับของโปรตีน FMRP กับ mRNA ของโปรตีนที่สำคัญในสมอง เช่น semaphorin Microtubule-associated protein (MAP1B) และ NAP22 เป็นต้น ซึ่งพบในปลายของแอกซอนและ dendritic spines ซึ่งโปรตีน FMRP ยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น (post-transcriptional control) เช่น จากการศึกษาเมื่อไม่มี FMRP การแปลรหัสของ human Elongation Factor-1A จะถูกยับยั้ง (Sung et al., 2003)

โปรตีน FMRP พบในหลายอวัยวะแต่พบส่วนใหญ่ในระบบประสาทส่วนกลางและอวัยวะ โดยถูกสังเคราะห์มากใน dendritic spine เพื่อตอบสนองต่อการสื่อของเซลล์ประสาท (synaptic activity) โดย metabotropic glutamate agonist ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของการจับกันของ polyribosome และกระตุ้นการสร้างโปรตีน FMRP และจากการศึกษาของ Comery และคณะ (1997) พบ dendritic spine ที่มีขนาดยาวและรูปร่างผิดปกติในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะและในหนูทดลอง (Knockout mice)

ความสัมพันธ์ของออทิซึมและกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ

พฤติกรรมของผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่คล้ายคลึงกับออทิซึม ไม่สามารถจำแนกผู้ป่วยบางรายโดยเฉพาะในเด็กเล็ก ได้แก่ ปัญหาทางด้านภาษา ไม่ชอบการสัมผัส ไม่สบตา การตื่นกลัวสังคม และการทำมือซ้ำๆ เป็นต้น (Bailey et al., 1998; Feinstein et al., 1998; Hatton et al., 2006; Rogers et al., 2001; Roberts et al., 2007) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง IQ และพฤติกรรมออทิซึมในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะพบข้อมูลที่แตกต่างในแต่ละการศึกษา บางการศึกษารายงานว่าผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่มีพฤติกรรมออทิซึมร่วมด้วยมักมี IQ ต่ำกว่า (Kau et al., 2004) หรือมีพัฒนาการล่าช้ากว่าผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะอย่างเดียว (Bailey et al., 2000; Rogers et al., 2001) แต่การศึกษาของ Mazzocco และคณะ (1997) ที่ศึกษาในคนที่เป็นกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง IQ กับพฤติกรรมออทิซึม แต่ผู้ป่วยออทิซึมที่ไม่ทราบสาเหตุมีพฤติกรรมปรับตัว (adaptive behaviour) ผิดปกติน้อยกว่าผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่มีออทิซึมร่วมด้วยเมื่อเปรียบเทียบในอายุที่ใกล้เคียงกัน (Kau et al., 2004) นอกจากนี้ Bailey และคณะ (2001) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน FMRP และพฤติกรรมออทิซึมในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ ซึ่งเป็นหลักฐานว่าอาจมีหลายยีนหรือปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับยีน *FMR1* ต่อพฤติกรรมออทิซึม

ความถี่ของพฤติกรรมออทิซึมในผู้ชายกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะมีการรายงานครั้งแรกโดย Brown และคณะ (1982) พบประมาณร้อยละ 18.5 (reviewed in Brown et al., 1986) ต่อมา มีการสนใจศึกษาเพิ่มมากขึ้น จากการรายงานพบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในเด็กผู้ชายมีพฤติกรรมออทิซึมที่ครบทั้ง 3 ด้านหลักประมาณร้อยละ 16-47 ดังแสดงในตารางที่ 2 (Brown et al., 1982; Hagerman et al., 1986; Reiss and Freund, 1990; Bailey et al., 1998; Rogers et al., 2001; Demark et al., 2003; Kaufmann et al., 2004; Hatton et al., 2006; Clifford et al., 2007) และในผู้หญิงที่มีกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะพบร้อยละ 3-9.7 (Mazzocco et al., 1997; Bailey et al., 1993; Clifford et al., 2007) ซึ่งน้อยกว่าที่มีการรายงานในผู้ชาย อาจจะเป็นเนื่องจากเป็นกลุ่มอาการ X-linked แต่อย่างไรก็ตาม แต่ละการศึกษามีความหลากหลายของวิธีการในการทดสอบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะและออทิซึม ซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบผลระหว่างการศึกษได้

ตารางที่ 2. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่มีพฤติกรรมออทิซึม

ผู้รายงาน	ร้อยละที่พบความผิดปกติ	เกณฑ์วินิจฉัยออทิซึม	การตรวจพบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ
Brown et al., 1982	18.5 (5/27)	N/A	ร้อยละ 3 ของเซลล์จากการตรวจโครโมโซม
Hagerman, 1986	16 (8/50)	DSM-III, ABC, E2	ร้อยละ 3 ของเซลล์จากการตรวจโครโมโซม
Reiss and Freund, 1990	17.6 (3/17)	DSM-III-R	N/A
Bailey et al., 1998	25 (14/ 57)	CARS	การทดสอบดีเอ็นเอ
Rogers et al., 2001	33 (8/24)	ADOS-G, ADI-R, DSM-IV	การทดสอบดีเอ็นเอ
Demark et al., 2003	47 (7/15)	CARS	การทดสอบดีเอ็นเอ
Kaufmann et al., 2004	25 (14/56)	ADI-R	เซาท์เทิร์นบลอท
Hatton et al., 2006	25.9 (33/129)	CARS	การทดสอบดีเอ็นเอ
Clifford et al., 2007	18 (6/33)	ADOS-G, ADI-R	การทดสอบดีเอ็นเอ

ABC: Autism Behaviour Checklist

ADI-R: Autism Diagnostic Interview-Revised

ADOS-G: Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic

CARS: Childhood Autism Rating Scale

DSM: the diagnostic and statistical manual of mental disorders

E2: Diagnostic Checklist for Behaviour Disturbed Children

N/A: not available

การทดสอบดีเอ็นเอ: ในรายงานที่อ้างอิงไม่ได้ระบุวิธีการทดสอบที่ชัดเจนในการตรวจสอบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะว่าเป็นวิธีพีซีอาร์หรือเซาท์เทิร์นบลอทหรือวิธีอื่น ๆ

ในขณะที่เดียวกันมีการศึกษาความถี่ของผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมออทิซึมที่มีสาเหตุจากกลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะด้วยวิธีการตรวจโครโมโซม ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่การทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือน้อยและไม่สามารถเปรียบเทียบระหว่างการศึกษได้ เนื่องจากการกำหนดเกณฑ์การตรวจสอบแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา เช่น บางการศึกษา กำหนดการพบตำแหน่งโครโมโซมเอ็กซ์เปราะ FRAXA ร้อยละ 1 ของเซลล์ทั้งหมด ในขณะที่บางการศึกษา กำหนดเป็นร้อยละ 4 ของเซลล์ทั้งหมด

ตารางที่ 3. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายที่มีพฤติกรรมออทิซึมจากสาเหตุความผิดปกติของโครโมโซมตำแหน่ง Xq27.3 ด้วยวิธีการตรวจโครโมโซม

ผู้รายงาน	ร้อยละที่พบความผิดปกติ	เกณฑ์วินิจฉัยออทิซึม	การตรวจโครโมโซมพบโครโมโซมเอ็กซ์เปราะคิดเป็นร้อยละ
Blomquist et al., 1985	16 (13/83)	DSM-III	1
Brown et al., 1986	7.7 (47/ 614)	DSM-III	3
Fisch et al., 1986	12.5 (18/144)	DSM-III	1
McGillivray et al., 1986	7.3 (3/41)	DSM-III	N/A
Ho and Kalousek, 1989	2.2 (1/45)	DSM-III	4
Payton et al., 1989	2.4 (2/85)	DSM-III	1
Piven et al., 1991	2.6 (2/75) 1.3 (1/75)	DSM-III-R	40 1
Li et al., 1993	7.7 (8/ 104)	DSM-III	1-46 (ยืนยันด้วยวิธีเซาท์เทิร์นบลอต)*
Bailey et al., 1993	1.6 (2/125)	ADI	4
Estecio et al., 2002	11 (2/19)	DSM-IV	N/A (ยืนยันด้วยวิธีพีซีอาร์)*

* การยืนยันผลด้วยวิธีเซาท์เทิร์นบลอตและพีซีอาร์ทดสอบในบางตัวอย่างที่พบโครโมโซมเอ็กซ์เปราะที่พบมากในเซลล์ เช่น พบร้อยละ 46

วิธีการตรวจในระดับดีเอ็นเอ เช่น พีซีอาร์ (PCR) และเซาท์เทิร์นบลอต (Southern blot) ถูกนำมาใช้แทนการตรวจความผิดปกติโครโมโซมเนื่องจากให้ผลที่ถูกต้องมากกว่า จากการศึกษาดังนี้พบความผิดปกติของยีน *FMR1* ในผู้ชายที่เป็นออทิซึมประมาณร้อยละ 1.9-12 (Gurling et al., 1997; Reddy, 2005; Brown et al., 2004) ดังรายละเอียดในตารางที่ 4 แต่อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่ไม่พบความผิดปกติของยีน *FMR1* ในออทิซึม (Hallmayer et al. 1994; Holden et al., 1996; Gurling et al., 1997; Klauck et al., 1997; Poon et al., 1998)

ตารางที่ 4. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายที่มีพฤติกรรมออทิซึมที่มีสาเหตุจากความผิดปกติของยีน *FMR1* ด้วยการทดสอบดีเอ็นเอ

ผู้รายงาน	ร้อยละที่พบความผิดปกติ	เกณฑ์วินิจฉัยออทิซึม	การตรวจสอบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะด้วยการทดสอบดีเอ็นเอ
Gurling et al., 1997	12 (3/ 25)	N/A	เซาท์เทิร์นบลอตและพีซีอาร์
Reddy, 2005	2.2 (7/ 316)	N/A	เซาท์เทิร์นบลอตและพีซีอาร์
Brown et al., 2004	1.9 (6 ครอบครัวใน 312 ครอบครัว AGRE)	N/A	พีซีอาร์
Hallmayer et al., 1994	0 (0 ครอบครัว ใน 35 ครอบครัว multiplex)	ADI ADOS และ ICD 10	เซาท์เทิร์นบลอตและพีซีอาร์
Holden et al., 1996	0 (0 ครอบครัว ใน 19 ครอบครัว multiplex)	ADI ADOS และ ABC	เซาท์เทิร์นบลอตและพีซีอาร์

ตารางที่ 4. ความถี่ของผู้ป่วยผู้ชายที่มีพฤติกรรมออทิสซึมที่มีสาเหตุจากความผิดปกติของยีน *FMR1* ด้วยการทดสอบดีเอ็นเอ (ต่อ)

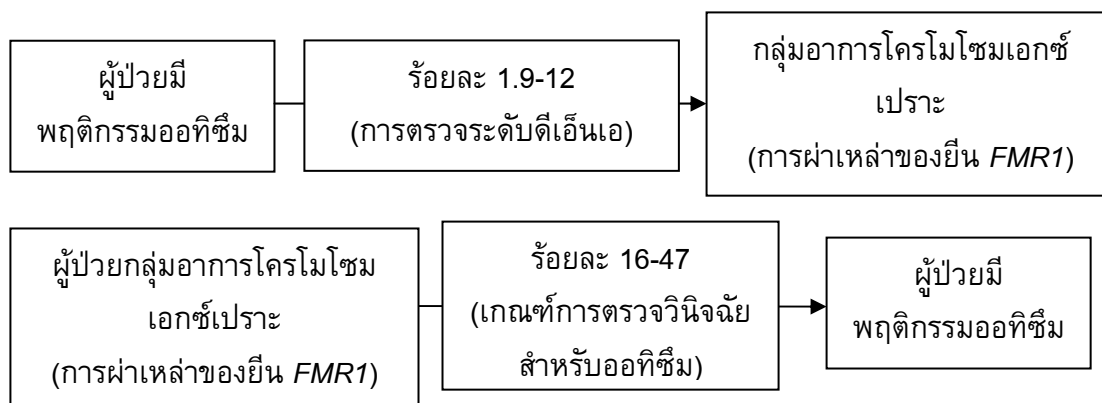
ผู้รายงาน	ร้อยละที่พบความผิดปกติ	เกณฑ์วินิจฉัยออทิสซึม	การตรวจสอบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เพราะด้วยการทดสอบดีเอ็นเอ
Gurling et al., 1997	0 (0 ครอบครัว ใน 25 ครอบครัว multiplex)	N/A	เซาท์เทิร์นบลอต
Klauck et al., 1997	0 (0 ครอบครัว ใน 105 ครอบครัว simplex และ 18 ครอบครัว multiplex)	ADI และ ADOS	เซาท์เทิร์นบลอต และพีซีอาร์
Poon et al., 1998	N/A	N/A	เซาท์เทิร์นบลอต และพีซีอาร์

ครอบครัว simplex: ครอบครัวที่มีบุตรออทิสซึม 1 คน

ครอบครัว multiplex: ครอบครัวที่มีบุตรออทิสซึมมากกว่า 1 คน ขึ้นไป

AGRE: autism genetic resource exchange

ในปัจจุบัน การตรวจระดับดีเอ็นเอของความผิดปกติในยีน *FMR1* เป็นการตรวจกรองเบื้องต้นในผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมออทิสซึมเนื่องจากเป็นวิธีที่เชื่อถือได้ และสะดวกกว่าการตรวจโครโมโซม และได้สรุปการรายงานความถี่ของสัมพันธ์ระหว่างออทิสซึมและความผิดปกติของยีน *FMR1* ในผู้ชายดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. ความถี่ของผู้ป่วยชายที่มีพฤติกรรมออทิสซึมซึ่งตรวจพบการผ่าเหล่าในยีน *FMR1* และผู้ป่วยชายกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะที่มีพฤติกรรมออทิสซึม

ความสัมพันธ์ของออทิสซึมและยีน *FMR1*

การศึกษาความผิดปกติของยีน *FMR1* ที่อาจเป็นสาเหตุของออทิสซึม นอกเหนือจากการศึกษาการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ CGG และการเมธิลเลชันที่ผิดปกติในยีน *FMR1* แล้ว ยังมีการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว (linkage study) โดย Hallmayer และคณะ (1994) ศึกษาการถ่ายทอดของยีน *FMR1* ใน 35 ครอบครัวที่เป็นออทิสซึม โดยใช้ ไมโครแซตเทลไลท์ 6 ตำแหน่ง ได้แก่ DXS548 FRAXAC1 FRAXAC2 CGG repeat DXS998 และ DXS1126 ไม่พบหลักฐานว่ายีน *FMR1* เป็นสาเหตุของออทิสซึม และในปี พ.ศ. 2539 (ค.ศ. 1996) Vincent และคณะ ได้ทำการศึกษาการผ่าเหล่าโดยใช้วิธีเอสเอสซีพี (single-stranded conformation polymorphism, SSCP) ทั้ง 17 เอกซอน แต่ไม่พบความสัมพันธ์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2547 (ค.ศ. 2004) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ (association study) ของสไนป์ IVS10 ในอินทรอน 10 ในผู้ป่วยออทิสซึม AGRE ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งการศึกษาในครอบครัวและในประชากรทั่วไป (Vincent et al., 2004) นอกจากนั้น Shinahara และคณะ (2004) มี การศึกษาโดยใช้วิธี polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) ในทุกเอกซอนของยีน *FMR1* gene ในคนญี่ปุ่นที่เป็นออทิสซึมพบเพียงว่ามีการผ่าเหล่าการแทนที่ของเบส A เป็น C ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 879 ในเอกซอน 9 ซึ่งอยู่ในตำแหน่ง splicing ที่อาจส่งผลให้ผลิตโปรตีนที่ผิดปกติ แต่ยังไม่ใช่หลักฐานที่สำคัญที่บ่งชี้ว่ายีน *FMR1* สัมพันธ์กับออทิสซึม แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้สไนป์ในยีน *FMR1* กับออทิสซึมมีการรายงานน้อยมาก จากการสืบค้นข้อมูลพบเพียงรายงานของ Vincent และคณะ (2004) เท่านั้น

เครื่องหมายพันธุกรรม

ในปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายพันธุกรรม เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ และสไนป์ส มาใช้ในการศึกษาหาสาเหตุของโรคหรือตำแหน่งที่น่าจะก่อให้เกิดโรค สไนป์สมีข้อดีกว่าไมโครแซทเทลไลท์ คือ มีอัตราการผ่าเหล่าน้อยกว่าและมีจำนวนที่ครอบคลุมในยีนที่หนาแน่นมากกว่า และวิธีการศึกษาจีโนมไทป์ของสไนป์สยังเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่าย เช่น PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) และ Biallelic-ARMS PCR เป็นต้น (Ye et al., 2001; Brightwell et al., 2002a) นอกจากนี้ Brightwell และคณะ (2002b) ได้สร้างแผนที่สไนป์สที่ครอบคลุมตำแหน่ง FRAX ความยาวประมาณ 2.6 เมกกะเบส พบสไนป์สทุกประมาณ 1024 คู่เบส โดยฐานข้อมูลของสไนป์สมีการรายงานในเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) ดังแสดงในภาคผนวก ก

สำหรับการศึกษาสไนป์สในยีน *FMR1* ที่ผ่านมาส่วนใหญ่นำไปใช้ในการหาสาเหตุของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ เช่น ตำแหน่งของ *cis* acting factor ที่อาจเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงทำให้เพิ่มจำนวนซ้ำ CGG (Ennis et al., 2007) หรือแฮพโลไทป์ที่จำเพาะกับคนที่เป็นโรค (Gunter et al., 1998; Crawford et al., 2000) การศึกษาสไนป์สแฮพโลไทป์ในคนไทยโดย Limprasert และคณะ (2001) ใช้ทั้งไมโครแซทเทลไลท์ (DXS548 FRAXAC1 และ FRAXE) และสไนป์ส (ATL1 และ IVS10+14C/T) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะและกลุ่มควบคุม การศึกษาต่อมาในปี พ.ศ. 2550 (ค.ศ. 2007) Thanakitgosate ได้เลือกสไนป์สเพิ่มเติม ได้แก่ WEX5 ในตำแหน่ง 5' UTR และ rs25731 rs25702 และ rs25723 ในอินทรอน 3 13 และ 16 ตามลำดับ แต่ยังไม่พบความสัมพันธ์ของสไนป์สแฮพโลไทป์ของยีน *FMR1* กับกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวมีประโยชน์ในการนำสไนป์สที่มีรายงานแล้วว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ในคนไทยและมีการถ่ายทอดไปด้วยกัน (linkage disequilibrium) มาศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* กับออทิซึม โดยในการศึกษานี้ได้เลือกสไนป์สเพิ่มเติมในตำแหน่ง 5' UTR ที่คาดว่าจะอาจมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งการศึกษารั้งนี้ เป็นครั้งแรกที่ศึกษา ยีน *FMR1* ที่อาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมในการทำให้เกิดออทิซึมในผู้ป่วยผู้ชายคนไทยที่มีภาวะออทิซึมโดยใช้สไนป์สที่ครอบคลุมทั่วทั้งยีน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึม
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์และแฮพโลไทป์ของยีน *FMR1* ในผู้ป่วยออทิซึม

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

วัสดุ

ตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึมและกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างผู้ป่วย

เก็บข้อมูลทางคลินิกรวมทั้งประวัติเชื้อชาติและภูมิลำเนา 3 ชั่วรุ่นในตัวอย่างผู้ป่วยโดยกุมารแพทย์ด้านพัฒนาการเด็กจาก 2 สถาบันที่เข้าร่วมวิจัยคือโรงพยาบาลรามาริบัติและมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้ป่วยทั้งหมด 151 ราย ประกอบด้วย ผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 108 ราย และผู้ป่วย PDD-NOS จำนวน 43 ราย โดยผู้ป่วยทุกรายในโครงการเป็นตามข้อกำหนดดังนี้

- (1) ผ่านการตรวจตามเกณฑ์ Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV) ว่าเป็นผู้ป่วยออทิซึม หรือ PDD-NOS (Pervasive developmental disorder-not otherwise specified)
 - (2) ไม่มีประวัติคลอดผิดปกติ และไม่มีประวัติการติดเชื้อทางสมอง
 - (3) ไม่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับกลุ่มอาการที่ชัดเจน เช่น กลุ่มอาการดาวน์ Prader-Willi syndrome และ Tuberous sclerosis
 - (4) ทุกรายมีผลการตรวจโครโมโซมปกติ ในผู้ชายที่มีอาการชักมีผลการตรวจ common mutation ในยีน ARX ปกติ
 - (5) ในผู้หญิงมีผลการตรวจ common mutation ในยีน MECP2 ปกติ
 - (6) ผู้ปกครองยินยอมเข้าร่วมโครงการ และมี Informed consent
- ผู้ป่วยทั้งหมดมีอายุเฉลี่ยของ 4 ปี 3 เดือน \pm 2 ปี 3 เดือน และผู้ป่วยได้ผ่านการตรวจวัดพฤติกรรมโดยใช้ Vineland Adaptive Behaviour Scales (VABS) และมีผลทดสอบ non-verbal IQ (Binet-V) จำนวน 115 ราย ได้ผลเฉลี่ย 65.21 ± 16.83

ตัวอย่างกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างกลุ่มควบคุมนำมาจากคลังเลือดของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 212 ราย โดยทุกรายผ่านการซักประวัติว่าไม่มีปัญหาทางจิตเวชและพัฒนาการผิดปกติที่ชัดเจนใน 3 รุ่น โดยพิจารณาว่าไม่มีประวัติการรักษาในโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่องหรือต้องทานยาเพื่อลดปัญหาสุขภาพจิตหรือปัญหาเรื่องเรียนหนังสือไม่ได้ นอกจากนี้ยังเก็บประวัติภูมิสำเนาและเชื้อชาติตั้งแต่ปู่ย่าตายายลงมาเพื่อให้ได้กลุ่มควบคุมที่มีพื้นฐานใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยมากที่สุดและต้องมีอัตราส่วนระหว่างผู้ป่วยชายต่อผู้หญิงเป็นสัดส่วนใกล้เคียงกับตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา แต่ไม่จำเป็นต้องมีการจับคู่อายุระหว่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม (age match) เพราะกลุ่มควบคุมในการศึกษานี้ต้องการผู้ที่ไม่เป็นออทิซึมจึงเลือกผู้ที่มีอายุผ่านจุดที่จะมีโอกาสเกิดออทิซึมได้ (beyond age of onset) เนื่องจากออทิซึมมีอาการตั้งแต่วัยเด็ก จึงเลือกกลุ่มที่สามารถให้ consent ได้เองคือมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี ลักษณะยีนที่ใช้ในการศึกษาจะไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุ (แม้จะมีโอกาสเกิด mutation ได้แต่เป็นส่วนน้อยมาก ในทางทฤษฎีถือว่ายอมรับได้และในการปฏิบัติไม่มีกลุ่มควบคุมที่ดีที่สุดแต่จะเลือกที่ทำได้มากที่สุดในการคัดเลือกเท่านั้น)

นอกจากนั้นได้มีการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ชายที่ไม่เป็นโรคที่มีภูมิสำเนาในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคละ 50 คน เพื่อนำมาศึกษาการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในคนไทย

ตัวอย่างเลือดทั้งกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานฟินอล-คลอโรฟอร์ม

ตารางที่ 5. จำนวนผู้ป่วยออทิซึม ผู้ป่วย PDD-NOS และกลุ่มควบคุม

ตัวอย่าง	เพศ (ราย)		ทั้งหมด
	ชาย	หญิง	
ผู้ป่วยออทิซึม	89	19	108
ผู้ป่วย PDD-NOS	39	4	43
ผู้ป่วยทั้งหมด	128	23	151
กลุ่มควบคุม	152	60	212

ไพรมเมอร์

ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วย 2 ชุดหลัก ได้แก่ ชุดที่ 1 ใช้สำหรับการตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ 3 วิธี ได้แก่ พีซีอาร์สำหรับทดสอบจำนวนซ้ำ CGG แบบใช้ไพรอไบริไดส์เซชันตามวิธีการของ Brown และคณะ (1993) และ ฟลูออเรสเซนซ์ออกแบบโดย Sripo และคณะ (2007) การทดสอบด้วยวิธีเมธิลเลชันสเปซิฟิกพีซีอาร์ (Methylation-Specific PCR) อ้างอิงตาม Zhou และคณะ (2004) นอกจากนี้มีไพรมเมอร์อีก 1 คู่ ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อยืนยันผลการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG โดยวิธีหาลำดับเบส (DNA sequencing) ดังรายละเอียดในตารางที่ 6

ไพรมเมอร์ชุดที่ 2 ใช้สำหรับการศึกษาจีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งสปีส์ที่ออกแบบเพื่อทดสอบด้วยวิธีไบอัลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ (Biallelic-ARMS PCR) โดย WEX44 และ WEX82 ได้ออกแบบในการศึกษานี้ WEX70 อ้างอิงจาก Ennis และคณะ (2007) WEX5 และ rs25702 ออกแบบโดย Thanakitgosate (2007) ATL1 จาก Brightwell และคณะ (2002a) ยกเว้นไพรมเมอร์ ATL1GR อ้างอิงจาก Curlis และคณะ (2005) ดังรายละเอียดในตารางที่ 7

ตารางที่ 6. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการตรวจ
กรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ

ลำดับ ที่	ชื่อ	ลำดับดีเอ็นเอ (5'-3')	วิธีการ ทดสอบ
1	1	GACGGAGGCGCCGCTGCCAGG	พีซีอาร์สำหรับ ทดสอบจำนวน ซ้ำ CGG
2	3	GTGGGCTGCGGGCGCTCGAGG	
3	FRAXA- PSUF	6FAM-CAGCGTTGATCACGTGACGTGGTTTCA GTG	พีซีอาร์ฟลูออ เรสเซนซ์ สำหรับทดสอบ จำนวนซ้ำ CGG
4	FRAXA- PSUR	GATGGGGCCTGCCCTAGAGCCAAGTA	MS-PCR (mTP-PCR) สำหรับทดสอบ ผู้หญิง
5	mTP-F	GCCGCTACCAAAAACGTACGACAACGCG	สำหรับทดสอบ ผู้หญิง
6	mTP-R	TACCGATACGCATCCCAGTTTGTGTCAGC(TCG)8	
7	Tail-R	TACCGATACGCATCCCAGTTTGTGTCAGC	DNA sequencing
8	FRAXA- PSUF	CAGCGTTGATCACGTGACGTGGTTTCAGTG	
9	FRAXA- PSUR	GATGGGGCCTGCCCTAGAGCCAAGTAC	

ตารางที่ 7. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับทดสอบจีโนม
ไทป์ของสหรับป์

ลำดับ ที่	ชื่อ	ลำดับดีเอ็นเอ (5'-3')	ออกแบบโดย
1	WEX44F	CTATCTGGGGGCAAATGAACCATAG	การศึกษานี้
2	WEX44R	CTCTGAGTTTACGCTCCCCAG	
3	WEX44TF	ACAGTATAGACCATGATGGAAACACCT	
4	WEX44GR	GAGAATAGTTTCAGTTTCTCAGTTTAAATTC	
5	WEX70F	GGAGTTATTGTCCTATACAGCAGTTGTCCC	Ennis et al., 2007
6	WEX70R	GATGGGAGATGATTTTGGGATAAAATT	
7	WEX70TF	CTGTCAGATCATCAGGCATTAATTTTAAT	
8	WEX70CR	AGTTCACGATAGGTTTACACGCATG	
9	WEX82F	GACAACCCATAATCTGTCATTGG	การศึกษานี้
10	WEX82R	CCACCAGTACTTCCTAATGATA	
11	WEX82CF	TATAACCATGTAAAAAGATCTTCAATC	
12	WEX82TR	CCTCTGATTATTAATTTATTAATGCA	
13	WEX5F	GAATGTGGCCCTAGATCCAC	Thanakitgosate, 2007
14	WEX5R	GTGCTAACGAGAAATCGGTG	
15	WEX5CF	CTTATCACAGCTGCAACTACAC	
16	WEX5GR	CAAATTGTCAGACAAGTAAACC	
17	ATL1F	ACCCTGATGAAGAACTTGTATCTCT	Brightwell et al., 2002a
18	ATL1R	GAAATTACACACATAGGTGGCACT	
19	ATL1AF	TGTACATTTTCCAAATGCAAAGA	
20	ATL1GR2	TTTATAAGAGACACAGAATCATAAGTCC	Curlis et al., 2005
21	702F	ACTCAGTTTtaggcaatcctg	Thanakitgosate, 2007
22	702R	CACAGCTAGTTCATTTGCTG	
23	702AF	TCAGTTTtagttagtgatgta	
24	702GR	GAAATTTAAGGAGGCATAATC	

สารเคมี

Acrylamide/Bis solution

Agarose

Ammonium persulfate

Betaine

BigDye Terminator v3.1 (AB)

Boric acid

Bovine serum albumin

Bromophenol blue

Chemiluminescent detection kit (Orchid Diagnostics)

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 7-Deaza dGTP

Dimethylsulfoxide (DMSO)

EDTA

Ethidium bromide

Formamide

Gene Image AlkPhos Direct labeling and detection system (Amersham

Pharmacia Biotech)

Glycerol

Hybridization buffer (Amersham Pharmacia Biotech)

Hydroquinone (Sigma)

Hot start Taq DNA polymerase (Immolase, Biotline)

Hot start Taq DNA polymerase (QIAGEN)

QIAquick PCR purification kit (Qiagen)

Sodium bisulphate (Sigma)

Taq DNA polymerase (Invitrogen)

TEMED

Tris

Urea

Xylene cyanol FF

อุปกรณ์

เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (3130 Genetic Analyzer, AB)
 เครื่องถ่ายภาพยวูวี (Bioimaging system SynGene)
 ตู้ไฮบริไดส์ (Robin Scientific)
 ฟิล์มเอกซเรย์ 8X10 นิ้ว พร้อมคาสเซตสำหรับวางฟิล์ม
 อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอนพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (GelMate2000,

TOYOBO)

เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (PTC200, MJ Research)
 เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (2720 Thermal cycler, AB)
 เมมเบรนไนลอนประจุบวก (Hybond-N)
 เซมิ-คราย อิเล็กโตรบลอท (Biorad)
 อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวตั้งพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Protean II Xi cell,

20X20 cm, Biorad)

สารเคมีอื่น ๆ

องค์ประกอบและปริมาณของสารเคมี ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข
 25% Ammonium persulfate
 6% denatured polyacrylamide gel solution
 2.5 mM dNTP Mix
 2.5 mM dNTP Mix with 50% 7-Deaza dGTP
 2.5 mM dNTPs Mix with 100% 7-Deaza dGTP
 6X Gel loading buffer
 Loading dye (for denature gel electrophoresis)
 Loading dye (for non-denature gel electrophoresis)
 8% Polyacrylamide gel
 50X TAE
 10X TBE

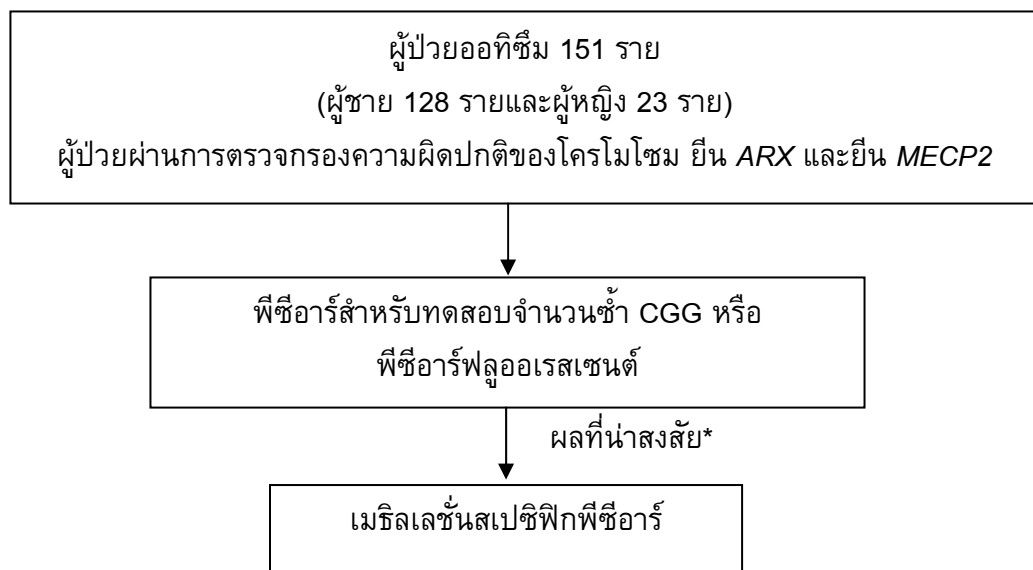
วิธีดำเนินการ

การศึกษารั้งนี้ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึม และ PDD-NOS) ทั้งในผู้ป่วยผู้ชายและผู้หญิง
2. การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยชายออทิซึมและ PDD-NOS เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS)

ผู้ป่วยทั้งผู้ชายและผู้หญิงทั้งหมด 151 ราย ที่ผ่านการตรวจกรองความผิดปกติของโครโมโซม การกลายพันธุ์ยีน *ARX* ในผู้ป่วยที่มีประวัติการชัก และยีน *MECP2* ในผู้ป่วยผู้หญิง นำมาตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะด้วยวิธีพีซีอาร์ทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ซึ่งสามารถใช้วิธีการของ Brown และคณะ (1993) และวิธีเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Genetic Analyzer หากผลการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG มีผลที่น่าสงสัย กล่าวคือไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏไม่ชัดเจน (smear) หรือปรากฏเป็นแถบเดี่ยวในตัวอย่างผู้หญิง ต้องทดสอบตัวอย่างต่อด้วยวิธีเมทิลเลชันสเปซิฟิกพีซีอาร์ (Methylation-Specific PCR) ดังรายละเอียดในรูปที่ 2

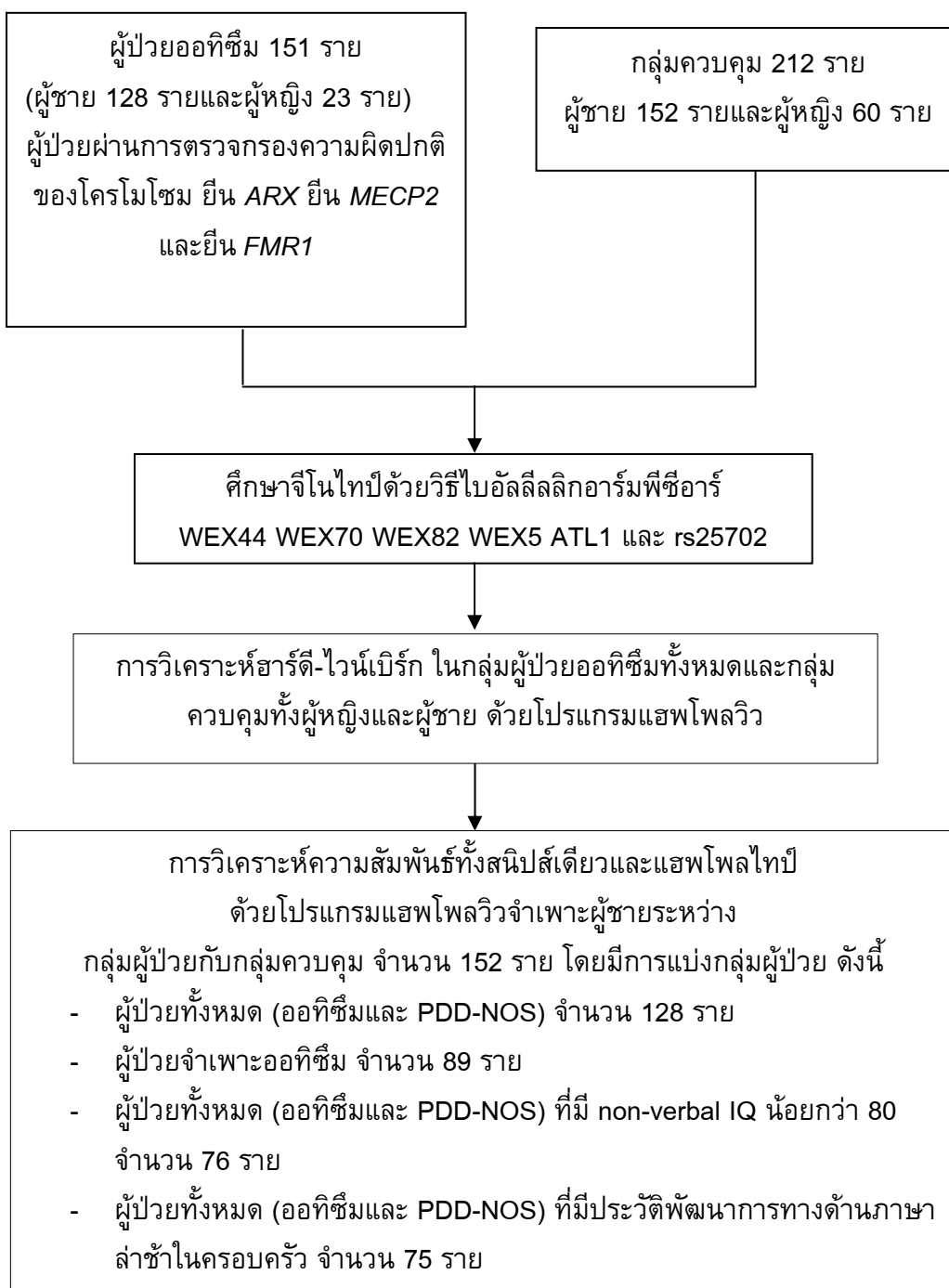


*ผลที่น่าสงสัย: ไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอ หรือไม่ชัดเจน (smear) และผู้หญิงที่เป็นโฮโมไซกัสที่ปรากฏเป็นแถบเดียว

รูปที่ 2. แผนผังแสดงขั้นตอนการตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* กับออทิซึมจะศึกษาเฉพาะผู้ชายในผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลความถี่ของแฮพโลไทป์บนโครโมโซมเอกซ์ และในการวิเคราะห์ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) เพื่อศึกษาสมดุลของประชากรต้องใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของทั้งผู้ชายและผู้หญิง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนและออทิซึมใช้โปรแกรมแฮพโลวิว (Haploview) โดยแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยตามลักษณะทางคลินิก ได้แก่ ออทิซึม หรือ PDD-NOS หรือตาม endophenotype ซึ่งเป็นการวัดลักษณะที่รายงานเป็นตัวเลขได้ ได้แก่ non-verbal IQ นอกจากนี้ยังแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามประวัติครอบครัวของผู้ป่วยที่พบบ่อย ได้แก่ ประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัว โดยการทดสอบนี้จะไม่นำกลุ่มผู้ป่วยที่มีจำนวนน้อยมาศึกษาความสัมพันธ์ เช่น ผู้ป่วยเฉพาะ PDD-NOS ที่มีจำนวนเพียง 39 ราย ดังรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 3

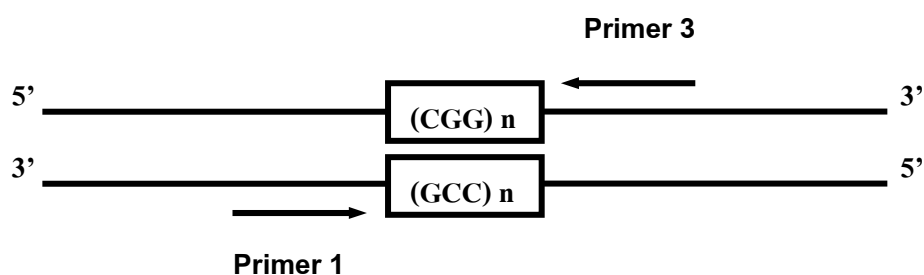
นอกจากนั้นในการศึกษานี้มีการนำข้อมูลของจำนวนซ้ำ CGG มาศึกษาความสัมพันธ์กับ non-verbal IQ



รูปที่ 3. แผนผังแสดงขั้นตอนวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในผู้ป่วย
ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ด้วยวิธีพีซีอาร์

วิธีนี้ใช้เพื่อทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ในตัวอย่างผู้ป่วย เป็นการตรวจกรองขั้นต้นในการทดสอบผู้ป่วยกลุ่มโครโมโซมเอกซ์เปราะ ตามวิธีการของ Brown และคณะ (1993) และมีการดัดแปลงบางส่วน ไพรมเมอร์ถูกออกแบบให้เพิ่มปริมาณตำแหน่งที่มีจำนวนซ้ำ CGG ดังรูปที่ 4 การอ่านผลการทดสอบจะเทียบกับตัวอย่างที่ทราบจำนวนซ้ำในการทดสอบครั้งเดียวกัน



รูปที่ 4. ภาพแสดงตำแหน่งที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อทดสอบจำนวนซ้ำของ CGG

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัม 1X Buffer (Invitrogen) $MgCl_2$ 0.75 มิลลิโมลาร์ ไพรมเมอร์ 1 และ 3 1.25 ไมโครโมลาร์ dNTP (7-deaza dGTP) 0.2 มิลลิโมลาร์ DMSO 10% และ Taq polymerase 0.25 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง MJ thermal cycler ในสภาวะดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 4 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 65 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกแยกในเจลอะครีลาไมด์ 6% ด้วย 1X TBE buffer ที่สภาวะ 6 วัตต์ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งสี xylene cyanol FF อยู่เหนือเจลประมาณ 1 เซนติเมตร โอนย้ายดีเอ็นเอลงเมมเบรนไนลอนด้วยเครื่อง semi-blot ที่ 500 มิลลิแอมป์ 30 นาที ทำให้ดีเอ็นเอเสถียรภาพด้วย NaOH 0.4 นอร์มอล และทำให้เป็นกลางใน 2X SSC อบที่ 80 องศาเซลเซียส 30 นาที เมมเบรนถูกฟริไฮบริไดส์ด้วยน้ำยา wash A 10 นาที และไฮบริไดส์ด้วยโพรบ $(CGC)_n$ ที่ 56 องศาเซลเซียส 20 นาที ล้างโพรบที่เกินออกที่ 56 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำยา wash A 30 มิลลิลิตร 20 นาที และน้ำยา wash B 30 มิลลิลิตร 20 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีการเคมีลูมิเนสเซนซ์ (chemiluminescent) ใช้ 1X Quick Light buffer Lumiphos-480 (Quick Light genome mapping probe kit; Orchid Diagnostics) และวางฟิล์ม 0.5-1 ชั่วโมง

การทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์

วิธีนี้ใช้สำหรับทดสอบจำนวนซ้ำของ CGG เช่นเดียวกับวิธีข้างต้นแต่ทดสอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยไพรเมอร์ติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนซ์ (FAM) ที่ปลาย 5' วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออ้างอิงตาม Sripo และคณะ (2007) และมีการดัดแปลงเล็กน้อย และทดสอบด้วยเครื่อง Genetic analyzer ตามคู่มือการใช้เครื่องของบริษัทผู้ผลิต (ABI 3130) โดยในการทดสอบทุกครั้งมีการทดสอบตัวอย่างที่ทราบจำนวนซ้ำควบคู่ด้วย

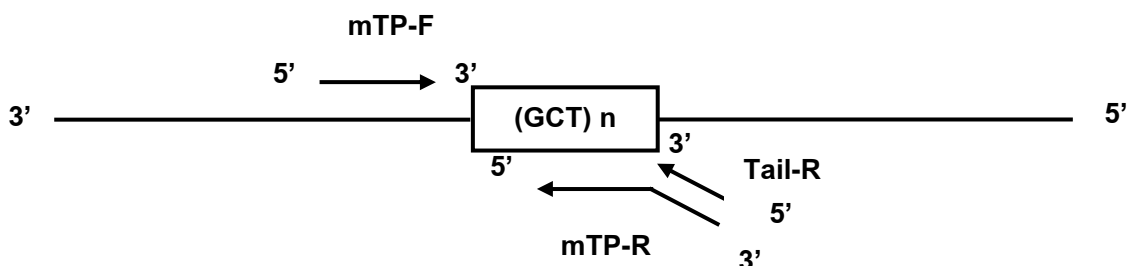
ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม 1X PCR Buffer MgCl₂ 1 มิลลิโมลาร์ dNTPs (100% 7-deaza dGTP) 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์ Hot start Taq DNA polymerase (Immolase) 0.5 ยูนิต นำสารละลายเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง MJ thermal cycler ในสภาวะดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 68 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 66 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ HiDi-formamide 10 ไมโครลิตร และสารมาตรฐาน LIZ500 0.2 ไมโครลิตร ทำให้เสียสภาพที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 4 องศาเซลเซียส 2 นาที ตัวอย่างทดสอบด้วยเครื่องทดสอบสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 3130) ใช้โพลีเมอร์ POP4 polymer สภาวะในการทดสอบ 15 กิโลโวลต์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ข้อมูลถูกเก็บด้วยซอฟต์แวร์ data collection software และวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ GeneMapper v3.2

เมธิลเลชันสเปซิฟิกพีซีอาร์ (Methylation-Specific PCR, MS-PCR) แบบ mTP-PCR (methylation triplet primed PCR)

วิธีนี้ใช้ในการทดสอบตัวอย่างที่มีจำนวนซ้ำของ CGG สูง ซึ่งไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือไม่ชัดเจน (smear) และใช้สำหรับทดสอบผู้หญิงที่มีจำนวนซ้ำโฮโมไซกัส ซึ่งปรากฏเป็นแถบเดียวจากการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG โดยใช้ไบซัลไฟด์เปลี่ยนเบส C ไปเป็น U ที่ไม่ถูกเมธิลเลชัน ส่วน C ที่ถูกเมธิลเลชันจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Clark et al., 1994) ซึ่งสามารถตรวจสอบภาวะเมธิลเลชันด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ ในการทดสอบนี้ใช้ไพรเมอร์ถูกออกแบบให้เพิ่มปริมาณตำแหน่งที่มีจำนวนซ้ำ CGG ที่ถูกเมธิลเลชันของดีเอ็นเอตั้งต้นเส้น antisense โดยลักษณะสเต็มเมอร์เกิดจากการมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันเนื่องจากการจับแบบสุ่มของไพรเมอร์ mTPR และ Tail R โดยมี mTPF เป็นไพรเมอร์หลัก ดังรูปที่ 5 ซึ่งใช้วิธีนี้สำหรับทดสอบแยกคนปกติออกจากคนที่ เป็นพาหะและ

เป็นโรค และเหมาะกับการทดสอบผู้หญิงที่มีจำนวนซ้ำ CGG เป็นโฮโมไซกัสเพื่อศึกษาโครโมโซมแท่งที่ไม่ทำงาน (inactive) ซึ่งถูกเมธิลเลชัน การตรวจสอบผลในคนปกติมีแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เป็นสเมียร์ (smear) สูงไม่เกิน 300 คู่เบส และผู้ป่วยที่เป็นพาหะและเป็นโรคปรากฏเป็นสเมียร์สูงเกิน 300 คู่เบส อ้างอิงวิธีการตาม Zhou และคณะ (2004) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย



รูปที่ 5. ภาพแสดงตำแหน่งของ CGG ที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Methylation-Specific PCR

การเตรียมดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์

ดีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ทำให้เสียดสภาพด้วย 3 โมลาร์ NaOH 5.5 ไมโครลิตร และต้มที่ 98 องศาเซลเซียส 6 นาที เติม 10 มิลลิโมลาร์ hydroquinone 30 ไมโครลิตร และ 3 โมลาร์ sodium bisulphate 520 ไมโครลิตร ซึ่งทั้ง hydroquinone และ sodium bisulphate ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง บ่มที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยหยด mineral oil บนผิวหน้าเพื่อป้องกันการระเหย นำดีเอ็นเอที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด DNA purification resin (GE) ตามรายละเอียดของผู้ผลิต ดีเอ็นเอจะถูก desulphonated ด้วย 3 โมลาร์ NaOH 5.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธี Sodium acetate/ ethanol ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 20 ไมโครลิตร และใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์หรือเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณ (mTP-PCR amplification)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 400 นาโนกรัม 1X Buffer MgCl₂ (Qiagen) 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ mTP-F และ Tail-R 0.4 ไมโครโมลาร์ mTP-R 0.02 ไมโครโมลาร์ 1.5X Q solution (Qiagen) และ Hot start

Taq DNA polymerase (Qiagen) 2.5 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง MJ thermal cycler ที่สภาวะ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที 1 รอบ 98 องศาเซลเซียส 1 นาที 62 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 วินาที 40 รอบ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แยกด้วยเจลอะกาโรส 1.5% ย้อมด้วย ethidium bromide และดูภาพภายใต้ UV transilluminator

การเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม

ในการศึกษานี้เลือกสลิปส์ WEX5 ATL1 และ rs25702 อยู่ในตำแหน่ง 5' UTR อินทรอน 1 และ อินทรอน 13 ตามลำดับ ซึ่งมีการรายงานแล้วว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนไทยและเป็นตัวแทนสลิปส์บนยีน *FMR1* (Thanakitgosate, 2007) และเลือกเพิ่มเติมอีก 3 ตำแหน่งใน 5' UTR ที่คาดว่าเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของยีน (regulatory sequence) เพื่อให้ครอบคลุมยีนเกือบทั้งหมด ได้แก่ WEX44 WEX70 และ WEX82 โดย WEX44 และ WEX82 นำมาจากรฐานข้อมูลของเว็บไซต์ NCBI Brightwell และคณะ (2002b) และ Ennis และคณะ (2007) ที่มีค่า heterozygosity ใกล้เคียง 0.5 ซึ่งมีการรายงานในคนเอเชีย (จีน และญี่ปุ่น) สำหรับ WEX70 นำมาจากการรายงานของ Ennis และคณะ (2007) ที่คาดว่าเป็นตำแหน่งที่เป็น *cis* acting factor ที่เกี่ยวข้องกับความไม่เสถียรของจำนวนซ้ำ CGG ในยีน *FMR1* ที่ศึกษาในคอเคเซียน แต่สลิปส์ตำแหน่งนี้ยังไม่มีรายงานในประชากรอื่น การศึกษานี้ไม่ได้เลือกสลิปส์ในตำแหน่ง 3' UTR เนื่องจากไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนเอเชีย รายละเอียดของสลิปส์ดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 6

ตารางที่ 8. ตำแหน่งสโนิปส์บนยีน *FMR1*

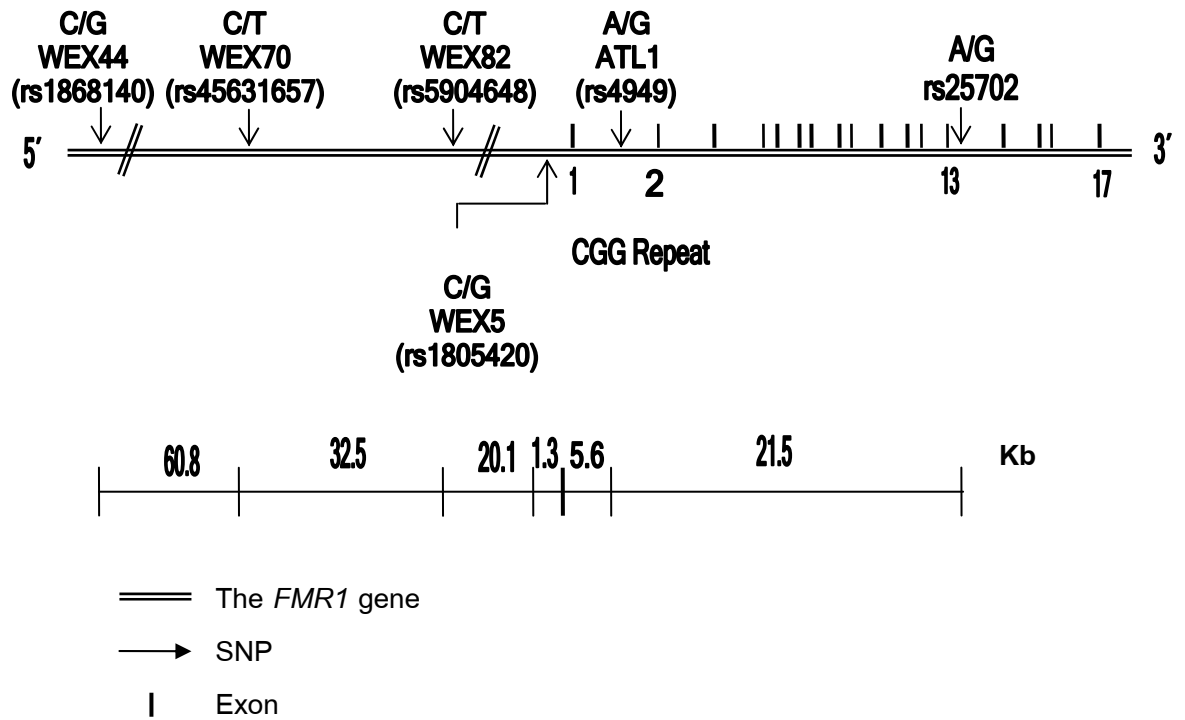
สโนิปส์	อัลลีล	ตำแหน่ง	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (GenBank L29074)	ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับ ตำแหน่ง CGG (~Kb)	Heterozygosity	ความถี่อัลลีล (NCBI)	
						Chinese	Japanese
WEX44 (rs1868140)	G/T	5' UTR	-100907	-114.7	0.484	G 0.727 T 0.273	G 0.452 T 0.548
WEX70 ^a (rs45631657)	C/T	5' UTR	-40079	-53.9	-	-	-
WEX82 (rs5904648)	C/T	5' UTR	-7561	-21.4	0.484	C 0.647 T 0.353	C 0.545 T 0.455
WEX5 ^b (rs1805420)	C/G	5' UTR	12570	-1.3	0.352	C 0.471 G 0.529	C 0.576 G 0.424
FRAXA	CGG repeat	exon 1	13833	0	-	-	-
ATL1 ^c (rs4949)	A/G	intron 1	19445	+5.6	0.481	A 0.250 G 0.750	A 0.500 G 0.500
rs25702 ^d	A/G	intron 13	42950	+29.1	0.419	A 0.667 G 0.333	A 0.500 G 0.500

^a ความถี่อัลลีลในคอเคเซียนในกลุ่มควบคุม Atlanta T 0.488 และ C 0.512 และ Wessex T 0.514 และ C 0.486 (Ennis et al., 2007)

^b ความถี่อัลลีลในคนไทยกลุ่มควบคุม C 0.632 และ G 0.368 (Thanakitgosate, 2007)

^c ความถี่อัลลีลในคนไทยกลุ่มควบคุม A 0.312 และ G 0.688 (Limprasert et al., 2001) และ A 0.361 และ G 0.639 (Thanakitgosate, 2007)

^d ความถี่อัลลีลในคนไทยกลุ่มควบคุม A 0.609 และ G 0.391 (Thanakitgosate, 2007)

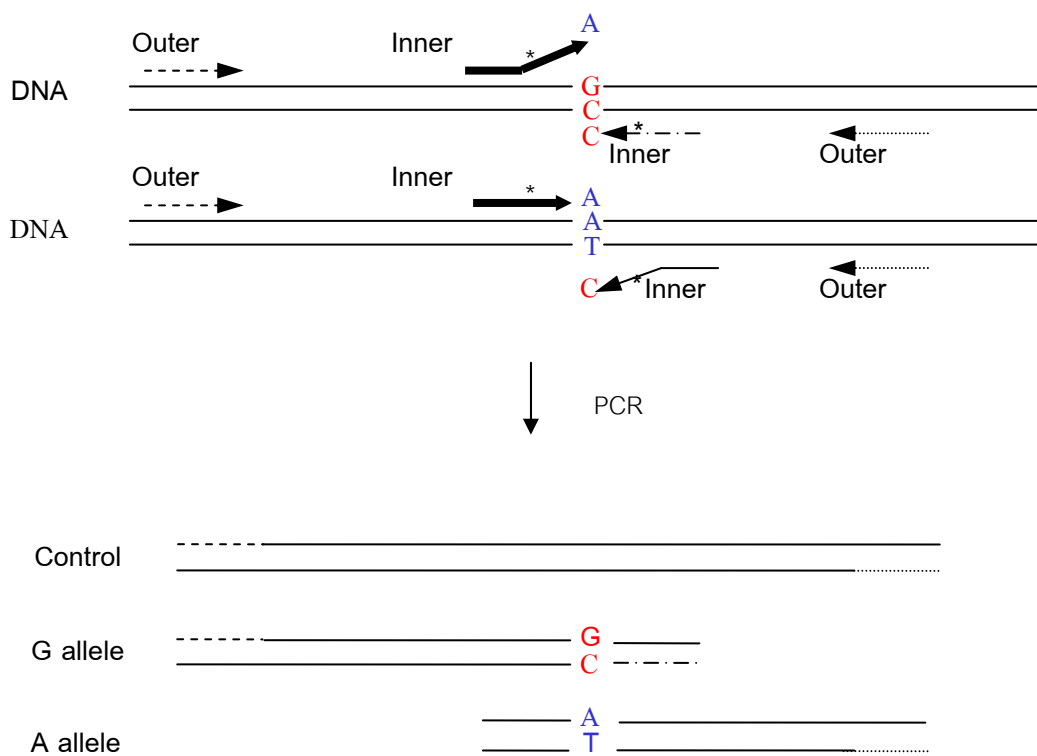


รูปที่ 6. ตำแหน่งสไนป์ส์ที่ครอบคลุมทั้งยีน *FMR1* (ระยะทางระหว่างสไนป์ส์แสดงในหน่วยกิโลเบส)

การออกแบบไพรเมอร์ (Ye et al., 2001; Brightwell et al., 2002a)

การทดสอบจีโนมไทป์โดยวิธี Biallelic-ARMS PCR เป็นวิธีการทดสอบสนิปส์ได้ 2 อัลลีลในปฏิกิริยาเดียว ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 เส้น มีไพรเมอร์ 2 เส้นที่จำเพาะในตำแหน่งสนิปส์ (inner primer forward และ reverse) และมีไพรเมอร์ด้านนอก 1 คู่ (outer primer forward และ reverse) ที่มีระยะห่างจากตำแหน่งสนิปส์ที่ไม่เท่ากัน เพื่อให้ได้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแต่ละสนิปส์ที่แตกต่าง รวมถึงเป็น internal control ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 7 ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการออกแบบไพรเมอร์แบบด้วยตัวเอง (manual) และมีการตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม OligoCal (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI โดยใช้โปรแกรม blastn (nucleotide-nucleotide BLAST) เพื่อพิจารณาถึงความจำเพาะของลำดับดีเอ็นเอและมีหลักการออกแบบไพรเมอร์ตามรายละเอียดดังนี้

1. ความยาวควรอยู่ประมาณ 18 – 30 เบสเพื่อให้มีการจับที่จำเพาะ
2. หลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มีการจับกันเอง (dimers) การขดเป็นห่วง (palindrome) ที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่จับกันเอง (secondary structures)
3. หลีกเลี่ยงนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำ โดยเฉพาะมี G มากกว่า 4 ตำแหน่ง
4. ปริมาณ G-C ควรอยู่ในช่วง 30-80% ที่เหมาะสม ควรอยู่ในช่วง 50-55%
5. ไพรเมอร์ที่เป็นตำแหน่งด้านนอก (outer primer) ทั้งสองข้างควรอยู่ในตำแหน่งที่ไม่สมมาตรจากตำแหน่งสนิปส์
6. ไพรเมอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะกับสนิปส์ต้องมีทิศทางที่ตรงกันข้าม
7. ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ควรมีขนาดที่แยกเห็นชัดเจนในการทดสอบ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสควรอยู่ในช่วง 100-500 คู่เบส
8. ตำแหน่งปลายสุดด้าน 3' ของแต่ละไพรเมอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะกับสนิปส์ต้องจับ (complementary) กับอัลลีลสนิปส์บนดีเอ็นเอตั้งต้น
9. ตำแหน่ง -1 หรือ -2 จากปลายด้าน 3' ต้องออกแบบให้ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอตั้งต้นได้ (mismatch) เพื่อเพิ่มความจำเพาะของอัลลีล



รูปที่ 7. ภาพแสดงไพรเมอร์ 4 ตำแหน่งในการทดสอบด้วยวิธี Bi-allelic-ARMS PCR

การศึกษาสลิปส์ด้วยวิธี Biallelic-ARMS PCR

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1 X PCR buffer dNTP 200 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.5 ยูนิต สำหรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ปริมาณของไพรเมอร์และสาร adjuvant ขึ้นกับแต่ละปฏิกิริยา ตามรายละเอียดในตารางที่ 9 สารละลายพีซีอาร์ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง MJ thermal cycler ภายใต้สภาวะ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที (ยกเว้น ATL1 และ rs25702 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที) อุณหภูมิ annealing ของสลิปส์แต่ละตำแหน่ง ตามรายละเอียดในตารางที่ 9 และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (ยกเว้น ATL1 และ rs25702 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที) 35 รอบ และอุณหภูมิ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปแยกในเจลโพลีอะคริลาไมด์ 6% ด้วย 1X TBE ที่สภาวะ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้ UV transilluminator อัลลีลของแต่ละรายจะอ่านตามขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และในทุกตัวอย่างจะมีแถบของ internal standard เพื่อตรวจสอบผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9. สภาวะและขนาดของผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาด ผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ (bp)
	ชื่อ	ความ เข้มข้น (µM)				
WEX44	44F	0.08	1.5	BSA 0.13 mg/ml	65	Control (334) T allele (130) G allele (260)
	44R	0.08				
	44TF	7				
	44GR	6.18				
WEX70	70F	0.2	2.5	Betaine 0.6 M	62	Control (297) T allele (152) C allele (194)
	70R	0.2				
	70TF	1				
	70CR	1				
WEX82	82F	0.08	2.5	Betaine 0.6 M	62	Control (398) C allele (152) T allele (295)
	82R	0.08				
	82CF	3				
	82TR	7.84				
WEX5	WEX5F	0.1	1.25	BSA 0.13 mg/ml	60	Control (361) C allele (143) G allele (261)
	WEX5R	0.1				
	WEX5CF	1				
	WEX5GR	3				

ตารางที่ 9. สภาวะและขนาดของผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ (ต่อ)

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาด ผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ (bp)
	ชื่อ	ความ เข้มข้น (µM)				
ATL1	ATL1F	0.1	1.5	BSA (0.13 mg/ml)	53	Control (302) A allele (107) G allele (245)
	ATL1R	0.1				
	ATL1AF	3				
	ATL1GR	0.1				
rs25702	702F	0.15	1.5	BSA (0.13 mg/ml)	55	Control (379) A allele (148) G allele (274)
	702R	0.15				
	702AF	3				
	702GR	2.8				

การทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

การยืนยันความถูกต้องของจำนวนซ้ำ CGG และอัลลีลในสปีส์ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในคนไทย ได้แก่ WEX44 WEX70 และ WEX82 มีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอในบางตัวอย่าง

ปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอตั้งต้นของการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1X PCR Buffer MgCl₂ 1 มิลลิโมลาร์ dNTPs (100% 7-deaza dGTP) 200 ไมโครโมลาร์ ไพโรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ DMSO 10% BSA 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Hot start Ta DNA polymerase (Immolase) 2.5 ยูนิต เพิ่มปริมาณด้วย MJ thermal cycler ในสภาวะดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 9 นาที 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 64 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งหมดถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR ตามคู่มือของบริษัท

ปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอตั้งต้นของการทดสอบอัลลีลในตำแหน่งสปีส์อ้างอิงตามรายละเอียดของการทดสอบด้วย Biallelic-ARMS PCR ยกเว้น เติมนเฉพาะไพโรเมอร์ในตำแหน่งด้านนอก (Outer forward และ reverse) เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอให้ครอบคลุมตำแหน่งสปีส์ และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Gel extraction ดังนี้ หลังจากทำแยกดีเอ็นเอด้วยเจลโพลีอะคริลาไมด์แล้วตัดเจลเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเติม Elution buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อชะดีเอ็นเอออกมาจากเจล บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง บ่มที่ 12,000 รอบต่อนาที จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธี sodium acetate/ ethanol ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากประจุ (Deionized water)

การเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทดสอบลำดับดีเอ็นเอทั้งการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG และอัลลีลของสปีส์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3-10 นาโนกรัม ไพโรเมอร์ที่เป็น forward หรือ reverse 1.6 พิโกโมล BigDye terminator v1.1 ready reaction premix 1X และบัฟเฟอร์ BigDye terminator sequencing buffer 1X เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler 2720 สภาวะการทำปฏิกิริยา ได้แก่ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที 1 รอบ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส 10 วินาที 60 องศาเซลเซียส 4 นาที 25 รอบ ตกตะกอนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี sodium acetate/ ethanol ละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 ไมโครลิตร ด้วย HiDi-formamide 12 ไมโครลิตร นำไปทดสอบด้วยเครื่องทดสอบพันธุกรรม (Genetic Analyzer) รุ่น 3130 และตัวอย่างดีเอ็นเอบางส่วนส่งทดสอบที่ Macrogen ประเทศเกาหลี

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Pearson's chi-square test)

ในการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงกลุ่ม (categorical data) ใช้การวิเคราะห์ด้วยไคสแควร์ (Chi-square analysis) ซึ่งเป็นการทดสอบสมมติฐานหลัก (null hypothesis) ที่ความถี่จากค่าที่สังเกตได้เป็นไปตามการกระจายที่คาดหวัง ค่าความน่าจะเป็น (probability) ของไคสแควร์ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 หมายความว่าปฏิเสธสมมติฐานหลัก ค่าไคสแควร์คำนวณจากค่าความแตกต่างของค่าความถี่ที่คำนวณได้กับค่าทางทฤษฎียกกำลังสอง และหารด้วยค่าความถี่ตามทฤษฎี ตามสูตร ดังนี้

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

O_i = ความถี่ที่สังเกตได้ (an observed frequency)

E_i = ความถี่ที่คาดหวัง (ค่าทางทฤษฎี) (an expected frequency)

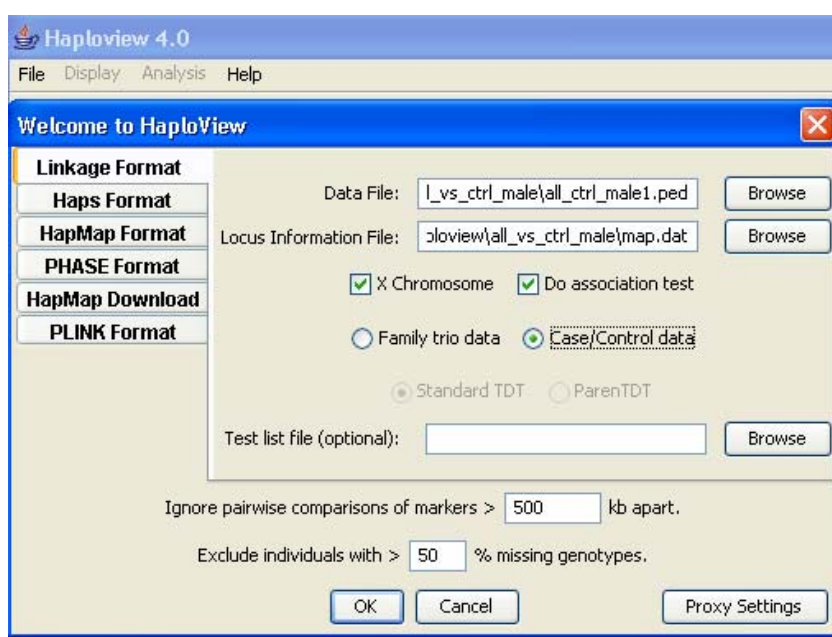
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview) (Barrett et al., 2005)

การศึกษาความสัมพันธ์ในการศึกษานี้ใช้โปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้งานที่ไม่ยุ่งยาก และการนำเสนอข้อมูลของโปรแกรมที่เข้าใจง่าย สามารถดาวน์โหลดผ่านอินเทอร์เน็ต การเตรียมข้อมูลจีโนมไทป์แต่ละสลิปส์ของทั้งกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมใช้โปรแกรม Excel ประกอบด้วยข้อมูลทั้งหมดอย่างน้อย 7 คอลัมน์ ดังนี้

1. การตั้งค่าของครอบครัว (family ID) เช่น AR1-3 เป็นต้น
2. การตั้งค่าของผู้ป่วย (individual ID) กำหนดเป็นรหัส 201
3. การตั้งค่าของบิดา (Paternal ID) กำหนดเป็น 0 ในการศึกษาที่ใช้ประชากรที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยเป็นกลุ่มควบคุม
4. การตั้งค่าของมารดา (Maternal ID) กำหนดเป็น 0 ในการศึกษาที่ใช้ประชากรที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยเป็นกลุ่มควบคุม
5. การตั้งค่าของเพศ ผู้ชายกำหนดเป็น 1 และผู้หญิงกำหนดเป็น 2
6. การตั้งค่าสถานะ กลุ่มควบคุมกำหนดเป็น 1 และกลุ่มผู้ป่วยกำหนดเป็น 2

7. จีโนไทป์ของแต่ละสลิปแยกตามคอลัมน์ โดยกำหนดเป็น A T C และ G หรือ 1 2 3 และ 4 เช่น ในกรณีที่เป็นโครโมโซมเอกซ์ผู้ชายที่เป็นเฮมิไซกัสอัลลีล A ระบุเป็น A A และผู้หญิงที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส ระบุเป็น A A และ A G ตามลำดับ โดยมีการเว้นว่างระหว่างอัลลีล

หลังจากบันทึกข้อมูลในโปรแกรม Excel แปลงเป็นไฟล์นามสกุล .ped โดยเลือกชนิดของไฟล์เป็น text (tab delimited) ซึ่งสามารถเปิดด้วยโปรแกรม Notepad เพื่อลบหัวข้อคอลัมน์และลบไฟล์บรรทัดสุดท้ายที่เว้นว่างออกให้เหลือเฉพาะข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Haploview และสร้างแผนที่ของตำแหน่งสลิปบนยีนโดยใช้โปรแกรม Notepad โดยสลิปตำแหน่งแรกกำหนดเป็นตำแหน่งอ้างอิง (ตั้งค่าที่ 100) และสลิปตำแหน่งอื่นๆ เป็นระยะทางห่างจากตำแหน่งอ้างอิง ตั้งชื่อแผนที่สลิปเป็นไฟล์นามสกุล .dat และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เลือกพารามิเตอร์ที่เป็น case-control บนโครโมโซมเอกซ์ ดังแสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมในรูปที่ 8



รูปที่ 8. ภาพแสดงหน้าจอหลักของโปรแกรม Haploview V4.0

ผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรม Haploview มีดังนี้

- ความถี่อัลลีล

โลคัสที่มีอัลลีลเท่ากับหรือมากกว่าสอง และมีความถี่อย่างน้อยร้อยละ 1 ในประชากร จะเรียกว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ความถี่อัลลีลคำนวณมาจากความถี่ของแต่ละอัลลีลที่พบในประชากร โปรแกรมจะไม่นำสไนป์ที่มีค่า minor allele frequency น้อยกว่า 0.05 มาศึกษาความสัมพันธ์

- ความสมดุลของประชากร ตามกฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg)

โปรแกรมคำนวณค่า Heterozygosity ที่สังเกตได้กับค่าคาดหวัง ซึ่งค่าคาดหวังคำนวณจาก $2 * MAF * (1 - MAF)$ ค่า P ของ Hardy-Weinberg เป็นความน่าจะเป็นของการเบี่ยงเบนจากภาวะสมดุลที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ หากค่า $P > 0.05$ ถือว่าเข้าสู่สมดุลของประชากร และวิธีนี้เป็นการควบคุมคุณภาพว่าไม่มีการเลือกกลุ่มควบคุมที่หลากหลายเป็นตัวแทนของประชากรที่ทำให้เกิดภาวะไม่สมดุล (population stratification)

- การถ่ายทอดไปด้วยกัน (linkage disequilibrium, LD)

การศึกษาว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กันมีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าคาดหวัง ซึ่งพิจารณาจากค่า Lewontin's coefficient (D') ที่คำนวณจากระยะทางและความถี่อัลลีลของแต่ละคู่สไนป์ หากค่า D' มากกว่า 0.8 หมายความว่า มีการถ่ายทอดไปด้วยกันของคู่เครื่องหมายพันธุกรรม การสร้างบล็อกมาจากการเลือกพารามิเตอร์ solid spine ซึ่งโปรแกรมจะเลือกตำแหน่งที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันสูง (strong LD) ของสไนป์ตัวแรกและตัวสุดท้าย ใน LD chart และสไนป์ที่อยู่ใน LD เรียกว่า haplotype block

- การศึกษาความสัมพันธ์ (association study)

ซอฟต์แวร์จะคำนวณไคสแควร์ (chi-square) เพื่อเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีลและแอฟโพลไทป์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม หากข้อมูลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สามารถเลือกทดสอบการประเมินนัยสำคัญของค่าที่ได้ (significant testing) ด้วยการทดสอบเพอร์มิวเทชัน (Permutation test) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนลำดับของข้อมูลความสัมพันธ์หลายครั้งเพื่อลดความโน้มเอียงของข้อมูล หากค่า $P < 0.05$ หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

การคำนวณทางสถิติทั่วไป เช่น การเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้การคำนวณในโปรแกรมเอกเซล (Excel)

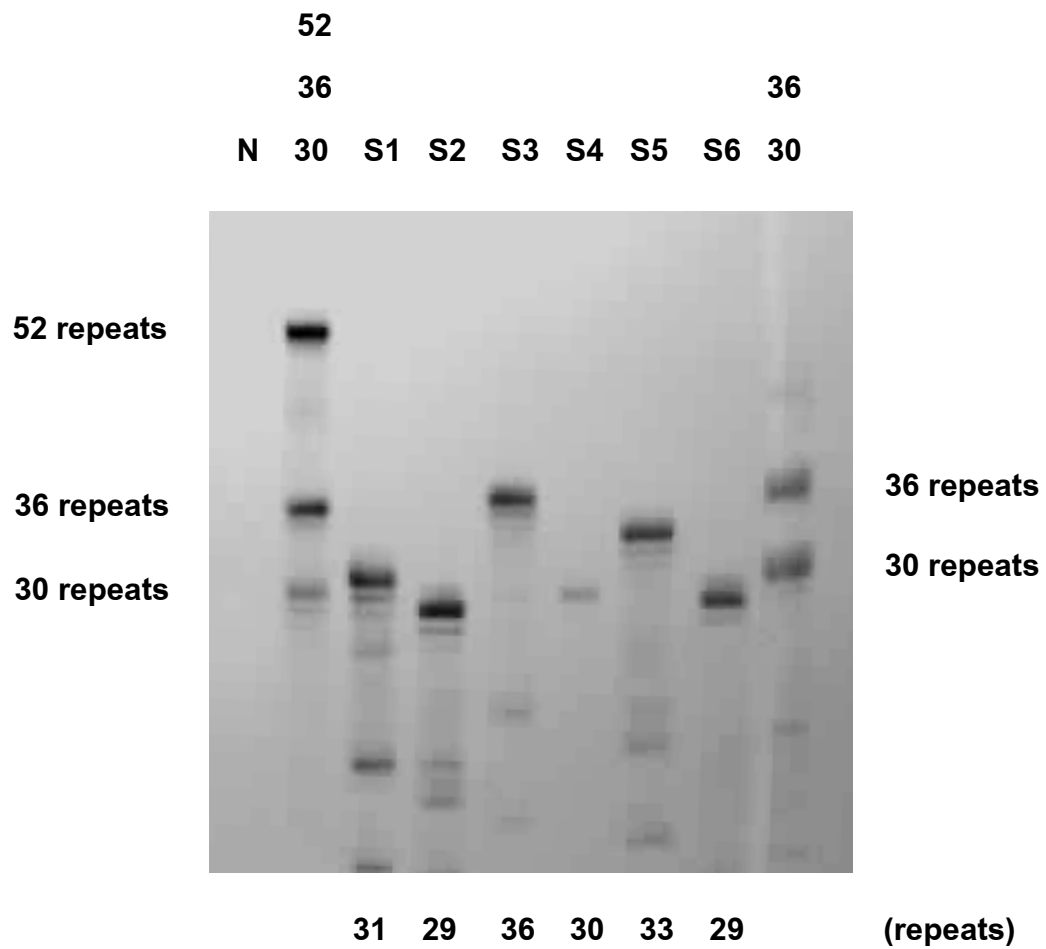
บทที่ 3 ผลการวิจัย

การตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึมและ PDD-NOS

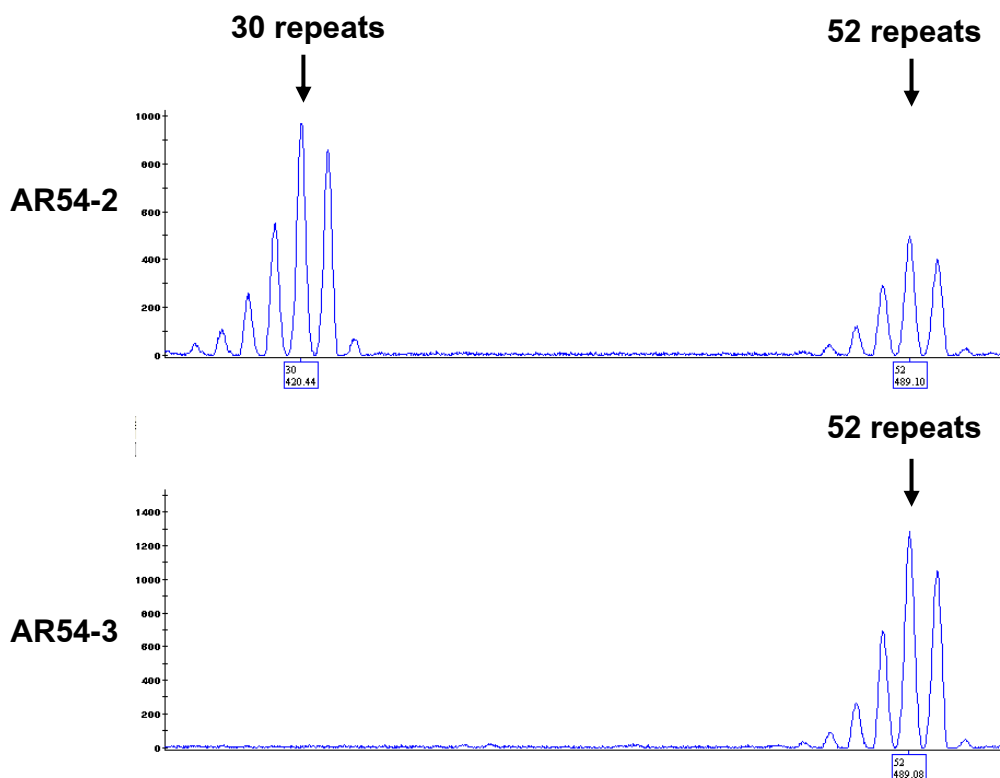
ผลการตรวจกรองด้วยวิธีพีซีอาร์สำหรับหาจำนวนซ้ำ CGG ของผู้ป่วยผู้ชายออทิซึมและ PDD-NOS ทั้งหมด 128 ราย อยู่ในช่วง 20-52 ซ้ำ ดังแสดงตัวอย่างผลการทดสอบในรูปที่ 9 และพบผู้ป่วยที่มีจำนวนซ้ำอยู่ในช่วง intermediate 3 ราย คือ 44 46 และ 52 โดยได้รับการถ่ายทอดจากมารดาและไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ ดังแสดงผลการทดสอบด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์ของผู้ป่วยชายที่มีจำนวนซ้ำ 52 ที่ถ่ายทอดจากมารดาในรูปที่ 10 การกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในตัวอย่างผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด มีจำนวนซ้ำ CGG 29 30 และ 36 คิดเป็น 59 คน (ร้อยละ 46.1) 35 คน (ร้อยละ 27.3) และ 11 คน (ร้อยละ 8.6) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ในคนไทยผู้ชายปกติภาคกลาง ภาคใต้ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคละ 50 ราย นำมาเปรียบเทียบการกระจายของจำนวนซ้ำแต่ละภาค โดยการจัดกลุ่มที่มีจำนวนซ้ำหลักเป็น 29 30 และ 36 และรวมจำนวนซ้ำที่พบน้อยไว้ด้วยกันเพื่อเหมาะต่อการทดสอบด้วยไคสแควร์ พบว่าในแต่ละภาคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10 จึงรวบรวมข้อมูลเป็นกลุ่มคนไทยทั้งหมดเป็นกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 11

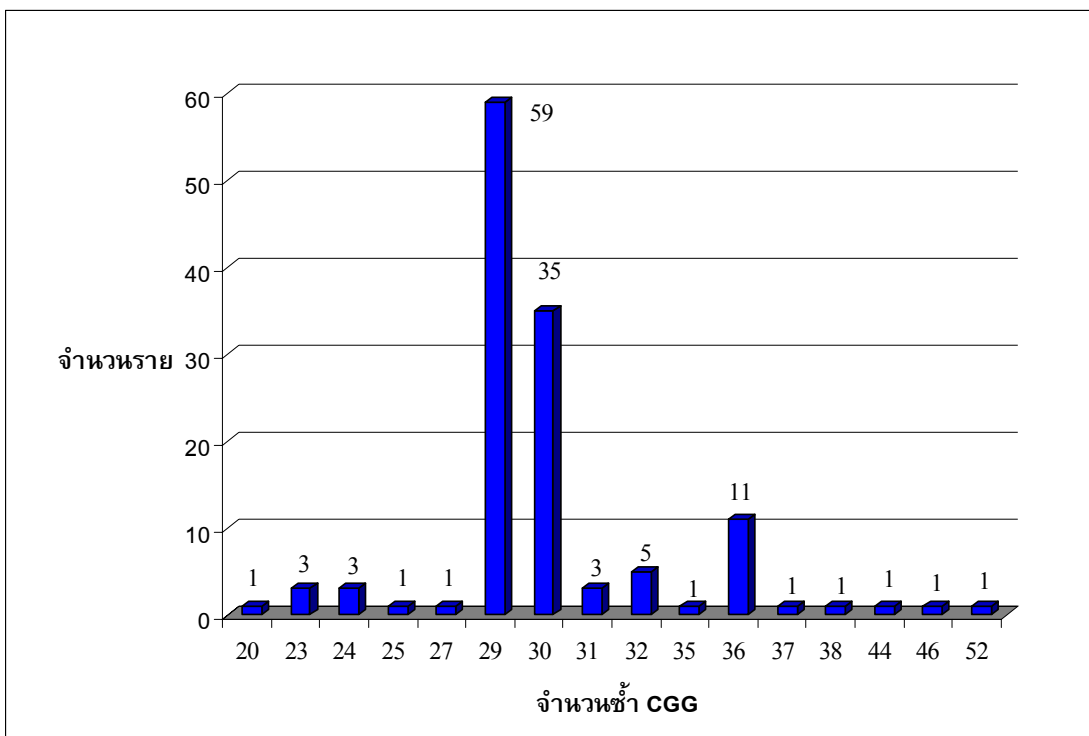
ผลการทดสอบ CGG ผู้ป่วยผู้หญิงทั้งหมดจำนวน 23 ราย พบว่าจำนวนซ้ำ CGG ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสมีจำนวน 8 ราย และผู้หญิงที่มีจำนวนซ้ำเป็นโฮโมไซกัสจำนวน 15 ราย เมื่อทดสอบด้วยวิธีเมธิลเลชั่นสเปซิฟิกพีซีอาร์พบว่าไม่มีภาวะเมธิลเลชั่นที่ผิดปกติโดยมีแถบเสมีร์ต่ำกว่า 300 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 9. फिल्मแสดงตัวอย่างผลการตรวจกรองจำนวนซ้ำด้วยวิธีพีซีอาร์สำหรับการทดสอบจำนวนซ้ำ CGG (Brown et al., 1993) แถว N (Negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น แถว 52 36 30 และแถว 36 30 เป็นเครื่องหมายที่ทราบจำนวนซ้ำ แถว S1-S6 เป็นตัวอย่างผู้ชาย ผลจำนวนซ้ำ CGG คือ 31 29 36 30 33 และ 29 ตามลำดับ



รูปที่ 10. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของตัวอย่างผู้ชายที่มีจำนวนซ้ำ CGG อยู่ในช่วง intermediate ที่ถ่ายทอดจากแม่ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์ ตัวอย่าง AR54-2 เป็นตัวอย่างแม่ที่มีจำนวน CGG 30,52 ซ้ำ และตัวอย่าง AR54-3 เป็นผู้ป่วยชายที่มีจำนวน CGG 52 ซ้ำ



รูปที่ 11. การกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในตัวอย่างผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด 128 ราย จำนวนซ้ำ CGG ตั้งแต่ 20-52 โดยมีจำนวนซ้ำที่พบบ่อยในประชากร ได้แก่ 29 30 และ 36 จำนวน 59 ราย (ร้อยละ 46.1) 35 ราย (ร้อยละ 27.3) และ 11 ราย (ร้อยละ 8.6) ตามลำดับ

**ตารางที่ 10. การเปรียบเทียบการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในตัวอย่างผู้ชายคนไทย
ปกติจากภาคกลาง ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือด้วยการทดสอบ
Chi-square**

จำนวน ซ้ำ CGG	ภาคกลาง		ภาคใต้		ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ		ภาคเหนือ	
	จำนวน (ราย)	ร้อยละ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
17-28	2	4	9	18	3	6	3	6
29	26	52	26	52	29	58	26	52
30	8	16	10	20	11	22	11	22
31-35	6	12	2	4	4	8	3	6
36	6	12	2	4	1	2	5	10
37-52	2	4	1	2	2	4	2	4
รวม	50	100	50	100	50	100	50	100

ภาคกลาง vs ภาคใต้: Chi square = 9.0101, df = 5, P = 0.1087

(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ภาคกลาง vs ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: Chi square = 4.8087, df = 5, P = 0.4397

(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ภาคกลาง vs ภาคเหนือ: Chi square = 1.7646, df = 5, P = 0.8807

(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ภาคใต้ vs ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: Chi square = 4.5446, df = 5, P = 0.4739

(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ภาคใต้ vs ภาคเหนือ: Chi square = 4.8667, df = 5, P = 0.4324

(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ vs ภาคเหนือ: Chi square = 2.9732, df = 5, P = 0.7041

(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ 11. การเปรียบเทียบการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ระหว่างผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด 128 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมของคนไทยทั้งหมด 200 ราย ด้วยการทดสอบ Chi square

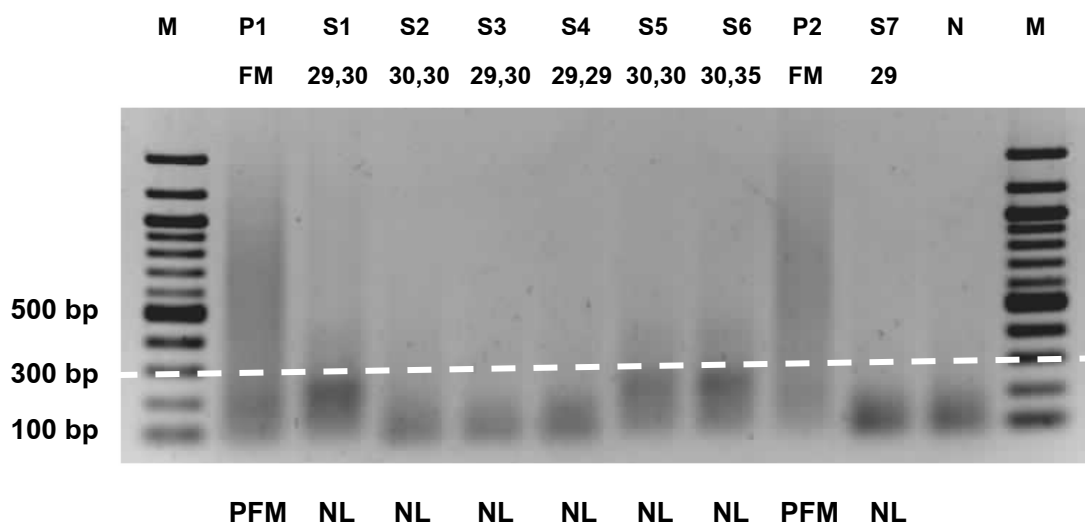
จำนวนซ้ำ CGG	ผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS)		กลุ่มควบคุม	
	จำนวน (ราย)	ร้อยละ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
17-28	9	7.0	17	8.5
29	59	46.1	107	53.5
30	35	27.3	40	20
31-35	9	7.0	15	7.5
36	11	8.6	14	7
37-52	5	3.9	7	3.5
รวม	128	100	200	100

ผู้ป่วยทั้งหมด vs กลุ่มควบคุม: Chi square = 3.2179, df = 5, P = 0.6664
(ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า non-verbal IQ เฉลี่ยและจำนวนซ้ำ CGG ในผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ผู้ป่วยที่มีจำนวนซ้ำ 37-52 มีค่า non-verbal IQ เฉลี่ย 75.60 ซึ่งสูงกว่าผู้ป่วยที่มีจำนวนซ้ำ 20-28 ซ้ำ ที่มีค่า non-verbal IQ เฉลี่ย 60.63 ดังตารางที่ 12 แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยบางรายไม่มีข้อมูล non-verbal IQ การทดสอบจึงเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่เก็บได้

ตารางที่ 12. ค่าเฉลี่ยของ non-verbal IQ ในแต่ละกลุ่มของจำนวนซ้ำ CGG ในผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด

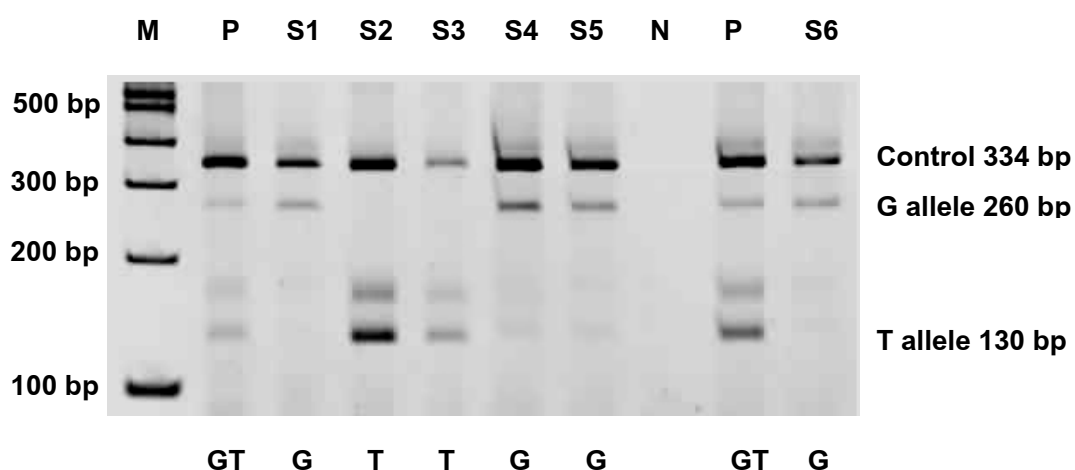
จำนวนซ้ำ CGG	จำนวนผู้ป่วยที่มีข้อมูล non-verbal IQ (ราย)	จำนวนผู้ป่วยที่ไม่มีข้อมูล non-verbal IQ (ราย)	ค่าเฉลี่ย non-verbal IQ
20-28	8	1	60.63
29	43	16	64.70
30	22	13	62.45
31-35	7	2	61.86
36	8	3	66.88
37-52	5	0	75.60
รวม	93	35	



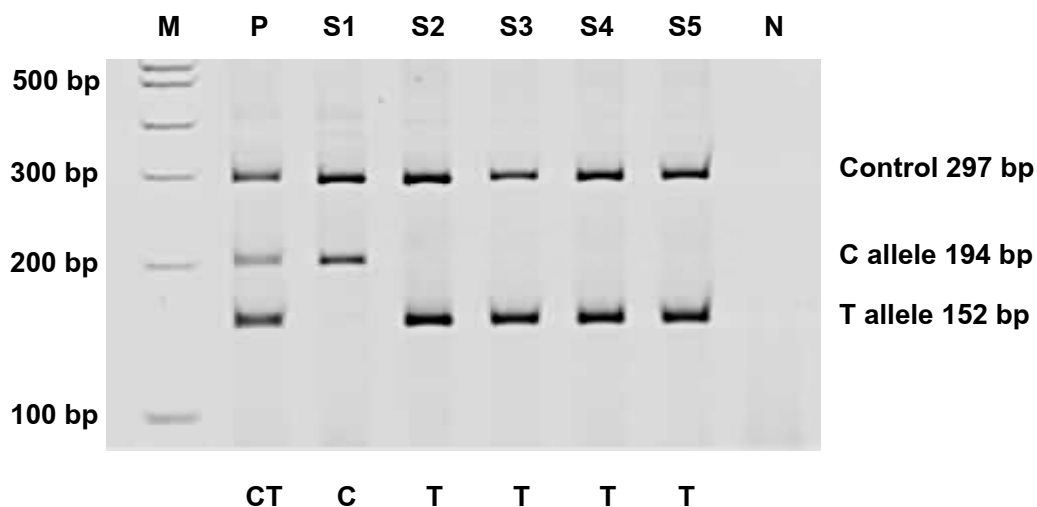
รูปที่ 12. ภาพแสดงผลเจลอะกาโรสของวิธี **Methylation-Specific PCR** แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P1 (positive control) เป็นตัวอย่างของผู้หญิงที่เป็นโรค (30,>200) แถว S1 S3 และ S6 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (จำนวนซ้ำ 29,30 29,30 และ 30,35 ซ้ำ ตามลำดับ) แถว S2 S4 และ S5 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่โฮโมไซกัส (จำนวนซ้ำ 30,30 29,29 และ 30,30 ซ้ำ ตามลำดับ) แถว P2 เป็นตัวอย่างผู้ชายที่เป็นโรค (>200) แถว S7 เป็นตัวอย่างผู้ชายปกติ (จำนวนซ้ำ 29 ซ้ำ) แถว N (negative control) เป็นตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น ผลของการทดสอบในตัวอย่างที่เป็นโรคมียีนส์สูงเกิน 300 คู่เบส (Pre/ full mutation, PFM) และตัวอย่างของคนปกติมีแถบสเมียร์ที่ต่ำกว่า 300 คู่เบส (Normal, NL) และเนื่องจากไพรเมอร์จะจับกับตัวเอง (primer-dimer) จึงปรากฏเป็นแถบในแถวตัวอย่างผู้ชายที่ปกติและในแถวที่ไม่เติมดีเอ็นเอตั้งต้น

การศึกษาจีโนไทป์ของสนิปส์

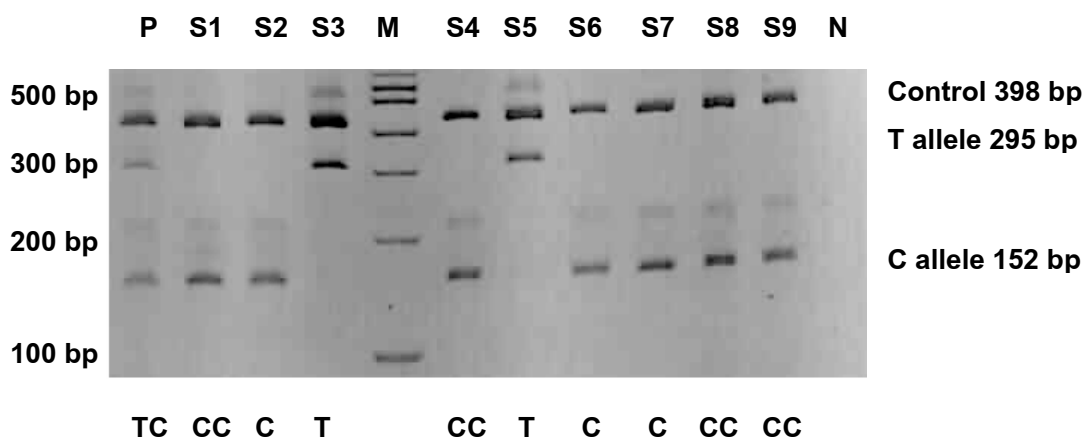
การศึกษาจีโนไทป์แต่ละสนิปส์ด้วยวิธี BiAllelic-ARMS PCR ผลของแต่ละอัลลีลพิจารณาตามขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ดังภาพที่แสดงในรูปที่ 13-18



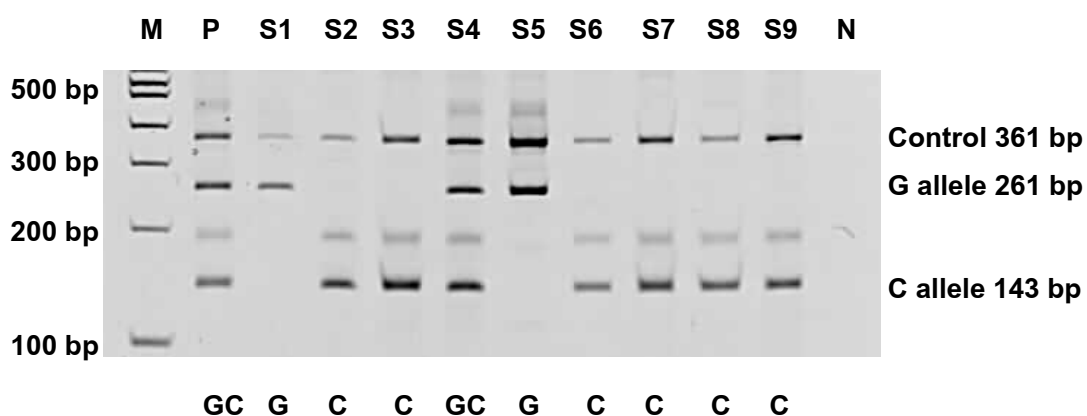
รูปที่ 13. ภาพแสดงผลเจลอะครีลาไมด์ของ **WEX44** แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P (positive control) เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว S1-S6 เป็นตัวอย่างผู้ชาย แถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การยืนยันผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 334 คู่เบส เป็น internal control อัลลีล G มีขนาด 260 คู่เบส และอัลลีล T มีขนาด 130 คู่เบส



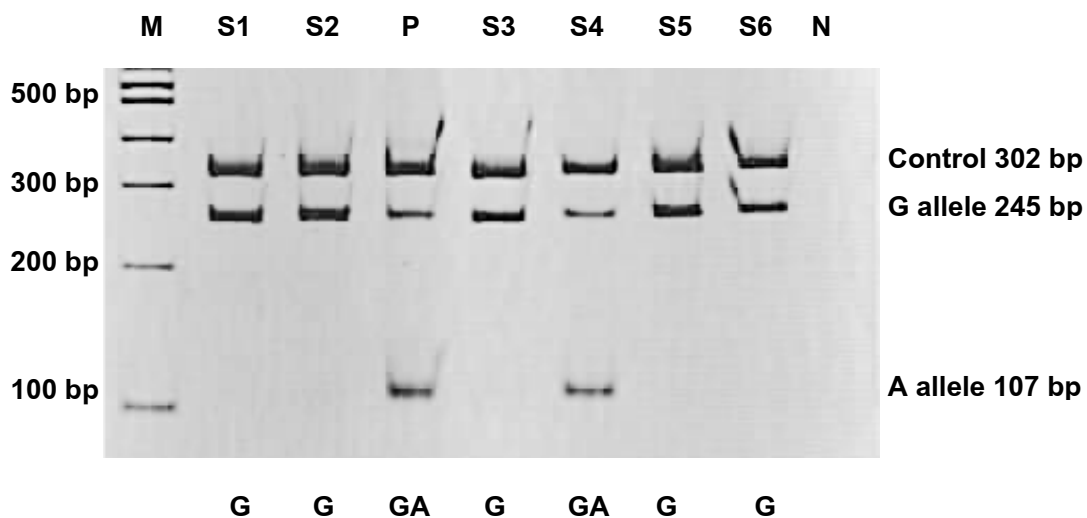
รูปที่ 14. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ WEX70 แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P (positive control) เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว S1-S5 เป็นตัวอย่างผู้ชาย และแถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การยืนยันผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 297 คู่เบส เป็น internal control อัลลีล C มีขนาด 194 คู่เบส และอัลลีล T มีขนาด 152 คู่เบส



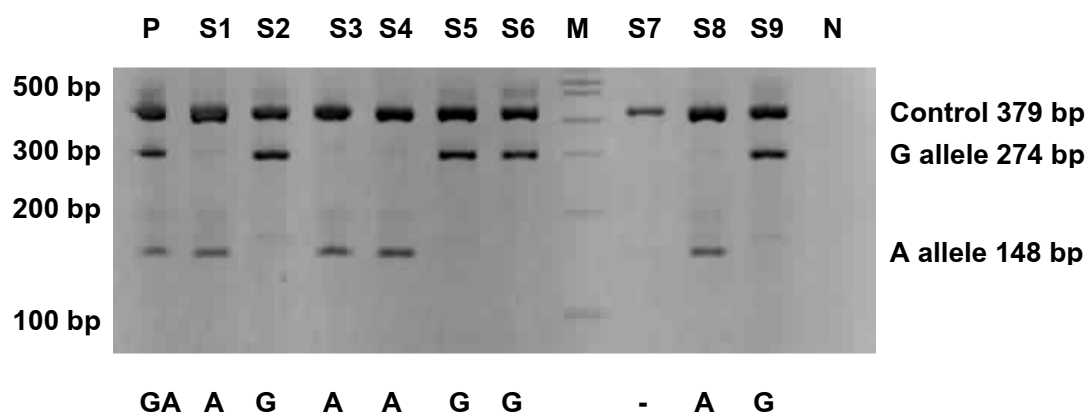
รูปที่ 15. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ **WEX82** แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P (positive control) เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว S1 S4 S8 และ S9 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่เป็นโฮโมไซกัส แถว S2 S3 S5 S6 และ S7 เป็นตัวอย่างผู้ชาย แถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การยืนยันผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 398 คู่เบส เป็น internal control อัลลีล T มีขนาด 295 คู่เบส และอัลลีล C มีขนาด 152 คู่เบส



รูปที่ 16. ภาพแสดงผลเจลอะครีลาไมด์ของ WEX5 แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P (positive control) เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว S1-S3 และ S5-S9 เป็นตัวอย่างผู้ชาย แถว S4 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การยืนยันผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 361 คู่เบส เป็น internal control อัลลีล G มีขนาด 261 คู่เบส และอัลลีล C มีขนาด 143 คู่เบส



รูปที่ 17. ภาพแสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของ **ATL1** แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P (positive control) เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว S1-S3 และ S5-S6 เป็นตัวอย่างผู้ชาย แถว S4 เป็นตัวอย่างผู้หญิง แถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การยืนยันผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 302 คู่เบส เป็น internal control อัลลีล G มีขนาด 245 คู่เบส และอัลลีล A มีขนาด 107 คู่เบส



รูปที่ 18. ภาพแสดงผลเจลอะครีลาไมด์ของ rs25702 แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P (positive control) เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส แถว S1-S9 เป็นตัวอย่างผู้ชาย แถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การยืนยันผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 379 คู่เบส เป็น internal control อัลลีล G มีขนาด 274 คู่เบส และอัลลีล A มีขนาด 148 คู่เบส

การศึกษาความสมดุลของประชากร (Hardy-Weinberg equilibrium) ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) และกลุ่มควบคุม

จากการประมวลผลจีโนไทป์ทุกสไนป์สในตัวอย่างผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมทั้งผู้หญิงและผู้ชายด้วยโปรแกรม Haploview ความสำเร็จในการทดสอบจีโนไทป์เกือบทุกสไนป์สร้อยละ 100 ยกเว้น ตำแหน่ง WEX44 ที่ไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในผู้ป่วย 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 98.9 และจากการศึกษาพบว่า WEX70 มีค่า MAF ของอัลลีล C 0.004 ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนไทย ($MAF < 0.05$) จึงนำออกจากการศึกษา และในสไนป์สตำแหน่ง WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702 มีค่า MAF 0.301 (T) 0.260 (T) 0.412 (C) 0.242 (A) และ 0.306 (G) ตามลำดับ การศึกษาความสมดุลของประชากรทุกสไนป์สอยู่ในภาวะสมดุลตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) โดยมีค่า P ของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (HWpval) ของสไนป์ส WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702 คือ 0.4217 0.8001 0.5638 0.7205 และ 0.0707 ตามลำดับ ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13. ผลการทดสอบฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กและความถี่อัลลีลของแต่ละสไนป์ส WEX44 WEX70 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702 ด้วยโปรแกรม Haploview

ชื่อ	ตำแหน่ง	ObsHET	PredHET	HWpval	MAF	อัลลีล
WEX44	100	0.393	0.421	0.4217	0.301 (T)	G:T
WEX70	60928	0.012	0.009	1	0.004 (C)	T:C
WEX82	93446	0.398	0.385	0.8001	0.26 (T)	C:T
WEX5	113577	0.44	0.485	0.5638	0.412 (C)	G:C
ATL1	120415	0.321	0.367	0.7205	0.242 (A)	G:A
rs25702	143922	0.333	0.425	0.0707	0.306 (G)	A:G

ObsHET: ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed Heterozygosity)

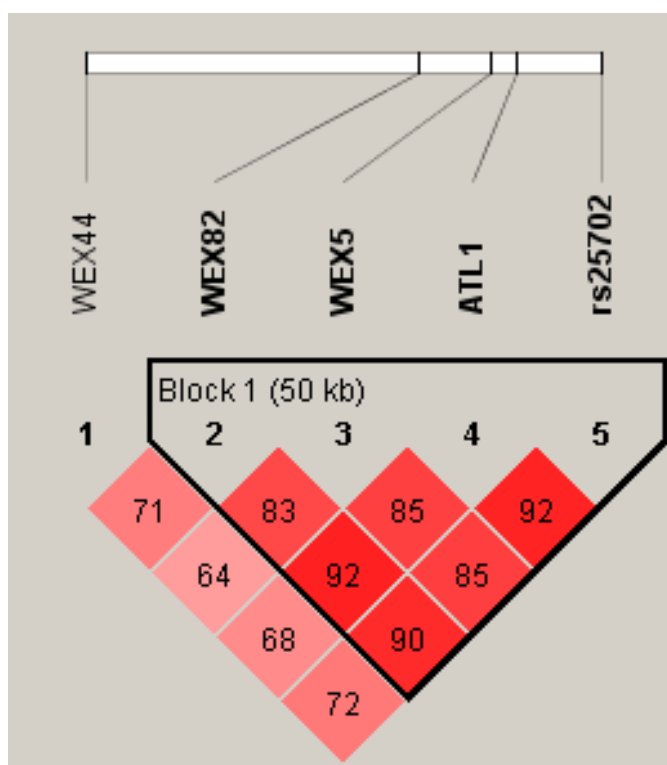
PredHET: ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (Predicted Heterozygosity)

HWpval: ค่า P ของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg P value)

MAF: ค่าความถี่อัลลีลค่าน้อย (Minor allele frequency)

การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) ของสปีส์ในยีน *FMR1*

การวิเคราะห์ LD เพื่อศึกษาว่าอัลลีลที่อยู่คนละตำแหน่งบนโครโมโซมเดียวกัน มีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าคาดหวัง ในการศึกษาพบว่ามี 1 บล็อก ของ LD ประกอบด้วยสปีส์ WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702 มีความยาวประมาณ 50 กิโลเบส และไม่ได้ถ่ายทอดไปด้วยกับ WEX44 ซึ่งอยู่ห่างจาก WEX82 ประมาณ 93 กิโลเบส ดังรายละเอียดที่แสดงใน รูปที่ 19



รูปที่ 19. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD) บนยีน *FMR1* ในตัวอย่างผู้ชายทั้งผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม Haploview การถ่ายทอดไปด้วยกัน พิจารณาจากค่า $D' \geq 0.8$ (โดยในรูปแสดงเป็นร้อยละ)

การศึกษาความถี่ของแต่ละสลิปส์บนยีน *FMR1* กับออทิซึมในผู้ป่วยออทิซึมและกลุ่มควบคุม

การศึกษาความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม โดยศึกษาในผู้ป่วยชายเท่านั้นเพราะยีน *FMR1* อยู่บนโครโมโซมเอกซ์ จากการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น

1. ผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS)
2. ผู้ป่วยจำเพาะออทิซึม
3. ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80
4. ผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) ที่มีประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัว

ซึ่งผลการทดสอบของแต่ละกลุ่มการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 14-17

ตารางที่ 14. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702) บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

สลิปส์	อัลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
WEX44*	T	37	0.296	43	0.283	0.057	0.8107
	G	88	0.704	109	0.717		
WEX82	T	38	0.297	37	0.243	1.012	0.3143
	C	90	0.703	115	0.757		
WEX5	C	54	0.422	65	0.428	0.009	0.9227
	G	74	0.578	87	0.572		
ATL1	A	36	0.281	36	0.237	0.717	0.397
	G	92	0.719	116	0.763		
rs25702	G	41	0.32	45	0.296	0.192	0.6611
	A	87	0.68	107	0.704		

* ตำแหน่ง WEX44 ได้ผลจีโนไทป์ 125 ราย จากผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด 128 ราย เนื่องจาก ไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ AR28-3 AR55-3 และ AR58-3

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายอติซิมและ PDD-NOS 128 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ($P > 0.05$)

ตารางที่ 15. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702) บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายเฉพาะอติซิมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

สลิปส์	อัลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
WEX44*	T	28	0.322	43	0.283	0.402	0.5261
	G	59	0.678	109	0.717		
WEX82	T	31	0.348	37	0.243	3.049	0.0808
	C	58	0.652	115	0.757		
WEX5	C	42	0.472	65	0.428	0.446	0.5043
	G	47	0.528	87	0.572		
ATL1	A	30	0.337	36	0.237	2.836	0.0922
	G	59	0.663	116	0.763		
rs25702	G	33	0.371	45	0.296	1.432	0.2314
	A	56	0.629	107	0.704		

* ตำแหน่ง WEX44 ได้ผลจีโนไทป์ 87 ราย จากผู้ป่วยผู้ชายอติซิม 89 ราย (ไม่รวม PDD-NOS)

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายอติซิม 89 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ($P > 0.05$)

ตารางที่ 16. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702) บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

สลิปส์	อัลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
WEX44*	T	22	0.297	43	0.283	0.05	0.8224
	G	52	0.703	109	0.717		
WEX82	T	22	0.289	37	0.243	0.56	0.4542
	C	54	0.711	115	0.757		
WEX5	C	30	0.395	65	0.428	0.226	0.6348
	G	46	0.605	87	0.572		
ATL1	A	20	0.263	36	0.237	0.189	0.6634
	G	56	0.737	116	0.763		
rs25702	G	25	0.329	45	0.296	0.258	0.6117
	A	51	0.671	107	0.704		

* ตำแหน่ง WEX44 ได้ผลจีโนไทป์ 74 ราย จากผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 จำนวน 75 ราย

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 จำนวน 76 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ($P > 0.05$)

ตารางที่ 17. ความถี่ของอัลลีลแต่ละสลิปส์ (WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702) บนยีน *FMR1* ในผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

สลิปส์	อัลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
WEX44*	T	22	0.306	43	0.283	0.122	0.7271
	G	50	0.694	109	0.717		
WEX82	T	20	0.267	37	0.243	0.144	0.704
	C	55	0.733	115	0.757		
WEX5	C	31	0.413	65	0.428	0.042	0.8375
	G	44	0.587	87	0.572		
ATL1	A	20	0.267	36	0.237	0.24	0.6239
	G	55	0.733	116	0.763		
rs25702	G	23	0.307	45	0.296	0.027	0.8696
	A	52	0.693	107	0.704		

* ตำแหน่ง WEX44 ได้ผลจีโนไทป์ 72 ราย จากผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีข้อมูลรายงานประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัว 75 ราย

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนผู้ป่วยที่มีข้อมูลรายงานประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัว 75 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ($P > 0.05$)

ความถี่ของแฮพลไทป์บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกันของยีน *FMR1* ตั้งแต่ตำแหน่ง WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702 เมื่อนำมาศึกษาความถี่ของแฮพลไทป์ในกลุ่มควบคุม พบแฮพลไทป์หลัก 3 แบบ ได้แก่ CGGA 84 ราย (ร้อยละ 54) TCAG 33 ราย (ร้อยละ 22) และ CCGA 20 ราย (ร้อยละ 13) ตามลำดับ

การเปรียบเทียบความถี่แฮพลไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายและกลุ่มควบคุมใช้โปรแกรม Haploview มีการแบ่งกลุ่มย่อยของกลุ่มผู้ป่วยเหมือนกับการทดสอบแต่ละสลิปส์ได้แก่

1. ผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS)
2. ผู้ป่วยจำเพาะออทิซึม (ไม่รวม PDD-NOS)
3. ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80
4. ผู้ป่วยทั้งหมดที่มีประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัว

จากการทดสอบพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการทดสอบผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) จำเพาะผู้ป่วยออทิซึม ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ในแฮพลไทป์ TGAG โดยมีค่า P และ $P_{corrected}$ คือ 0.0282 (0.039) 0.0227 (0.035) และ 0.0131 (0.028) ตามลำดับ แต่การทดสอบกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดที่มีประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 18-21

ตารางที่ 18. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

แฮพโลไทป์ (82-5-A-702)	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value	Pcorrected
	จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่			
CGGA	66	0.516	84	0.553	0.383	0.5362	1
TCAG	29	0.227	33	0.217	0.036	0.8494	1
CCGA	17	0.133	20	0.132	0.001	0.9758	1
CCGG	4	0.031	8	0.053	0.774	0.3789	1
TGAG	4	0.031	0	0	4.819	0.0282	0.039
TCGG	2	0.016	1	0.007	0.536	0.4639	1
ทั้งหมด	122	0.954	146	0.962			

หมายเหตุ:

1. การจัดเรียงของสโนปส์ในแฮพโลไทป์ 82-5-A-702 คือ WEX82-WEX5-ATL1-rs25702
2. โปรแกรม Haploview จะไม่รายงานแฮพโลไทป์ที่มีความถี่ต่ำ เช่น ในกรณีนี้ผู้ป่วยมีทั้งหมด 128 ราย แต่โปรแกรมรายงาน 122 ราย และกลุ่มควบคุมทั้งหมดทั้งหมด 152 ราย แต่โปรแกรมรายงาน 146 ราย การคำนวณความถี่ทั้งหมด จึงรายงานไม่ครบร้อยละ 100 ได้แก่ ในผู้ป่วยรายงานร้อยละ 95.4 และในกลุ่มควบคุมร้อยละ 96.2

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในแฮพโลไทป์ TGAG P value = 0.0282 Pcorrected = 0.039 โดยพบแฮพโลไทป์ TGAG จำเพาะในผู้ป่วย 4 ราย ที่เป็นผู้ป่วยออทิซึม 3 ราย และ PDD-NOS 1 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุมเลย

ตารางที่ 19. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายจำเพาะออทิซึม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

แฮพโลไทป์ (82-5-A-702)	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value	Pcorrected
	จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่			
CGGA	40	0.449	84	0.553	2.393	0.1219	0.433
TCAG	25	0.281	33	0.217	1.25	0.2635	0.73
CCGA	13	0.146	20	0.132	0.1	0.7522	1
CCGG	2	0.022	8	0.053	1.284	0.2572	0.703
TGAG	3	0.034	0	0	5.188	0.0227	0.035
ทั้งหมด	83	0.932	152	0.955			

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายออทิซึม 89 ราย (ไม่รวมผู้ป่วย PDD-NOS) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ในแฮพโลไทป์ TGAG P value = 0.0227 Pcorrected = 0.035 โดยพบแฮพโลไทป์ TGAG ในผู้ป่วยออทิซึม 3 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 20. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

แฮพโลไทป์ (82-5-A-702)	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value	Pcorrected
	จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่			
CGGA	40	0.526	84	0.553	0.141	0.7069	1
TCAG	15	0.197	33	0.217	0.119	0.7304	1
CCGA	9	0.118	20	0.132	0.079	0.7786	1
CCGG	4	0.053	8	0.053	0	1	1
TGAG	4	0.053	0	0	8.143	0.0043	0.009
รวม	72	0.946	145	0.955			

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีข้อมูลรายงาน non-verbal IQ น้อยกว่า 80 จำนวน 76 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ในแฮพโลไทป์ TGAG P value 0.0043 Pcorrected = 0.009 โดยพบแฮพโลไทป์ TGAG ในผู้ป่วยที่มีรายงาน non-verbal IQ น้อยกว่า 80 จำนวน 4 ราย มาจากผู้ป่วยออทิซึม 3 ราย และ PDD-NOS 1 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม

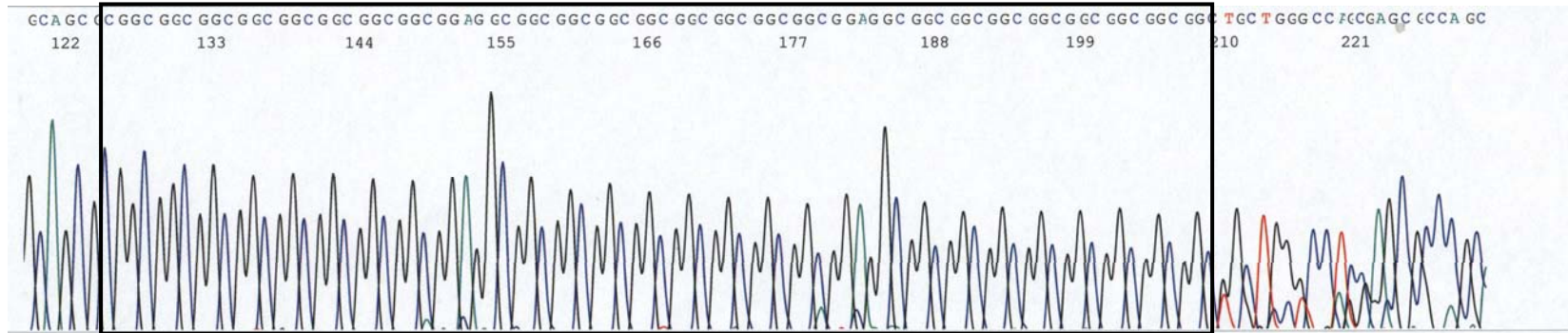
ตารางที่ 21. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน *FMR1* ในกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีประวัติพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้าในครอบครัวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม Haploview

แฮพโลไทป์ (82-5-A-702)	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi square	P value
	จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
CGGA	39	0.52	84	0.553	0.215	0.6426
TCAG	17	0.227	33	0.217	0.027	0.8701
CCGA	11	0.147	20	0.132	0.097	0.7555
CCGG	3	0.04	8	0.053	0.174	0.6768
รวม	70	0.934	145	0.955		

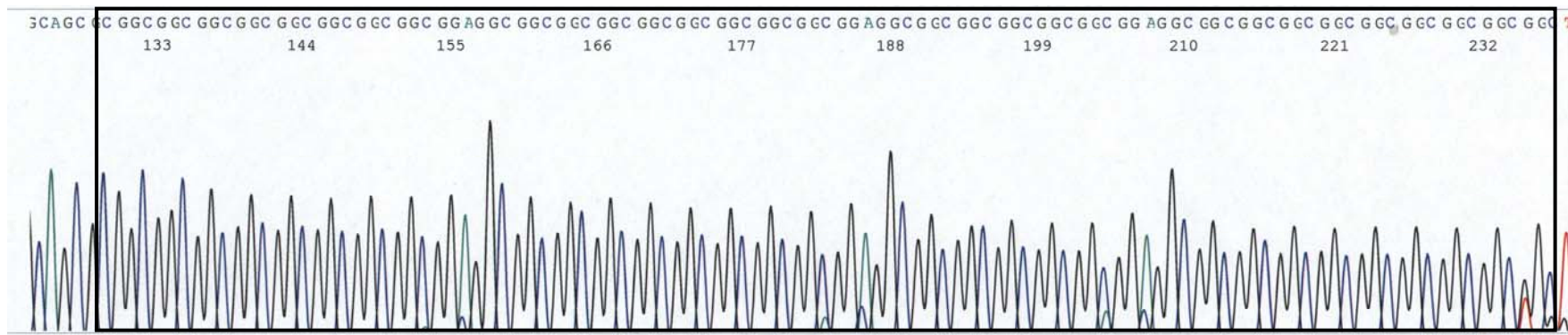
ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมดที่มีพัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้า 75 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 152 ราย ($P > 0.05$)

การยืนยันผลจำนวนซ้ำ CGG และอัลลีลของสนิปส์

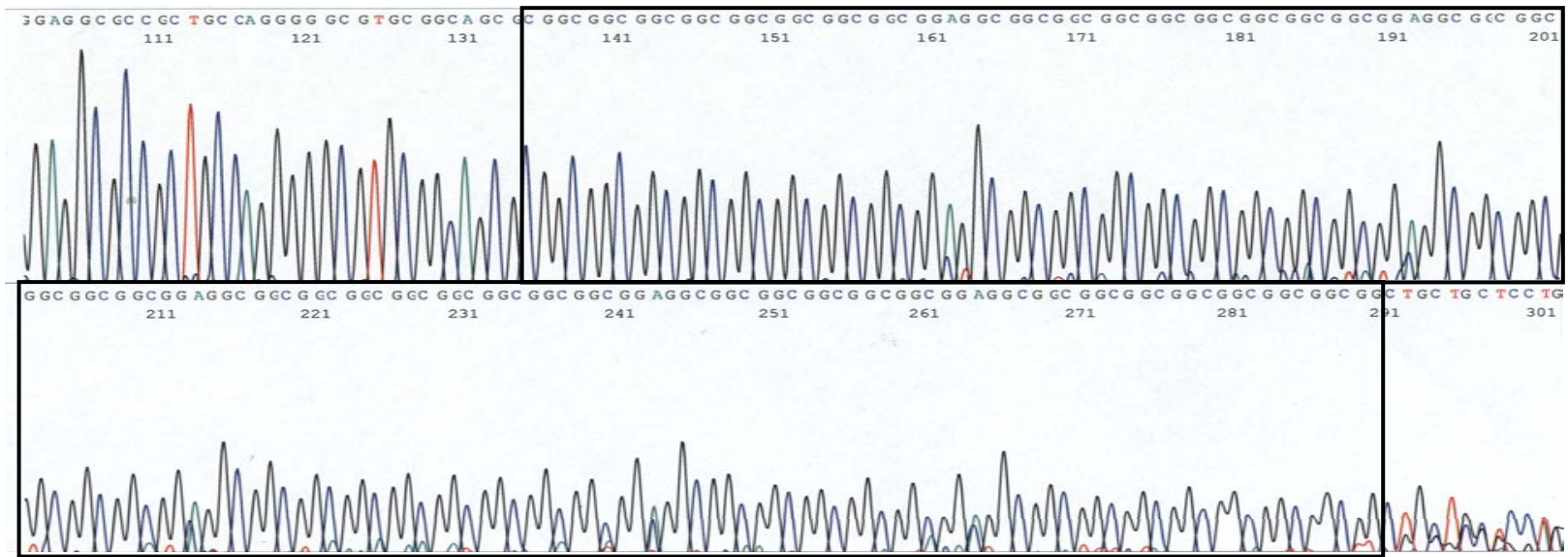
การทดสอบจำนวนซ้ำ CGG และอัลลีลของสนิปส์ที่ไม่มีการทดสอบมาก่อนในคนไทย ได้แก่ WEX44 WEX70 และ WEX82 เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดสอบใช้วิธีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยเลือกตัวอย่างผู้ชายที่มีจำนวนซ้ำ CGG 29 36 และ 52 พบว่า ได้ผลการทดสอบลำดับดีเอ็นเอตรงกับการอ่านจีโนมไทยทั้งการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์สำหรับทดสอบจำนวนซ้ำ (Brown et al., 1993) และวิธีฟลูออเรสเซนซ์ ดังแสดงในรูปที่ 20-22 และจากการเลือกตัวอย่างผู้หญิงที่เป็นเฮเทอโรไซกัสและผู้ชายของสนิปส์ทั้ง 3 ตำแหน่งที่ทดสอบด้วยวิธี Biallelic-ARMS PCR พบว่าผลของจีโนมไทยจากการทดสอบลำดับดีเอ็นเอของสนิปส์ตรงกัน ดังแสดงในรูปที่ 23-25 นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบระหว่างผลจีโนมไทยของสนิปส์และสนิปส์ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรมคลัสตลเอกซ์ (ClustalX) พบว่าถูกต้องตรงกัน ดังแสดงในรูปที่ 26



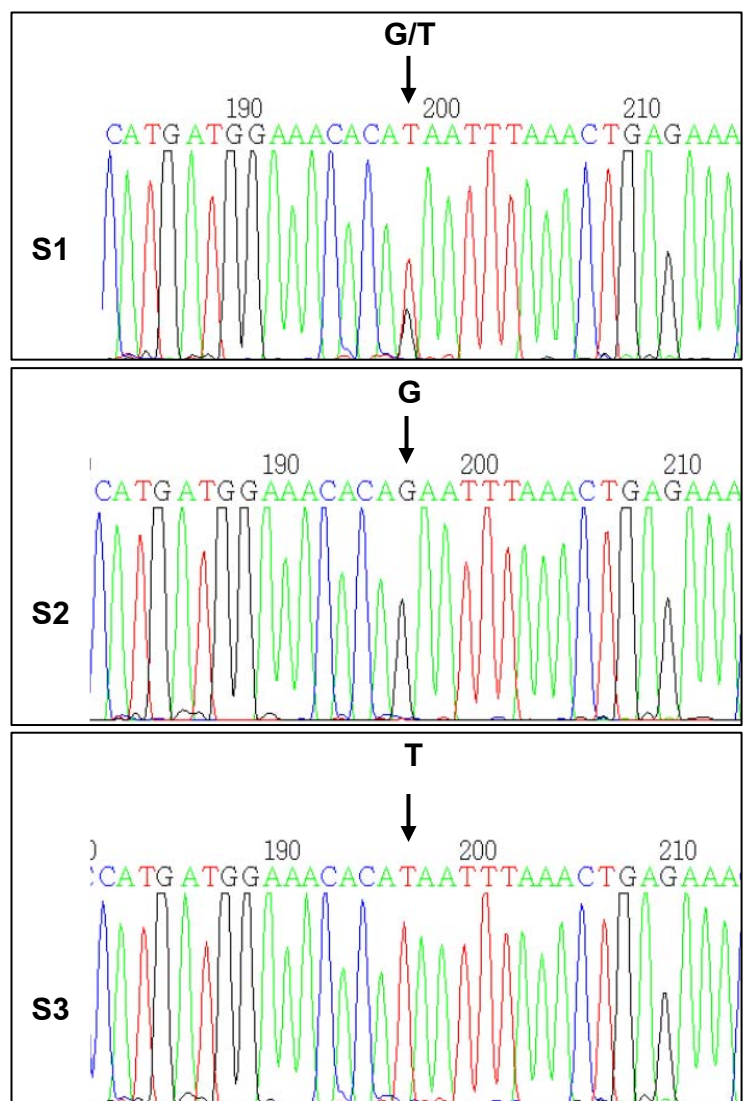
รูปที่ 20. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ CGG 29 ซ้ำ



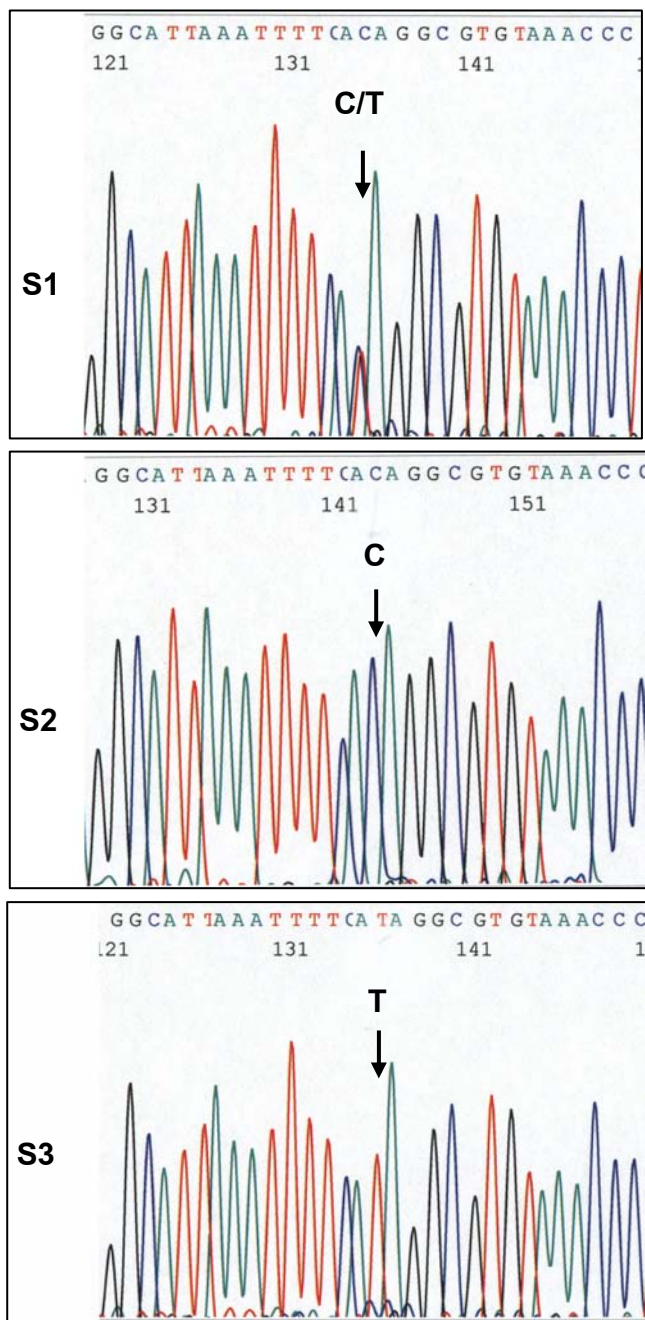
รูปที่ 21. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ **CGG 36** ซ้ำ



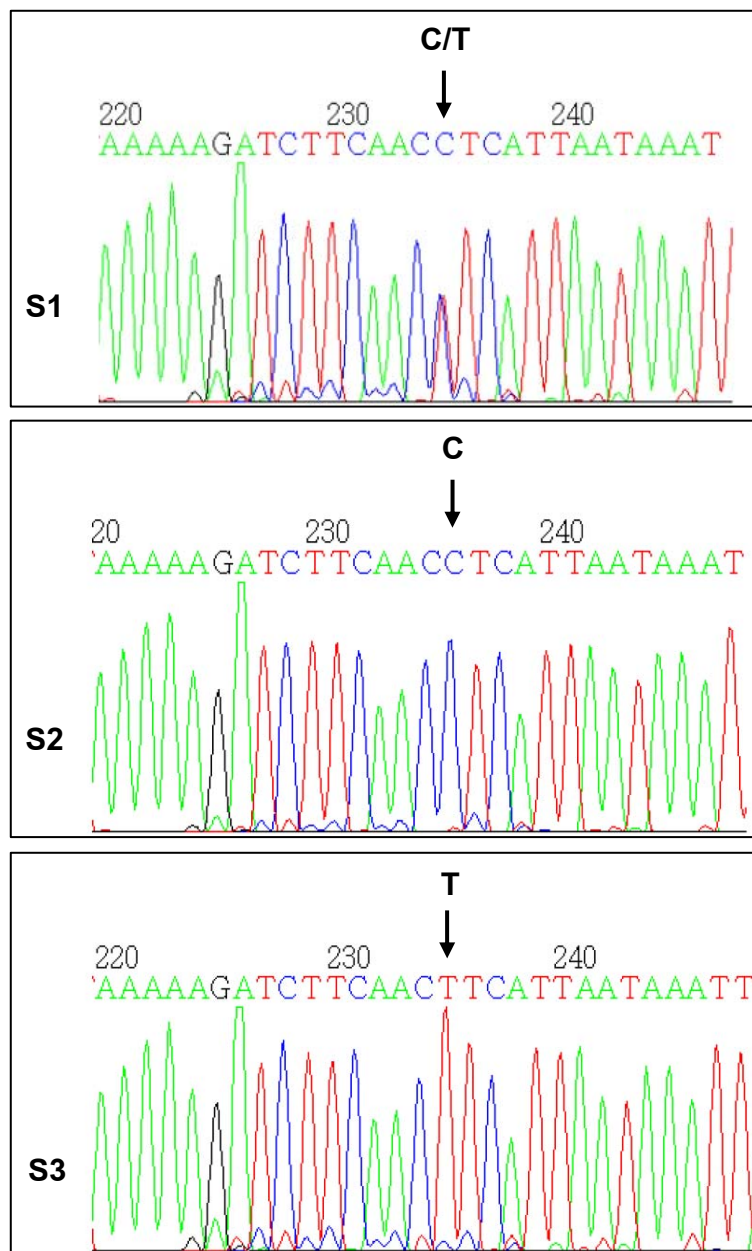
รูปที่ 22. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ CGG 52 ซ้ำ



รูปที่ 23. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของสนิปส์ WEX44 ในตัวอย่าง S1 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัส G/T และในตัวอย่าง S2 และ S3 เป็นตัวอย่างผู้ชายที่มีอัลลีล G และ T ตามลำดับ



รูปที่ 24. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของสไนป์ส์ WEX70 ในตัวอย่าง S1 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัส C/T และในตัวอย่าง S2 และ S3 เป็นตัวอย่างผู้ชายที่มีอัลลีล C และ T ตามลำดับ



รูปที่ 25. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของสลิปส์ WEX82 ในตัวอย่าง S1 เป็นตัวอย่างผู้หญิงที่มีอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัส C/T และในตัวอย่าง S2 และ S3 เป็นตัวอย่างผู้ชายที่มีอัลลีล C และ T ตามลำดับ

WEX44		G/T ↓

1	rs1868140	CATGATGGAAACACAKAATTTAAACTGAGAAA
2	WEX44G	CATGATGGAAACACAGAATTTAAACTGAGAAA
3	WEX44T	CATGATGGAAACACATAATTTAAACTGAGAAA
WEX70		C/T ↓

1	rs45631657	GGCATTAAATTTTCAYAGGCGTGTA AACCCCT
2	WEX70C	GGCATTAAATTTTCACAGGCGTGTA AACCCCT
3	WEX70T	GGCATTAAATTTTCATAGGCGTGTA AACCCCT
WEX82		C/T ↓

1	rs5904648	AAAAGATCTTCAACYTCATTAATAAATTAA
2	WEX82C	AAAAGATCTTCAACCTCATTAATAAATTAA
3	WEX82T	AAAAGATCTTCAACTTCATTAATAAATTAA

รูปที่ 26. การเปรียบเทียบผลของจีโนไทป์ของสลิปส์ WEX44 WEX70 และ WEX82 กับสลิปส์ในฐานข้อมูล rs1868140 rs45631657 และ rs5904648 โดยใช้โปรแกรม ClustalX * ระบุตำแหน่งที่มีเบสเหมือนกัน ตำแหน่งลูกศรและแถบแรเงาระบุตำแหน่งสลิปส์ (K = G/T และ Y = C/T)

บทที่ 4 บทวิจารณ์

การตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึม

การตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะมีความจำเป็นในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมออทิซึม ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจกรองเพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย การทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ด้วยวิธีพีซีอาร์เป็นขั้นตอนแรกที่ใช้ในผู้ป่วย แต่วิธีการทำพีซีอาร์แล้วนำไปไฮบริไดส์ด้วยโพรบ (Brown et al., 1993) เป็นวิธีที่ยุ่งยากและได้จำนวนตัวอย่างน้อย (12 ตัวอย่าง/ 2 วัน) (จากประสบการณ์ของหน่วยพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) จึงมีการใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องทดสอบอัตโนมัติ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและมีความถูกต้องสูงกว่า (Houdayer et al., 1999; O'Connell et al., 2002; Saluto et al., 2005) เนื่องจากสารมาตรฐานผสมกับตัวอย่างในหลุมเดียวกัน ถึงแม้จะมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าวิธีเดิมแต่สามารถทดสอบตัวอย่างได้ปริมาณมากกว่า (96 ตัวอย่าง/ 2 วัน) จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้งสองวิธีพบว่ามีผลบวกปลอม (artifact) ที่มีลักษณะเป็นแถบที่มีขนาดใหญ่กว่าและเล็กกว่าตำแหน่งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จริง สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขณะทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดใหญ่กว่าน่าจะเกิดจากมีการโป่ง (Slippage) ของดีเอ็นเอ และในกรณีที่มีแถบขนาดเล็กกว่าเกิดจากการสังเคราะห์ซ้ำจำนวนซ้ำ ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทดสอบด้วย Capillary electrophoresis มีขนาดเล็กกว่าขนาดจริงจากการยืนยันด้วยการทดสอบลำดับดีเอ็นเอ สอดคล้องกับการทดสอบของ Saluto และคณะ (2005) สาเหตุอาจเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ผิดปกติภายใต้เจล ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดเล็กแสดงผลการอ่านจำนวนซ้ำที่ถูกต้องมากกว่าขนาดใหญ่ เช่น จำนวนซ้ำจริง 52 ซ้ำแต่รายงาน 53 ซ้ำ (O'Connell et al., 2002) ดังนั้น การรายงานด้วยวิธีนี้อาจมีความผิดพลาด ± 1 ซ้ำ จากผลบวกปลอมที่อาจเกิดจากการทดสอบ (Saluto et al., 2005) ในการทดสอบครั้งนี้ยังไม่ได้ยืนยันขนาดสูงสุดที่ทดสอบได้ แต่ทั้งสองวิธีไม่สามารถทดสอบจำนวนซ้ำที่สูงได้เนื่องจากดีเอ็นเอมีปริมาณ G-C สูง แต่ช่วยลดจำนวนของตัวอย่างในการทดสอบจาก 151 ราย เหลือเพียงผู้หญิงที่เป็นปรากฏแถบเดี่ยวซึ่งต้องทดสอบต่อเพียง 15 ราย

การทดสอบด้วยวิธีเมทิลเลชันสเปซิฟิกพีซีอาร์แบบ methylation triplet primed PCR (mTP-PCR) ใช้ไบซัลไฟต์เปลี่ยนอัลลิลจาก C ที่ไม่ถูกเมทิลเลชันเป็น U แต่อัลลิล C ที่ถูกเมทิลเลชันไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Clark et al., 1994) ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจับกับดีเอ็นเอตั้งต้นที่ถูกเมทิลเลชัน 3 เส้น ได้แก่ mTP-F mTP-R และ Tail-R โดย Tail-R จับกับไพรเมอร์ mTP-R ซึ่งส่วนหนึ่งของ mTP-R จับกับดีเอ็นเอทุกจำนวนซ้ำของ CGG 8 ซ้ำ ในการศึกษาที่ใช้วิธี mTP-PCR สำหรับตรวจสอบโครโมโซมเอกซ์ข้างที่ถูกกดไม่ทำงาน (inactive) ในผู้หญิงที่มีจำนวนซ้ำโฮโมไซกัสเพื่อยืนยันว่าไม่มีจำนวนซ้ำของ CGG สูงและไม่มีภาวะเมทิลเลชันผิดปกติ (hypermethylation) คนปกติมีแถบพีซีอาร์สเมียร์สูงไม่เกิน 300 คู่เบส (Normal, NL) คนที่เป็นพาหะและคนที่เป็นโรคจะมีสเมียร์เกิน 300 คู่เบส (Pre/ Full mutation, PFM) เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีหลายขนาดจากการจับแบบสุ่มของไพรเมอร์ mTP-R ซึ่งวิธีนี้ใช้แยกคนที่ปกติออกจากคนที่เป็นพาหะและเป็นโรคได้ แต่ไม่สามารถแยกคนปกติมีจำนวนซ้ำ CGG สูง เช่น 50 ซ้ำ และคนที่เป็นพาหะที่มีจำนวนซ้ำ CGG ต่ำ เช่น 60 ซ้ำ นอกจากนั้นวิธีนี้ไม่สามารถแยกผู้ป่วยที่เป็นพาหะในช่วง premutation และ Full Mutation ได้ เนื่องจากสเมียร์มีลักษณะใกล้เคียงกัน ต้องใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ครอบคลุมตำแหน่ง CGG ที่เหมาะกับดีเอ็นเอตั้งต้นที่ถูกเมทิลเลชันและไม่ถูกเมทิลเลชัน เพื่อเปรียบเทียบผลและขนาดที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในการยืนยันผล (Zhou et al., 2004) หรือใช้วิธีเซาท์เทิร์นบลอตที่เป็นวิธีมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ช่วยลดขั้นตอน (ประมาณ 2 วัน) ลดค่าใช้จ่ายและประหยัดดีเอ็นเอได้กว่า 5 เท่า (2 ไมโครกรัม) ในการทดสอบภาวะเมทิลเลชัน เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบด้วยวิธีเซาท์เทิร์น บลอตที่ใช้ระยะเวลาทดสอบนาน (ประมาณ 5 วัน) และใช้ปริมาณดีเอ็นเอสูง (10 ไมโครกรัม) (Charalsawadi et al., 2005)

ในการศึกษาที่ไม่พบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะจากการตรวจกรองผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 151 ราย จำนวนผู้ป่วยมีมากเพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นที่ไม่พบผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยที่วินิจฉัยเป็นออทิซึมซึ่งมีจำนวนผู้ป่วย 19-123 ครอบครัว (Hallmayer et al. 1994; Holden et al., 1996; Gurling et al., 1997; Klauck et al., 1997; Poon et al., 1998) การพบความถี่ของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึมน้อยอาจเนื่องมาจากผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมออทิซึมมีความน่าจะเป็นน้อยที่มีการผ่าเหล่าของยีน *FMR1* ซึ่งจากการรายงานที่ผ่านมาพบกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยออทิซึมเพียงร้อยละ 1.9-12 (Gurling et al., 1997; Reddy, 2005; Brown et al., 2004) ทั้งนี้ขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาเนื่องจากหากผู้ป่วยมีความผิดปกติของลักษณะทางคลินิกที่สัมพันธ์กับกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะร่วมกับพฤติกรรมออทิซึม แพทย์จะส่งตรวจกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะด้วยเพื่อการวินิจฉัยตามข้อชี้บ่งทางคลินิก

การศึกษานี้พบผู้ป่วยผู้ชาย 3 ราย ที่มีจำนวนซ้ำ CGG ในช่วง intermediate ได้แก่ AR77-3 TM40-3 และ AR54-3 โดยมีจำนวนซ้ำ CGG เท่ากับ 44 46 และ 52 ตามลำดับ ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากทางมารดาโดยมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ จากการทดสอบลำดับดีเอ็นเอในผู้ป่วยที่มีจำนวนซ้ำ CGG 52 ซ้ำ พบว่ามี 5 AGG ตำแหน่งที่ 10 20 27 37 และ 44 โดยมีโครงสร้าง เป็น (CGG)₉-AGG-(CGG)₉-AGG-(CGG)₆-AGG-(CGG)₉-AGG-(CGG)₆-AGG-(CGG)₈ ซึ่งมีความเสถียรของจำนวนซ้ำ CGG สูงเนื่องจากมี AGG คั่นหลายตำแหน่งทางด้านปลาย 3' (Eichler et al., 1996; Crawford et al., 2000) แสพโพลไทป์ของผู้ป่วย คือ CCGA TCAG และ CGGA ตามลำดับ ซึ่งเป็นแสพโพลไทป์ที่พบบ่อยทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม โดยพบร้อยละ 13 22 และ 51 ในกลุ่มผู้ป่วย ตามลำดับ ผู้ป่วยทุกรายในกลุ่มนี้มีประวัติพัฒนาการภาษาล่าช้าในครอบครัว และลักษณะทางคลินิกของจากการสังเกตพฤติกรรมในผู้ป่วยเองพบปัญหาพัฒนาการด้านภาษาล่าช้าและช่นอยู่ไม่นิ่งซึ่งเป็นลักษณะที่พบในผู้ป่วยออทิซึมทั่วไป ผู้ป่วยมี non verbal IQ คือ 61 64 และ 59 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ต่ำระดับน้อย (Mildly impaired or delayed) (From: Categories of IQ scores for Stanford-Binet Intelligence Scale: Fifth Edition) ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากค่า non verbal IQ เฉลี่ยของผู้ป่วยทั้งหมด 65.21 ± 16.83 ข้อมูลทางคลินิกผู้ป่วยที่มีอัลลีลในช่วง intermediate ดังแสดงในตารางที่ 22 การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Aziz และคณะ (2003) ที่รายงานลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีอัลลีลในช่วง intermediate และ premutation มีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคน และไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนซ้ำ CGG และการศึกษาของ Ennis และคณะ (2006) ไม่พบความสัมพันธ์ของพฤติกรรมและระดับสติปัญญาของผู้ป่วยที่มีอัลลีลในช่วง intermediate เช่นกัน

ตารางที่ 22. ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยออทิซึมที่มีจำนวนซ้ำ CGG ในช่วง intermediate

ผู้ป่วย	อายุ		จำนวนซ้ำ CGG	Non Verbal IQ	ประวัติครอบครัว					อาการที่เกี่ยวข้อง				
	ปี	เดือน			ASD	Delay Speech	Learning Problem	Psychiatry	Seizure	Hyperact	Inattend	Toe Walk	Eating Problem	Sleeping Problem
AR77-3	3	0	44	61	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	Yes	No	Yes
TM40-3	3	0	46	64	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No
AR54-3	3	9	52	59	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No

การทดสอบจำนวนซ้ำ CGG ในกลุ่มควบคุมผู้ชายจากภาคกลาง ภาคใต้ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งสิ้น 200 ราย พบว่าจำนวนซ้ำในแต่ละภาคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จึงได้รวบรวมข้อมูลทั้งหมดเป็นกลุ่มเดียวกันและผนวกกับข้อมูลที่ได้มีการรายงานจำนวนซ้ำในคนไทยจากการตรวจกรองผู้ป่วยที่มีภาวะปัญญาอ่อนและพัฒนาการล่าช้าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 – 2549 จำนวน 337 ราย ที่รายงานโดย Limprasert และคณะ (1999) และมีการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมที่ยังไม่ได้รายงานอีก 27 ราย รวมเป็น 364 ราย และจากการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมจากโรงพยาบาลรามาริบัติและโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ในปี พ.ศ. 2550-2551 จำนวน 50 ราย และ 49 ราย ตามลำดับ นำมาเป็นข้อมูลการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ของคนไทยรวมทั้งหมด 663 ราย การเปรียบเทียบการกระจายของ CGG ในคนไทยที่มีการรายงานมาแล้วโดย Rerkamnuaychoke และคณะ (1998) จำนวน 75 อัลลีล พบว่าไม่มีแตกต่างความอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.0833$) ดังรายละเอียดตารางที่ 23 และการเปรียบเทียบการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ของกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 128 ราย และกลุ่มควบคุมทั้งหมด 663 ราย ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 24 และการกระจายของ CGG ในกลุ่มควบคุมผู้ชายแสดงทั้ง 663 ราย แสดงในรูปที่ 27

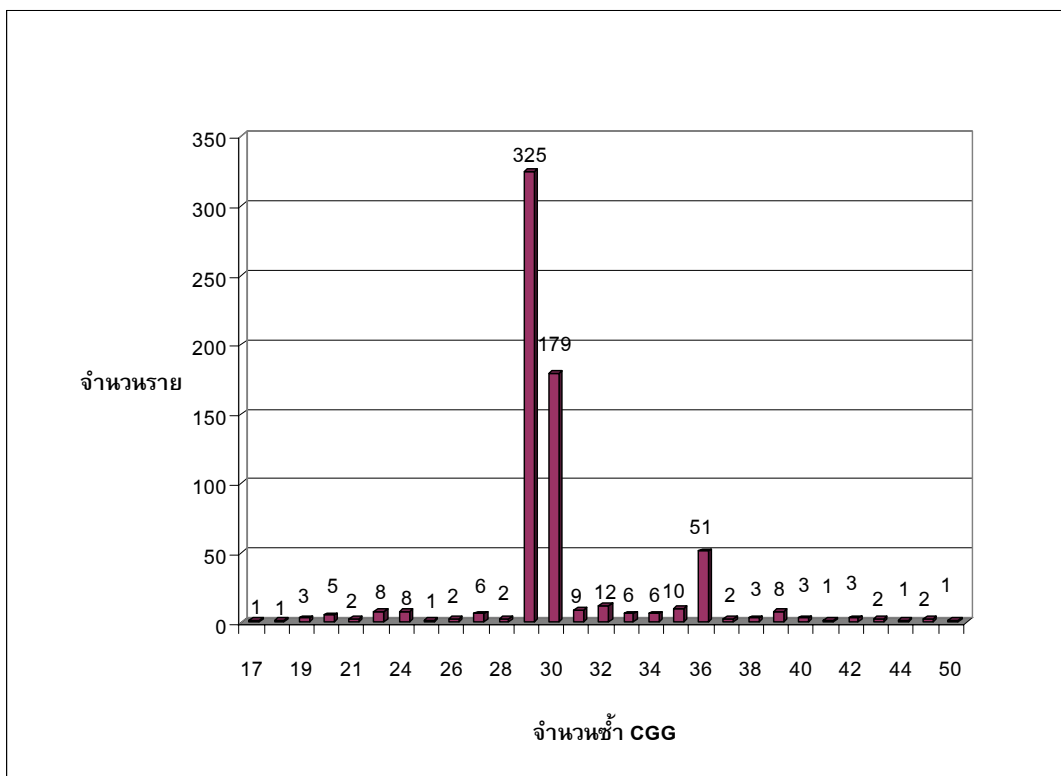
ตารางที่ 23. ความถี่ของจำนวนซ้ำ CGG ในกลุ่มควบคุมผู้ชาย เปรียบเทียบจากการศึกษานี้ 663 อัลลีล กับการรายงานในคนไทยโดย Rerkamnuaychoke และคณะ (1998) 75 อัลลีล

จำนวนซ้ำ CGG	การศึกษานี้		Rerkamnuaychoke และคณะ (1998)		Chi square
	จำนวน (อัลลีล)	ร้อยละ	จำนวน (อัลลีล)	ร้อยละ	
17-28	39	5.9	3	4.0	Chi-square = 9.7276 df = 5 P-value = 0.0833 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
29	325	49.0	40	53.3	
30	179	27	17	22.7	
31-35	43	6.5	7	9.3	
36	51	7.7	6	8	
37-50	26	3.9	2	2.7	
รวม	663	100	75	100	

หมายเหตุ: การศึกษาของ Rerkamnuaychoke และคณะ (1998) รายงานเป็นจำนวนอัลลีลซึ่งมีตัวอย่างทั้งผู้หญิงและผู้ชาย ในการศึกษาเลือกจำเพาะผู้ชายซึ่งมีค่าจำนวนรายเท่ากับอัลลีล

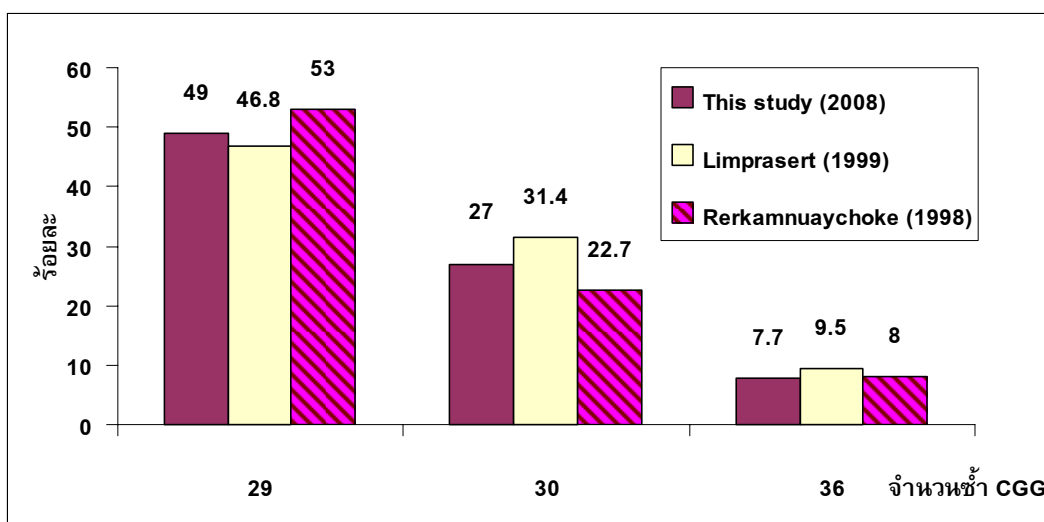
ตารางที่ 24. ความถี่ของจำนวนซ้ำ CGG เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยผู้ชายทั้งหมด 128 ราย กับกลุ่มควบคุมทั้งหมด 663 ราย

จำนวนซ้ำ CGG	กลุ่มผู้ป่วย (ออทิซึมและ PDD-NOS)		กลุ่มควบคุม		Chi square
	จำนวน (ราย)	ร้อยละ	จำนวน (ราย)	ร้อยละ	
17-28	9	7	39	5.9	Chi-square = 0.5872 df = 5 P-value = 0.9886 ไม่มีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญ
29	59	46.1	325	49.0	
30	35	27.3	179	27	
31-35	9	7.0	43	6.5	
36	11	8.6	51	7.7	
37-50	5	3.9	26	3.9	
รวม	128	100	663	100	



รูปที่ 27. แผนภูมิแสดงการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในคนไทยผู้ชายที่เป็นกลุ่มควบคุมทั้งหมด 663 อัลลีล จำนวนอัลลีลที่พบบ่อยในคนไทย คือ 29 30 และ 36 จำนวน 325 ราย (ร้อยละ 49) 175 ราย (ร้อยละ 27) และ 51 ราย (ร้อยละ 7.7) ตามลำดับ

อัลลีลที่พบบ่อยในคนไทย ได้แก่ จำนวนซ้ำ 29 ซ้ำ (ร้อยละ 49) 30 ซ้ำ (ร้อยละ 27) และ 36 ซ้ำ (ร้อยละ 7.7) ไม่แตกต่างจากการศึกษาของ Limprasert และคณะ (1999) คือ จำนวนซ้ำ 29 ซ้ำ (ร้อยละ 46.8) 30 ซ้ำ (ร้อยละ 31.4) และ 36 ซ้ำ (ร้อยละ 9.5) และ Rerkamnuaychoke และคณะ (1998) คือ จำนวนซ้ำ 29 ซ้ำ (ร้อยละ 53) 30 ซ้ำ (ร้อยละ 22.7) และ 36 ซ้ำ (ร้อยละ 8) ดังแสดงในรูปที่ 28



รูปที่ 28. แผนภูมิแสดงการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ที่พบบ่อย ได้แก่ 29 30 และ 36 เปรียบเทียบข้อมูลจากการศึกษานี้ Limprasert และคณะ (1999) และ Rerkamnuaychoke และคณะ (1998) ในคนไทย

การเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม

สไนป์ส์ (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่พบบ่อยในจีโนมประมาณ 1 สไนป์ส์ต่อ 1000 เบส (Wang et al., 1998) สไนป์ส์อาจเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน หน้าที่ของโปรตีนหรือการถอดรหัสโปรตีน (transcription initiation) ซึ่งอาจส่งผลต่อลักษณะที่ปรากฏของแต่ละกลุ่มประชากร สไนป์ส์หลายตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันหรือเรียกว่าแฮพโลไทป์ ใช้บ่งบอกวิวัฒนาการที่ถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษที่ให้ข้อมูลที่ชัดเจนกว่าสไนป์ส์ในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง แฮพโลไทป์ในแต่ละยีนของแต่ละกลุ่มประชากรมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ในช่วงไมโอซิส บางตำแหน่งในจีโนมมีอัตราของการรีคอมบิเนชันสูง (recombination hotspot) โดยโอกาสเกิดรีคอมบิเนชันในตำแหน่งต่างๆ ยังไม่ทราบชัดเจน และขนาดของแฮพโลไทป์ (haplotype block) ที่แตกต่างกันอาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยพันธุกรรมของประชากร เช่น การเปลี่ยนแปลงโดยบังเอิญ (genetic drift) หรือเป็นประชากรในกลุ่มย่อย (population subdivision) ที่ส่งผลให้มีรูปแบบของความหลากหลายในยีนที่แตกต่างกัน สไนป์ส์ที่อยู่ใกล้กันมากมีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันสูงเนื่องจากมีโอกาสการเกิดรีคอมบิเนชันน้อยหรือเรียกว่าอยู่ใน Linkage disequilibrium (LD) ปัจจุบันการศึกษาสไนป์ส์แฮพโลไทป์มีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมกับความเสี่ยงของโรคหรือลักษณะที่ปรากฏ เนื่องจาก

ตำแหน่งที่มีการผ่าเหล่า (mutation) จะพบในแฮพโลไทป์ที่จำเพาะและมีการถ่ายทอดอยู่ในประชากร (Cardon et al., 2001)

จากการศึกษาสลิปส์ในตำแหน่ง FRAXA โดย Brightwell และคณะ (2002a) พบความถี่ประมาณ 1 สลิปส์ต่อ 1024 เบส การศึกษาสลิปส์ของยีน *FMR1* ในคนไทย Thanakitgosate และคณะ (2007) พบว่าตั้งแต่อินทรอน 3-16 (rs25731-IVS10-rs25702-rs25723) มีการถ่ายทอดไปด้วยกัน ($D'=1$) จึงสามารถเลือกสลิปส์ใดสลิปส์หนึ่งในการศึกษาแฮพโลไทป์ สำหรับการศึกษานี้เลือกสลิปส์ในตำแหน่ง rs25702 (อินทรอน 13) เพื่อให้สลิปส์กระจายครอบคลุมทางด้าน 3' นอกจากนี้เลือกสลิปส์ที่อยู่ใกล้กับจำนวนซ้ำของ CGG ได้แก่ WEX5 (5' UTR) และ ATL1 (อินทรอน 1) ซึ่งมีการถ่ายทอดไปด้วยกันน้อยกว่าหรืออาจเป็นตำแหน่งที่เกิดรีคอมบิเนชันสูงกว่าตำแหน่งด้านหลัง CGG ($D' = 0.95$) แต่อย่างไรก็ตามอาจถือได้ว่ายีน *FMR1* มีการถ่ายทอดไปด้วยกันครอบคลุมทั้งยีนที่ศึกษา และสลิปส์ทุกตำแหน่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนไทย

การศึกษานี้ได้เลือกสลิปส์เพิ่มเติมในตำแหน่ง 5' UTR ของยีนเนื่องจากอาจจะเป็นตำแหน่งดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็น enhancer ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของยีน ได้แก่ WEX70 ที่มีการรายงานในประชากรคอเคเซียนว่าอาจเป็น *cis* acting factor ที่เกี่ยวข้องกับความไม่เสถียรของจำนวนซ้ำของ CGG ในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ พบอัลลีล C บ่อยบนโครโมโซมเอกซ์ที่ผิดปกติ (Ennis et al., 2007) แต่การศึกษานี้ได้นำสลิปส์ WEX70 มาศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในผู้ป่วยออทิซึมพบว่า WEX70 ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนไทยเนื่องจากมีค่า MAF ของอัลลีล C 0.004 พบอัลลีล T เกือบร้อยละ 100 ในประชากร อัลลีล C พบในผู้ชาย 1 คน และเฮเทอโรไซกัส (C/T) พบในผู้หญิง 1 คนในกลุ่มควบคุม จึงนำสลิปส์ตำแหน่งนี้ออกจากการศึกษาและคาดว่าตำแหน่งนี้อาจจะไม่มี ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรเอเชีย นอกจากนั้นได้เลือก WEX44 และ WEX82 ที่มีการรายงานว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรเอเชีย คือ จีนและญี่ปุ่น (NCBI)

ผลการศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium) พบว่า WEX82 มีการถ่ายทอดกับตำแหน่งอื่นในยีน *FMR1* แต่ WEX44 อยู่นอก LD ซึ่งพิจารณาจากตำแหน่งพบว่า WEX44 มีระยะทางที่ไกลจากตำแหน่งอื่นในยีนและห่างจาก WEX82 ประมาณ 93 กิโลเบส จากการศึกษา LD ที่ตำแหน่ง FRAXA มีขนาดประมาณ 50 กิโลเบส ไม่แตกต่างจากรายงานของ Mathews และคณะ (2001) ที่ความยาวประมาณ 45 กิโลเบส และ Ennis และคณะ (2007) ประมาณ 55 กิโลเบส ที่ครอบคลุม WEX70 ทั้งนี้ความยาวของ LD ขึ้นกับจำนวนตัวอย่างและวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ รวมถึงการศึกษาของ Ennis และคณะ (2007) ใช้จำนวนสลิปส์ที่มากกว่าและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนคอเคเซียน จากระยะของ LD ที่ไม่

แตกต่างกันนี้ น่าจะสรุปได้ว่าตำแหน่ง FRAXA ที่ครอบคลุมบริเวณ CGG มีการถ่ายทอดไปด้วยกันสูงและมีโอกาสเกิดรีคอมบิเนชันน้อยในยีน (Mathews et al., 2001)

วิธีการศึกษาความสัมพันธ์

การศึกษาความสัมพันธ์เป็นการเปรียบเทียบความถี่อัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรม จีโนไทป์ หรือแฮพโลไทป์ในผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม วิธีการศึกษาแฮพโลไทป์ที่มีการจำแนกกลุ่มผู้ป่วยตามลักษณะที่ปรากฏหรือ endophenotype จะทำให้ข้อมูลมีความน่าเชื่อถือมากกว่าการเลือกกลุ่มผู้ป่วยที่ครอบคลุมเกณฑ์กว้างๆ ซึ่ง endophenotype เป็นลักษณะที่ไม่ได้ปรากฏแต่สามารถวัดได้ เช่น ระดับสติปัญญา (IQ) ระดับฮอร์โมน หรือปริมาณน้ำตาลในเลือด เป็นต้น แฮพโลไทป์แต่ละรูปแบบมีผลต่อการแสดงออกหรือลักษณะของบุคคลที่แตกต่างกัน (Gottesman et al., 2003)

ในการศึกษานี้ศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึมและ PDD-NOS และมีการแบ่งกลุ่มย่อยของผู้ป่วยตามลักษณะทางคลินิก ได้แก่ จำเพาะผู้ป่วยออทิซึมซึ่งมีจำนวนเพียงพอในการวิเคราะห์ (89 ราย) แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้วิเคราะห์ผู้ป่วยจำเพาะ PDD-NOS เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างน้อย (39 ราย) นอกจากนี้มีการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามระดับสติปัญญาแบบไม่ใช้ภาษา (non verbal IQ) และผู้ป่วยที่มีประวัติพัฒนาการด้านภาษาล่าช้าในครอบครัว ซึ่งพบว่าการแบ่งกลุ่มดังกล่าวให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เช่น เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดกับกลุ่มควบคุมพบว่าแฮพโลไทป์ TGAG มีค่า P หลังทดสอบ permutation เท่ากับ 0.039 ซึ่งมากกว่าการเปรียบเทียบจำเพาะผู้ป่วยที่มี non verbal IQ น้อยกว่า 80 ที่มีค่า P เท่ากับ 0.009

ในการศึกษานี้เลือกกลุ่มควบคุมที่เป็นประชากรทั่วไป (population-based) เนื่องจากเป็นการทดสอบยีน *FMR1* ที่อยู่บนโครโมโซมเอกซ์ และศึกษาจำเพาะผู้ชายเนื่องจากจำนวนผู้ป่วยผู้ชายมีมากกว่าผู้หญิง (128 ราย: 23 ราย) จำนวนตัวอย่างของผู้หญิงที่มีน้อยไม่เพียงพอในการวิเคราะห์แบบที่ใช้กลุ่มควบคุมเป็นครอบครัว ซึ่งข้อควรระวังในการศึกษาที่ใช้ประชากรทั่วไปคือการเลือกกลุ่มควบคุมที่ต้องมีพื้นฐานพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ศึกษา (Ennis et al., 2001) เนื่องจากหากเลือกกลุ่มประชากรที่มีความถี่อัลลีลแตกต่างกันอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ในการศึกษานี้เลือกกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมจากภาคกลาง โดยมีการชักประวัติของผู้ป่วย 3 รุ่น ตั้งแต่ปู่ย่าตายายลงมาเพื่อให้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีพื้นฐานพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน แต่อายุระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการทดสอบเนื่องจากอายุไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ และกลุ่มควบคุมไม่มีประวัติทางจิตเวชจึงไม่มีความโน้มเอียงของข้อมูลจากการเลือกกลุ่มควบคุม ในการศึกษาความสัมพันธ์ครั้งนี้ใช้โปรแกรม Haploview ซึ่งสามารถวิเคราะห์การถ่ายทอดไป

ด้วยกันของยีน (Linkage disequilibrium) การสร้าง Haplotype block การรายงานความถี่ของ แอสโทโลไทป์ที่พบในประชากร การศึกษาความสัมพันธ์ทั้งแบบสนิปส์เดี่ยวและแอสโทโลไทป์ และรายงานนัยสำคัญของความสัมพันธ์ด้วยการทดสอบ permutation ที่ทำให้มีความน่าเชื่อถือของข้อมูลมากขึ้น (Barrett et al., 2005) ซึ่งผลการศึกษการเข้าสู่ภาวะความสมดุลของ ประชากรตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ในกลุ่มควบคุมเป็นการ ควบคุมคุณภาพว่าไม่มีประชากรที่มีความถี่อัลลีลแตกต่างที่ทำให้ไม่เข้าสู่ภาวะสมดุล โดยการ ทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium ของโครโมโซมเอกซ์ต้องใส่สนิปส์จีโนไทป์ทั้งผู้หญิงและ ผู้ชาย

การกระจายของความถี่อัลลีลของสนิปส์

เพื่อพิจารณาความเหมือนและความแตกต่างของความถี่อัลลีลและการกระจาย ของทุกสนิปส์ เปรียบเทียบระหว่างการศึกษปัจจุบันและการรายงานที่ผ่านมาในแต่ละเชื้อชาติ พบว่าความถี่อัลลีลในคนไทยในการศึกษานี้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Thanakitgosate (2007) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในตำแหน่ง WEX5 ($P = 0.0018$) ที่การศึกษาใน คนไทยครั้งนี้รายงานค่า MAF (C) 0.412 แตกต่างจากการรายงานของ Thanakitgosate (2007) ที่มี MAF (G) 0.368 ซึ่งอาจจะเกิดจากการเลือกประชากรต่างกลุ่มกัน โดย Thanakitgosate (2007) ได้ศึกษาประชากรส่วนใหญ่จากภาคใต้หรืออาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญ แต่สนิปส์ในตำแหน่ง อื่นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการศึกษาในคน ไทยครั้งนี้กับคนจีนไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกตำแหน่งสนิปส์ ($P > 0.05$) อาจจะเนื่องจากคนไทยบางคนมีบรรพบุรุษที่อพยพมาจากประเทศจีน แต่พบว่ามีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีลระหว่างคนไทยกับคนญี่ปุ่น และคนยุโรป ตามลำดับ แต่สำหรับคน Sub-Saharan African มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เกือบทุกตำแหน่งสนิปส์ ยกเว้น ATL1 ($P = 0.1886$) ข้อมูลความถี่อัลลีลแต่ละสนิปส์ดังแสดง ตารางที่ 25 และการทดสอบไคสแควร์เปรียบเทียบแต่ละเชื้อชาติดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 25. ความถี่อัลลีลของสลิปส์ในแต่ละเชื้อชาติ

Population	WEX44		WEX82		WEX5		ATL1		rs25702	
	G	T	C	T	C	G	A	G	A	G
Thai (2008)	0.699	0.301	0.740	0.260	0.412	0.588	0.242	0.758	0.694	0.306
Thai (2007)	-	-	-	-	0.632	0.368	0.361	0.639	0.609	0.391
Chinese	0.727	0.273	0.647	0.353	0.471	0.529	0.250	0.750	0.667	0.333
Japanese	0.452	0.548	0.545	0.455	0.576	0.424	0.500	0.500	0.500	0.500
European	0.100	0.900	0.278	0.722	0.967	0.033	0.767	0.233	0.089	0.911
Sub-Saharan African	0.383	0.617	0.843	0.157	0.967	0.033	0.167	0.833	0.111	0.889

- Thai (2008): การศึกษาใน

- Thai (2007): Thanakitgosate, 2007

- Chinese Japanese European Sub-Saharan African: NCBI

- WEX70 มีรายงานเฉพาะคนคอเคเซียน ความถี่อัลลีลของ Atlanta T 0.488 และ C 0.512 และ Wessex T 0.514 และ C 0.486 (Ennis et al., 2007) แต่ยังไม่มีการรายงานในฐานข้อมูล NCBI และในการศึกษาในคนไทยครั้งนี้พบว่า WEX70 ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ความถี่อัลลีล T 0.996 และ C 0.004

ตารางที่ 26. การเปรียบเทียบความถี่อัลลีลแต่ละเชื้อชาติ ระหว่างคนไทย (2008) กับการศึกษาในคนไทย (2007) คนจีน ญี่ปุ่น ยุโรป และแอฟริกัน ในตำแหน่งสปีส์ WEX44 WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702

Population	WEX44		WEX82		WEX5		ATL1		rs25702	
	Chi square	P value	Chi square	P value	Chi square	P value	Chi square	P value	Chi square	P value
Thai (2008) vs Thai (2007)	-	-	-	-	9.6988	0.0018*	3.3621	0.0667	1.5911	0.2072
Thai (2008) vs Chinese	0.2858	0.5929	2.0345	0.1538	0.7059	0.4008	0.0173	0.8954	0.1676	0.6823
Thai (2008) vs Japanese	11.8986	0.0006*	8.2773	0.0040*	5.3800	0.0204*	14.2621	0.0002*	7.8216	0.0052*
Thai (2008) vs European	73.6723	0.0000*	42.7026	0.0000*	71.9383	0.0000*	55.1295	0.0000*	76.8225	0.0000*
Thai (2008) vs Sub-Saharan African	19.3923	0.0000*	3.2143	0.0730	71.9383	0.0000*	1.7289	0.1886	70.6648	0.0000*

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

ความสัมพันธ์ของสไนป์สในยีน *FMR1* และออทิซึม

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *FMR1* และออทิซึม แต่ละสไนป์สไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของทุกตำแหน่งสไนป์ส ซึ่งจากการศึกษาของ Vincent และคณะ (2004) ที่ทดสอบจีโนไทป์ในตำแหน่งสไนป์ส IVS10 ไม่พบความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในออทิซึมเช่นกัน ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้เลือกศึกษาตำแหน่ง rs25702 แทน IVS10 แต่ผลการทดสอบจะไม่แตกต่างกัน เนื่องจากสไนป์สสองตำแหน่งนี้มีการถ่ายทอดไปด้วยกัน (Thanakitgosate, 2007) การศึกษาสไนป์สตำแหน่ง WEX82 เป็นตำแหน่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีค่า $P = 0.0808$ ในการทดสอบจำเพาะกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การทดสอบตัวอย่างที่มากขึ้นทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมอาจเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก WEX82 อยู่ในตำแหน่ง 5' UTR ใกล้กับ WEX70 (Ennis et al., 2007) โดยมีระยะห่างประมาณ 32.5 กิโลเบส สไนป์สตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่ควบคุม (regulatory sequence) หรือเป็น enhancer ที่มีความสำคัญต่อการถอดรหัส (transcription) ในยีน *FMR1* ซึ่งมีหลายรายงานที่ศึกษาในสไนป์สในตำแหน่ง 5' UTR ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน เช่น

1. การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับออทิซึมที่พบว่าจำนวนซ้ำของ GGC (มากกว่าหรือเท่ากับ 10 ซ้ำ) พบบ่อยในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งการศึกษาแบบ case-control และ family-based และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *RELN* โดยใช้ luciferase เป็นยีน reporter พบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อจำนวนซ้ำเพิ่มขึ้น (Percico et al., 2001; Chen et al., 2002; Skaar et al., 2005)

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *MET* พบว่าที่ตำแหน่งสไนป์ส rs1858830 พบอัลลีล C บ่อยในผู้ป่วยออทิซึมกว่าในกลุ่มควบคุมที่เป็นประชากรทั่วไปและในครอบครัว และการแสดงออกของยีน *MET* ลดลงในโปรโมเตอร์ที่เป็นอัลลีล C เนื่องจากการเข้าจับของ transcription factor ที่แตกต่างกันจากการศึกษาด้วยวิธี Electrophoretic Mobility Shift and Antibody Supershift Assay (EMSAs) (Campbell et al., 2006)

3. พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสไนป์ส rs4906902 ในยีน *GABRB3* (the GABA receptor beta3 subunit) ในเด็กที่มีภาวะชัก ($P = 0.0070$) และพบว่าเมื่อเปลี่ยนอัลลีล T เป็น C ทำให้โปรโมเตอร์สูญเสียความในการจับกับ transcription activator (N-Oct-3) ซึ่งจำเพาะในระบบประสาททั้งจากการยืนยันด้วยการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน และการจับของโปรตีนด้วยวิธี EMSAs (Urak et al., 2006) เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างสนิปส์แฮพโลไทป์ในยีน *FMR1* และออทิซึม

การวิเคราะห์แบบแฮพโลไทป์มีกำลังมากกว่าการวิเคราะห์สนิปส์ตำแหน่งเดียวเนื่องจากมีจำนวนสนิปส์มากกว่า (Browning et al., 2007) ในการศึกษาวิเคราะห์สนิปส์แฮพโลไทป์ในบล็อกที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกัน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ WEX82-WEX5-ATL1-rs25702 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแฮพโลไทป์ TGAG ($P < 0.05$) จากข้อมูลแต่ละกลุ่มการศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) ผู้ป่วยจำเพาะออทิซึม และผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดที่มี non verbal IQ ต่ำกว่า 80 โดยมี P value ($P_{corrected}$) เท่ากับ 0.0282 (0.039) 0.0227 (0.035) และ 0.0043 (0.009) ตามลำดับ ซึ่งแฮพโลไทป์ TGAG พบในผู้ป่วยเพียง 4 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม

ผู้ป่วยที่มีแฮพโลไทป์ TGAG ได้แก่ AR16-3 AR38-3 AR44-3 และ TM14-3 โดยมีผู้ป่วย PDD-NOS 1 ราย และออทิซึม 3 ราย ทุกรายมีจำนวนซ้ำ CGG 30 ซ้ำ และมีภาวะปัญญาอ่อนในระดับน้อยกว่า 60 (Mildly impaired or delayed) (From: Categories of IQ scores for Stanford-Binet Intelligence Scale: Fifth Edition) คือ 53 46 47 และ 42 ตามลำดับ จากประวัติในครอบครัวของผู้ป่วยที่มีแฮพโลไทป์ดังกล่าวพบว่าผู้ป่วยทุกรายมีการพูดที่ไม่สื่อความหมาย (No any meaningful word) และไม่มีประวัติออทิซึมในครอบครัว ผู้ป่วย 2 ราย (AR16-3 และ AR38-3) มีประวัติพูดช้าในครอบครัว ผู้ป่วยทั้ง 4 ราย มีอาการที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมแตกต่างกันไป เช่น AR44-3 มีเรื่องเดินด้วยปลายเท้า AR16-3 มีปัญหาเรื่องการกิน AR38-3 ไม่มีอาการที่เกี่ยวข้อง ส่วน TM14-3 มีอาการชนอนุ้ยไม่นิ่ง สมาธิสั้น และเดินด้วยปลายเท้า รายละเอียดของประวัติและลักษณะทางคลินิกแสดงในตารางที่ 27

มีการศึกษาความสัมพันธ์ของหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการด้านภาษาในผู้ป่วยออทิซึม ได้แก่ ยีน *WNT2* โปรตีนที่สร้างยีนนี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต (growth factor-like proteins) โดยใช้สนิปส์ 2 ตำแหน่ง (McCoy et al., 2001) ยีน *DYX1C1* บนโครโมโซม 15q เกี่ยวข้องกับการอ่าน (dyslexia) และอาจเกี่ยวข้องกับทางด้านภาษา (Ylisaukko-Oja et al., 2005) แต่ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งสองรายงาน และจากการศึกษาของ Alarcon และคณะ (2005) พบว่ายีน *the contactin associated protein-like 2 (CNTNAP2)* ตำแหน่ง 7q35 เป็นยีนในกลุ่ม neurexin พบสนิปส์ที่จำเพาะในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมที่มีความผิดปกติทางด้านภาษาเด่นชัดมากกว่าที่พบในกลุ่มควบคุม ซึ่งในการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่มีประวัติพัฒนาการด้านภาษาล่าช้าในครอบครัวประมาณร้อยละ 60 (75 รายในผู้ป่วยชายทั้งหมด 128 ราย) นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีแฮพโลไทป์ TGAG 4 ราย เป็นผู้ป่วยที่มีปัญหาด้านการพูดและมีภาวะปัญญาอ่อนที่มี non verbal IQ น้อยกว่า 60

จากการรายงานแอสโทโลไทยที่พบน้อยในกลุ่มผู้ป่วยที่ผู้วิจัยสนใจศึกษาโดย ปัจจัยดังกล่าวอาจเป็นภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรค เช่น ในการศึกษาอื่น *MDR1* (*multidrug resistance-1*) ที่ผลิตโปรตีน membrane transporter P-glycoprotein (P-gp) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลัน (acute lymphoblastic leukemia, ALL) ซึ่งได้มีการรายงานมาแล้วว่า การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในเอกซอน 2 (C3435T) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน แต่มีผลต่อความจำเพาะต่อยาอันเนื่องมาจากการม้วนพับของโปรตีนซึ่งทำให้มีอัตราการแปลรหัสที่แตกต่างกัน และในการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าแอสโทโลไทยที่มีอัลลีล T ซึ่งพบน้อยในประชากรมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลัน ในขณะที่แอสโทโลไทยที่พบบ่อยไม่มีผลต่อการเกิดโรค (Semsei et al., 2008) นอกจากนี้ Liu และคณะ (2005) รายงานการศึกษาในภาวะกระดูกพรุนโดยใช้สนิปส์ 29 ตำแหน่ง ในตัวอย่างผู้ป่วย 1873 ราย พบว่าแอสโทโลไทยที่พบน้อยในยีน parathyroid hormone และ vitamin D receptor ความถี่ร้อยละ 1.1 และ 2.9 ตามลำดับ มีความสัมพันธ์ต่อภาวะกระดูกพรุน

การพบแอสโทโลไทย TGAG ที่พบน้อยในผู้ป่วย 4 รายจากผู้ป่วยชายทั้งหมด 128 ราย (ประมาณร้อยละ 3.1) แต่ไม่พบเลยในกลุ่มควบคุม อาจเป็นความสัมพันธ์ของยีน *FMR1* ในผู้ป่วยออทิซึมหรือการเกิดขึ้นโดยบังเอิญ แต่ควรจะมีการศึกษาในผู้ป่วยออทิซึมที่มากขึ้นเพื่อยืนยันว่าการพบความสัมพันธ์นี้เป็นจริงหรือไม่ การศึกษานี้ยังสรุปไม่ได้ว่ายีน *FMR1* เป็นปัจจัยส่งเสริมภาวะออทิซึมในเด็กไทย

ตารางที่ 27. ประวัติของผู้ป่วยออทิสซึม และ PDD-NOS ที่มีแฮฟโฟลไทป์ TGAG

Individual	อายุ		Non verbal IQ	Diagnosis	ประวัติครอบครัว					Chief Complaint	อาการที่เกี่ยวข้อง				
	ปี	เดือน			ASD	Delay Speech	Learning Problem	Psychiatry	Seizure		Hyperact	Inattend	Toe Walk	Eating Problem	Sleeping Problem
AR16-3	3	5	53	PDD-NOS	No	Yes	No	No	No	No any meaningful word	No	No	No	Yes	No
AR38-3	3	5	46	Autism	No	Yes	No	No	No	No any meaningful word	No	No	No	No	No
AR44-3	3	3	47	Autism	No	No	No	No	No	No any meaningful word	No	No	Yes	No	No
TM14-3	6	7	42	Autism	No	No	No	No	No	No any meaningful word	Yes	Yes	Yes	No	No

N/A: Not available

บทที่ 5

บทสรุป

การตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในการศึกษานี้ไม่พบการผ่าเหล่าของยีน *FMR1* จากการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ CGG ในกลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยทางคลินิกว่าเป็นออทิซึมและ PDD-NOS พบเพียงผู้ป่วยชาย 3 ราย ที่มีจำนวนซ้ำ CGG อยู่ในช่วง intermediate ได้แก่ 44 46 และ 52 ตามลำดับ และได้รับการถ่ายทอดผ่านแม่โดยจำนวนซ้ำไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากข้อมูลการประเมินพฤติกรรมออทิซึมด้วย DSM-IV ทั้งสามรายมีลักษณะที่พบในออทิซึมทั่วไป ได้แก่ พัฒนาการทางด้านภาษาล่าช้า ชนอยู่ไม่นิ่ง และสมาธิสั้น แต่ไม่มีลักษณะทางคลินิกของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบความถี่การกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในกลุ่มควบคุมคนไทยผู้ชาย 4 ภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จึงได้รวบรวมข้อมูลจากทุกภาคผนวกกับข้อมูลที่ได้มีการรายงานมาแล้วโดย Limprasert และคณะ (1999) เป็นกลุ่มควบคุมในคนไทยนำมาเปรียบเทียบกับการกระจายของจำนวนซ้ำ CGG ในผู้ป่วยออทิซึมและ PDD-NOS พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และจากการศึกษาระดับสติปัญญาแบบไม่ใช้ภาษา (non verbal IQ) กับจำนวนซ้ำของ CGG พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *FMR1* และออทิซึมโดยใช้สไนป์ส์ที่ครอบคลุมทั้งยีนพบว่าการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ส์ WEX82 WEX5 ATL1 และ rs25702 ในระยะทางประมาณ 50 กิโลเบส การศึกษาความสัมพันธ์แต่ละสไนป์ส์ในยีน *FMR1* กับออทิซึม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกตำแหน่งสไนป์ส์ แต่การศึกษาในแฮพโลไทป์ของสไนป์ส์ในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแฮพโลไทป์แบบ TGAG ทั้งก่อนและหลังการทดสอบนัยสำคัญด้วยเปอร์มิวเทชัน ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นออทิซึมเท่านั้น และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดที่มี non verbal IQ ต่ำกว่า 80 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีค่า P ($P_{corrected}$) เท่ากับ 0.0282 (0.039) 0.0227 (0.035) และ 0.0043 (0.009) ตามลำดับ แต่ความถี่ของแฮพโลไทป์แบบ TGAG ที่พบน้อยในประชากร (ประมาณร้อยละ 3.1) มีแนวโน้มสัมพันธ์กับระดับสติปัญญาแบบไม่ใช้ภาษาที่น้อยกว่า 60 ในผู้ป่วยออทิซึม หรืออาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญ

ดังนั้นการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ายีน *FMR1* เป็นปัจจัยส่งเสริมในภาวะออทิซึมในคนไทยซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

- Abrahams, B.S. and Geschwind D.H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature*. 9: 341-355.
- Alarcon, M., Yonan, A.L., Gilliam, T.C., Cantor, R.M. and Geschwind, D.H. 2005. Quantitative genome scan and ordered-subsets analysis of autism endophenotypes support language QTLs. *Mol. Psychiatry*. 10: 747-757.
- Alarcon, M., Abrahams, B.S., Stone, J.L., Duvall, J.A., Perederiy, J.V., Bomar, J.M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C.L., Ledbetter, D.H., Neison, S.F., Cantor, R.M. and Geschwind, D.H. 2008. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAPs as an autism susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* 82: 150-159.
- Auranen, M., Nieminan, T., Majuri, S., Vanhala, R., Peltonen, L. and Jarvela, I. 2000. Analysis of autism susceptibility gene loci on chromosome 1p, 4p, 6q, 7q, 13q, 15q, 17q, 19q and 22q in Finnish multiplex families. *Mol. Psychiatry*. 5: 320-322.
- Aziz, M., Stathopulu, E., Callias, M., Taylor, C., Turk, J., Oostra, B., Willemsen, R. and Patton, M. 2003. Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *Am. J. Med.* 121: 119-127.
- Bailey, A., Bolton, P., Butler, L., Le Couteur, A., Murphy, M., Scott, S., Webb, T. and Rutter, M. 1993. Prevalence of fragile X anomaly amongst autistic twins and singletons. *J. Child. Psychol. Psychiatry*. 34: 673-688.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E. and Rutter, M. 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* 25: 63-77.
- Bailey, A., Palferman, S., Heavey, L. and Le Couteur, A. 1998. Autism: The phenotype in relatives. *J. Autism. Dev. Disord.* 28: 369-392.
- Bailey, D.B., Mesibov, G.B., Hatton, D.D., Clark, R.D., Roberts, J.E. and Mathew, L. 1998. Autistic behaviour in young boys with fragile X syndrome. *J. Autism. Dev. Disord.* 28: 499-508.
- Bailey, D.B., Hatton, D.D., Mesobov, G., Ament, N. and Skinner, M. 2000. Early development, temperament, and functional impairment in autism and fragile X syndrome. *J. Autism. Dev. Disord.* 30: 49-59.

- Bailey, D.B., Hatton, D.D., Skinner, M. and Mesibov, G. 2001. Autistic behaviour, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. *J. Autism. Dev. Disord.* 31: 165-174.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 21: 263-265.
- Beilina, A., Tassone, F., Schwartz, P.H., Sahota, P. and Hagerman, P.L. 2004. Redistribution of transcription start sites within the *FMR1* promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. *Hum. Mol. Genet.* 13: 543-549.
- Blomquist, H.K., Bohman, M., Edvinsson, S.O., Gillberg, C., Gustavson, K.H., Holmgren, G., Wahkstrom, J. 1985. Frequency of fragile X syndrome in infantile autism: A Sweden multicenter study. *Clin. Genet.* 27: 113-117.
- Brightwell, G., Wycherley, R. and Waghorn, A. 2002a. SNP genotyping using a simple and rapid single-tube modification of ARMS illustrated by analysis of 6 SNPs in a population of males with FRAXA repeat expansions. *Mol. Cell. Probes.* 16: 297-305.
- Brightwell, G., Wycherley, R., Potts, G. and Waghorn, A. 2002b. A high-density SNP map for the FRAX region of the X chromosome. *J. Hum. Genet.* 47: 567-75.
- Brown, W.T., Jenkins, E.C., Friedman, E., Brooks, J., Wisniewski, K., Raguthu, S. and French, J. 1982. Autism is associated with the fragile-X syndrome. *J. Autism. Dev. Disord.* 12: 303-308.
- Brown, W.T., Jenkins, E.C., Cohen, I.L., Fisch, G.S., Wolf-Schein, E.G., Gross, A., Waterhouse, L., Fein, D., Mason-Brothers, A. and Ritvo, E. 1986. Fragile X and autism: A multicenter survey. *Am. J. Med. Genet.* 23 :341-352.
- Brown, W.T., Houck, G.E. and Jeziorowska, A. 1993. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a non-radioactive PCR test. *JAMA.* 270: 1569-1575.
- Brown, W.T., Nolin, S., Dobkin, C., Houch, G., Glickman, A., Ding, X., Gargano, A., Crawford, L. Gitcho, N., Spence, S. and Geschwind, D. 2004. Frequency of fragile X in multiplex autism testing in AGRE families. *J. Intel. Dis. Res.* 48: 286-290.

- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J.C., O'Donnell, W.T., Tenenbaum, S.A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K.D., Keene, J.D. Darnell, R.B. and Warren, S.T. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*. 107: 477–487.
- Browning, B.L. and Browning, S.R. 2007. Efficient multilocus association testing for whole genome association studies using localized haplotype clustering. *Genet. Epidemiol.* 31: 365-375.
- Buxbaum, J.D., Silverman, J.M., Smith, C.J., Kilifarski, M., Reichert, J., Hollander, E., Lawlor, B.A. Fitzgerald, M., Greenberg, D.A. and Davis, K.L. 2001. Evidence for a susceptibility gene for autism on chromosome 2 and for genetic heterogeneity. *Am. J. Hum Genet.* 68: 1514-1520.
- Campbell, D.B., Sutcliffe, J.S., Ebert, P.J., Militerni, R., Bravaccio, C., Trillo, S., Elia, M., Schneider, C., Melmed, R., Sacco, R., Persico, A.M. and Levitt, P. 2006. A genetic variant that disrupts *MET* transcription is associated with autism. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 103: 16834-16839.
- Cardon, L.R. and Bell, J.I. 2001. Association study designs for complex diseases. *Nat. Rev. Genet.* 2: 91-99.
- Charalsawadi, C., Sripo, T. and Limprasert, P. 2005. Multiplex methylation specific PCR analysis of fragile X syndrome: experience in Songklanagarind Hospital. *J. Med. Assoc. Thai.* 88: 1057-1061.
- Chen, Y., Sharma, R.P., Costa, R.H., Costa, E. and Grayson, D.R. 2002. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic. Acids. Res.* 30: 2930-2939.
- Clark, S.J., Harison, J., Paul, C.L. and Frommer, M. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids. Res.* 22: 2990-7.
- Clifford, S., Dissanayake, C., Bui, M.Q., Huggins, R., Taylor, K.A. and Loesch, Z.D. 2007. Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *J. Autism Dev. Disord.* 37: 738-747.
- Collaborative Linkage Study of Autism (CLSA). 1999. An autosomal genomic screen for autism. *Am. J. Med. Genet.* 88: 609-615.

- Comery, T.A., Harris, J.B., Willems, P.J., Oostra, B.A., Irwin, S.A., Weiler, I.J. and Greenough, W.T. 1997. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94: 5401-5404.
- Cook, E.H. 2001. Genetics of autism. *Child. Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 10: 333-350.
- Costello, J.F. and Plass, C. 2001. Methylation matter. *J. Med. Genet.* 38: 285-303.
- Crawford, D.C., Zhang, F., Wilson, B., Warren, S.T. and Sherman, S.L. 2000. Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1759-1769.
- Curlis, Y., Zhang, C., Holden, J.J., Loesch, P.K. and Mitchell, R.J. 2005. Haplotype study of intermediate-length alleles at the fragile X (FMR1) gene: ATL1, FMRb and microsatellite haplotypes differ from those found in common-size FMR1 alleles. *Hum. Biol.* 77: 137-51.
- de Boule, K., Verkerk, A., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Roy, B.V., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B.A. and Willems, P.J. 1993. A point mutation in the *FMR-1* gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.* 3: 31-35.
- de Graaff, E., Rouillard, P., Willems, P.J., Smits, A.P., Rousseau and F., Oostra, B.A. 1995. Hotspot for deletions in the CGG repeat region of FMR1 in fragile X patients. *Hum. Mol. Genet.* 4: 45-9.
- Demark, J.L., Feldman, M.A. and Holden, J.J. 2003. Behavioral relationship between autism and fragile X syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* 108: 314-326.
- de Vries, B.B., Wiegers, A.M., Smits, A.P., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H.J., Fyns, J.P., Curfs, L.M., Halley, D.J., Oostra, B.A., van den Ouweland, A.M. and Niermeijer, M.F. 1996. Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am. J. Med. Genet.* 58: 1025-1032.
- Drouin, R., Anger, M., Dallaire, N., Rose, T.M., Khandjian, E.W. and Rousseau, F. 1997. Structural and functional characterization of the human FMR1 promoter reveals similarities with the hnRNP-A2 promoter region. *Hum. Mol. Genet.* 6: 2051-2060.

- Duvall, J.A., Lu, A., Cantor, R.M., Todd, R.D., Constantino, J.N. and Geschwind, D.H. 2007. A quantitative trait locus analysis of social responsiveness in multiplex autism families. *Am. J. Psychiatry.* 164: 547-551.
- Eichler, E.E., Richards, S., Gibbs, R.A. and Nelson, D.L. 1993. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1147-1153.
- Eichler, E.E., Macpherson, J.N., Murray, A., Jacobs, P.A., Chakravarti, A. and Nelson, D.L. 1996. Haplotype and interspersed analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5: 319-330.
- Ennis, S., Maniatis, N. and Collins, A. 2001. Allelic association and disease mapping. *Brief. Bioinform.* 2: 375-387.
- Ennis, S., Murray, A., Youings, S., Brightwell, G., Herrick, D., Ring, S., Pembrey, M., Morton, N.E., Jacob, P.A. and The ALSPAC study team. 2006. An investigation of FRAXA intermediate allele phenotype in a longitudinal sample. *Ann. Hum. Genet.* 70: 170-180.
- Ennis, S., Murray, A., Brightwell, G., Morton, N.E. and Jacobs, P.A. 2007. Closely linked cis-acting modifier of expansion of the CGG repeat in high risk FMR1 haplotypes. *Hum. Mutat.* 28: 1216-1224.
- Estecio, M.R.H., Fett-Conte, C.A., Varella-Garcia, M., Fridman, C. and Silva, E.A. 2002. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 32: 35-41.
- Feinstein, C. and Reiss, A.L. 1998. Autism: The point of view from fragile X studies. *J. Autism Dev. Disord.* 28: 393-405.
- Feng, Y., Lakkis, L., Devys, D. and Warren, S.T. 1995. Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 106-113.
- Fisch, G.S., Cohen, I.L., Wolf, E.G., Brown, W.T., Jenkins, E.C. and Gross, A. 1986. Autism and the fragile X syndrome. *Am. J. Psychiatry.* 143: 71-73.
- Fombonne, E. 2002. Epidemiological trends in rates of autism. *Mol. Psychiatry.* 7. (suppl 2): S4-S6.
- Fombonne, E. 2003. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J. Autism Dev. Disord.* 33: 365–382.

- Freitag, C.M. 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol. Psychiatry*. 12: 2-22.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P. and Kouzarides, T. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278: 4035-4040.
- Gottesman, I.I., Psych, H.F.R.C. and Gould, T.D. 2003. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am. J. Psychiatry*. 160: 636-645.
- Gunter, C., Paradee, W., Crawford, D.C., Meadows, K.A., Newman, J., Kunst, C.B., Nelson, D.L., Schwartz, C., Murray, A., Macpherson, J.N., Sherman, S.L. and Warren, S.T. 1998. Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1. *Hum. Mol. Genet.* 7: 1935-46.
- Gurling, H.M., Bolton, P.F., Vincent, J., Melmer, G. and Rutter, M. 1997. Molecular and cytogenetic investigations of the fragile X region including the Frax A and Frax E CGG trinucleotide repeat sequences in families multiplex for autism and related phenotypes. *Hum. Hered.* 47: 254-62.
- Hagerman, R.J., Jackson, A.W., Levitas, A., Rimland, B. and Braden, M. 1986. An analysis of autism in fifty males with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 23: 359-374.
- Hallmayer, J., Pintado, W., Lotspeich, L., Spiker, D., McMahon, W., Peterson, B.P., Nicolas, P., Pingree, C., Kramer, C.H., Wong, L.D., Ritvo, E., Lin, A., Hebert, J., Cavalli-Sfoeza, L.L., iavanello, D.R. 1994. Molecular analysis and test of linkage between the FMR-I gene and infantile autism in multiplex families. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 951-959.
- Hatton, D.D., Sideris, J., Skinner, M., Mankowski, J., Bailey, D.B.J., Roberts, J. and Mirrett, P. 2006. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *Am. J. Med. Genet.* 140A: 1804-1813.
- Hirst, M., Grewal, P., Flannery, A., Slatter, R., Maher, E., Barton, D., Fryns, J.P. and Davies, K. 1995. Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 67-74.

- Ho, H.H. and Kalousek, D.K. 1989. Fragile X syndrome in autistic boys. *J. Autism. Dev. Disord.* 19: 343-347.
- Holden, J.J., Wing, M., Chalifoux, M., Julien-Inalsingh, C., Schutz, C., Robinson, P., Szatmari, P. and White, B.N. 1996. Lack of expansion of triplet repeats in the *FMR1*, *FRA1E* and *FRA1F* loci in male multiplex families with autism and pervasive developmental disorders. *Am. J. Med. Genet.* 64: 399-403.
- Houdayer, C., Lemonnier, A., Gerard, M., Chauve, C., Tredano, M., de Villemeur, T.B., Aymard, P., Bonnefont, J.P. and Feldmann, D. 1999. Improved fluorescent PCR-based assay for sizing CGG repeats at *FRA1A* locus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37: 397-402.
- International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). 1998. A full genome screen for autism with evidence for linkage to region on chromosome 7q. *Hum. Mol. Genet.* 7: 571-578.
- Irwin, S.A., Galvez, R. and Greenough, W.T. 2000. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cerebral. Cortex.* 10: 1038-1044.
- Jin, P. and Warren, S.T. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 9: 901-8.
- Kau, A.S.M., Tierney, E., Bukelis, I., Stump, M.H., Kates, W.R., Trescher, W.H. and Kaufmann, W.E. 2004. Social behavior profile in young males with fragile X syndrome: characteristics and specificity. *Am. J. Med. Genet.* 126A: 9-17.
- Kaufmann, W.E., Cortell, R., Kau, A.S.M., Bukelis, I., Tierney, E., Gray, R.M., Cox, C., Capone, G.T. and Stanard, P. 2004. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 129A: 225-234.
- Klauck, S.M., Münstermann, E., Bieber-Martig, B., Rühl, D., Lisch, S., Schmötzer, G., Poustka, A. and Poustka, F. 1997. Molecular genetic analysis of the *FMR-1* gene in a large collection of autistic patients. *Hum. Genet.* 100: 224-229.
- Le Couteur, A., Bailey, A., Goode, S., Pickles, A., Robertson, S. and Rao, K. 1996. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum of twins. *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 37: 785-802.

- Li, S.Y., Chen, J.Y.C., Lai, T.J., Hsu, C.Y. and W, Y.C. 1993. Molecular and cytogenetic analyses of autism in Taiwan. *Hum. Genet.* 92: 441-445.
- Limprasert, P., Ruangdaraganon, N., Sura, T., Vasiknanonte, P. and Jinorose, U. 1999. Molecular screening for fragile X syndrome in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 30. (Suppl 2): 114-118.
- Limprasert, P., Saechan, V., Ruangdaraganon, N., Sura, T., Vasiknanote, P., Jaruratanasirikul, S. and Brown, W.T. 2001. Haplotype analysis at the FRAXA locus in Thai subjects. *Am. J. Med. Genet.* 98: 224-9.
- Liu, J., Nyholt, D.R., Magnussen P., Parano, E., pavone, P., Geschwind, D., Lord, C. Iversen, P., Hoh, J., Autism genetic Resource Exchange Consortium, Ott, J. and Gilliam, T.C. 2001. A genomewide screen for autism susceptibility loci. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 327-340.
- Liu, P.Y., Zhang, Y.Y., Lu, Y., Long, J.R., Shen, H., Zhao, L.J., Xu, F.H., Xiao, P., Xiong, D.H., Liu, Y.J., Recker, R.R. and Deng, H.W. 2005. A survey of haplotype variants at several disease candidate genes: the importance of rare variants for complex diseases. *J. Med. Genet.* 42: 221-227.
- Lugenbeel, K.A., Peier, A.M., Carson, N.L., Chudley, A.E. and Nelson, D.L. 1995. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nat. Genet.* 10: 438-485.
- Mathews, D.J., Kashuk, C., Brightwell, G., Eichler, E.E. and Chakravati, A. 2001. Sequence variation within the fragile X locus. *Genome. Res.* 11: 1382-1391.
- Mazzocco, M.M., Kates, W.R., Baumgardner, T.L., Freund, L.S. and Reiss, A.L. 1997. Autistic behaviours among girls with fragile X syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* 27: 415-435.
- McCauley, J.L., Li, C., Jiang, L., Olson, L.M., Crockett, G., Gainer, K., Folstein, S.E., Haines, J.L. and Sutcliffe, J.S. 2005. Genome-wide and ordered-subset linkage analyses provide support for autism loci on 17q and 19p with evidence of phenotypic and interlocus genetic correlates. *BMC. Med. Genet.* 6:1.

- McCoy, P.A., Shao, Y., Wolpert, C.M., Donnelly, S.L., Ashley-Koch, A.A., Abel, H.L., Ravan, S.A., Abramson, R.K., Wright, H.H., DeLong, G.R., Cucaro, M.L., Gilbert, J.R. and Pericak-Vance, M.A. 2001. No association between the *WNT2* gene and autistic disorder. *Am. J. Med Genet.* 114: 106-109.
- McGillivray, B.C., Herbst, D.S., Dill, F.J., Sandercock, H.J., Tischler, B., Opitz, J.M. and Reynolds, J.F. 1986. Infantile autism: An occasional manifestation of fragile (X) mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 23: 353-358.
- Meijer, H., de Graaf, E., Merckx, D.M., Jongbloed, R.J., de Die-Smulders, C.E., Engelen, J.J., Frvns, J.P., Curfs, P.M. and Oostra, B.A. 1994. A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3: 615-620.
- Miles, H.J. and Mccathren, B.R. 2005. Autism. <http://www.genetests.org> (accessed 17/05/07).
- Moore, S.J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D.J., Montgomery, T. and Dean, J.C.S. 2000. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J. Med. Genet.* 37: 489-497.
- Nolin, S.L., Brown, W.T., Glicksman, A., Houck, G.E. Jr., Gargano, A.D., Sullivan, A., Biancalana, V., Brondum-Nielsen, K., Hjalgrim, H., Holonski-Feder, E., Kooy, F., Longshore, J., Macpherson, J., Mandel, J.L., Matthijs, G., Rousseu, F., Steinbach, P., Vaisanen, M.L., von Koskull, H. and Sherman, S.L. 2003. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 454-464.
- O'Connell, C.D., Atha, D.H., Jakupciak, J.P., Amos, J.A. and Richie, K.L. 2002. Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements. *Clin. Genet.* 61: 13-20.
- Oostra, B.A. and Chiurazzi, P. 2001. The fragile X gene and its function. *Clin. Genet.* 60: 399-408.
- Oostra, B.A. and Willemsen, R. 2003. A fragile balance: FMR1 expression levels. *J. Hum. Mol. Genet.* 12: R249-R257.

- Parvari, R., Mumm, S., Galil, A., Manor, E., Bar-David, Y. and Carmi, R. 1999. Deletion of 8.5 Mb, including the FMR1 gene, in a male with the fragile X syndrome phenotype and overgrowth. *Am. J. Med. Genet.* 83: 302-307.
- Payton, J., Steele, M.W., Wenger, S.L. and Minshew, N.J. 1989. The fragile X marker and autism in perspective. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 28: 417-421.
- Persico, A.M., D' Agruma, L., Maiorano, N., Totaro, A., Militerni, R. Bravaccio, C., Wassink, T.H., Schneider, C., Melmed, R., Trillo, S., Montecchi, F., Palermo, M., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Reichelt, K.L., Conciatori, M., Marino, R., Quattrocchi, C.C., Baldi, A., Zelante, L., Gasparini, P., Keller, F., Collaborative Linkage Study of Autism. 2001. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol. Psychiatry.* 6: 150-159.
- Persico, A.M. and Bourgeron T. 2006. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environment clues. *Trends Neurosci.* 29: 349-358.
- Persico, A.M., Levitt, P. and Pimenta, A.F. 2006. Polymorphic GGC repeat differentially regulates human reelin gene expression levels. *J. Neural. Transm.* 113: 1373-1382.
- Philippe, A., Martinez, M., Guilloud-Bataille, M., Gillberg C., Rastam, M., Sponheim, E., Coleman, M., Zappella, M., Ashauer, H., Van Maldergem, L., Penet, C., Feingold, J., Brice, A., Leboyer, M. and the Paris Autism Research International Sibpair Study. 1999. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet.* 8: 805-812.
- Piven, J., Gayle, J., Landa, R., Wzorek, M. and Folstein, S. 1991. The prevalence of fragile X in a sample of autistic individuals diagnosed using a standardized interview. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 30: 825-830.
- Poolsuppasit, S., Panyayong, B., Liknapichitkul, D., Serisathien, P. and Chutha, W. 2005. Holistic care for Thai autism. *J. Mental. Health Thai.* 13: 10-16.
- Poon, P.M., Chen, Q.L., Lai, K.Y., Wong, C.K. and Pang, C.P. 1998. CGG repeat interruptions in the FMR1 gene in patients with infantile autism. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36: 649-653.

- Quan, F., Zonana, J., Gunter, K., Peterson, K., Magenis, R.E. and Popovich, B.W. 1995. An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene. *Am. J. Med. Genet.* 56: 1042-1051.
- Reddy, K.S. 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in autism spectrum disorder. *BMC. Med. Genet.* 6: 3–19.
- Reiss, A.L. and Freund, L. 1990. Fragile X syndrome, DSM-III-R, and autism. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 29: 885-891.
- Rerkamnuaychoke, B., Thanakitgosate, J. and Purisa, W. 1998. Length polymorphism of the CGG repeats in FMR1 gene in normal Thais. *Rama. Med. J.* 21: 79-83.
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., Mccague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J, Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wiese-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P.B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D.L., Cavalli-Sforza, L.L., Kraemer, H.C. and Myers, R.M. 1999. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 493-507.
- Roberts, J.E., Weisenfeld, L.A.H., Hatton, D.D., Heath, M. and Kaufmann, W.E. 2007. Social approach and autistic behavior in children with fragile X syndrome. *J. Autism. Dev. Disord.* 37: 1748-1760.
- Rogers, S.J., Wehner, E. and Hagerman, R.J. 2001. The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 22: 409-417.
- Saluto, A., Brussino, A., Tassone, F., Arduino, C., Cagnoli, C., Pappi, P., Hagerman, P., Migone, N. and Brusco, A. 2005. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *JMD.* 7: 605-612.
- Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Moine, H. 2003. The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol. Cell.* 95: 221-228.

- Semsei, A.F., Erdelyi, D.J., Unqviri, I., Kamory, E., Csokay, B. Andrikovics, H., Tordai, A., Csagoly, E., Falus, A., Kovacs, G.T. and Szalai, C. 2008. Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk. Res.* 32:1214-1220.
- Shao, Y., Wolpert, C.M., Raiford, K.L., Menold, M.M., Donnelly, S.L., Ravan, S.A., Bass, M.P., McClain, C., von Wendt, L., Vance, J.M., Abramson, R.H., Wright, H.H., Ashley-Koch, A., Gilbert, J.R., DeLong, R.G., Cuccaro, M.L. and Pericak-Vance, M.A. 2002. Genome screen and follow up analysis for autistic disorder. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatric Genet)* 114: 99-105.
- Shinahara, K., Saijo, T., Mori, K. and Kuroda, Y. 2004. Single-strand conformation polymorphoism analysis of *FMR1* gene in autistic and mentally retarded children in Japan. *J. Med. Inv.* 51: 52-58.
- Simonoff, E., Bolton, P. and Rutter, M. 1996. Mental retardation: genetic findings, clinical implications and research agenda. *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 37: 259-280.
- Skaar, D.A., Shao, Y., Haines, J.L., Stenger, J.E., Jaworski, J., Martin, E.R., DeLong, G.R., Moore, J.H., McCauley, J.L., Sutcliffe, J.S., Ashley-Koch, A.E., Cuccaro, M.L., Folstein, S.E., Gilbert, J.R. and Pericak-Vance, M.A. 2005. Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Mol. Psychiatry.* 10: 563-571.
- Sripo, T., Tandviriyapaiboon, D. and Limprasert, P. 2007. A simple method of DNA isolation method from dry blood spot for screening fragile X syndrome using a multiplex PCR. The 23rd Annual meeting of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, August 15-17, 2007.
- Sullivan, A.K., Marcus, M., Epstein, M.P., Allen, E.G., Anido, A.E., Paquin, J.J., Yadav-Shah, M. and Sherman, S.L. 2005. Association of FMR1 repeat size with ovarion dysfunction. *Hum. Reprod.* 20: 402-412.
- Sung, Y.J., Conti, J., Currie, J.R., Brown, W.T. and Denman, R.B. 2000. RNAs that interact with the fragile X syndrome RNA binding protein FMRP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 973-980.

- Sung, Y.J., Dolzhanskaya, N., Nolin, S.L., Brown, T., Currie, J.R. and Denman, R.B. 2003. The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 278: 15669–15678.
- Sutcliffe, J.S., Nelson, D.L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C.T., Saxe, D. and Warren, S.T. 1992. DNA methylation represses *FMR-1* transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1:397-400.
- Sutherland, G.R., Gedeon, A., Donnelly, A., Byard, R.W., Mulley, J.C., Kremer, E., Lynch, M., Pritchard, M., Yu, S. and Richards, R.I. 1991. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of unstable DNA sequence. *N. Eng. J. Med.* 325: 1720-1722.
- Thanakitgosate, J. 2007. Haplotype analysis using single nucleotide polymorphisms (SNPs) at FRAXA locus in Thai subjects. Master of Science, Faculty of Medicine. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Trottier, Y., Imbert, G., Poustka, A., Fryns, J.P. and Mandel, J.P. 1994. Male with typical fragile X phenotype is deleted for part of the FMR1 gene and for about 100 kb of upstream region. *Am. J. Med. Genet.* 51: 454-457.
- Urak, L., Feucht, M., Fathi, F., Hornik, K. and Fuchs, K. 2006. A GABRB3 promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. *Hum. Mol. Genet.* 15: 2533-2541.
- Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F., Eussen, B.E., van Ommen, G.B., Blonden, L.A.J., Riggins, G.J., Chastain, J.L., Kunst, C.B., Galjaard, H., Caskey, C.T., Nelson, D.L., Oostra, B.A. and Warren, S.T. 1991. Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 65: 905-14.
- Vincent, J.B., Konecki, D.S., Munstermann, E., Bolton, P., Poustka, F. and Gurling, H.M. 1996. Point mutation analysis of the *FMR-1* gene in autism. *Mol. Psychiatry.* 1: 227-231.
- Vincent, J.B., Thevarkunnel, S., Kolozsvari, D., Paterson, A.D., Roberts, W., Scherer, S.W. 2004. Association and Transmission analysis of the *FMR1* IVS10+14C-T variant in autism. *Am. J. Med. Genet.* 125: 54-56.

- Vincent, J.B., Melmer, G., Bolton, P.F., Hodgkinson, S., Holmes, D., Curtis, D. and Gurling, H.M.D. 2005. Genetic linkage analysis of the X chromosome in autism, with emphasis on the fragile X region. *Psychiatric Genet.* 15: 83-90.
- Wade, P.A. 2005. Switching off methylated DNA. *Nature.* 37: 212-213.
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M. and Lander, E.S. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 280: 1077–1082.
- Willemsen, R., Bontekoe, C.J., Severijnen, L.A. and Oostra, B.A. 2002. Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum. Genet.* 110: 601-605.
- Williams, G., King, J., Cunningham, M., Stephan, M., Kerr, B. and Hersh, J.H. 2001. Fetal vaploate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev. Med. Child. Neurol.* 43: 202-206.
- Wöhrle, D., Kotzot, D., Hirst, M.C., Manca, A., Korn, B., Schmidt, A., Barbi, G., Rott, H.D., Poustka, A., Davies, K.E. and Steinbach, P. 1992. A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-I gene and the fragile-X site, in a male with clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 299-306.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R. and Day, I.N. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic. Acid. Res.* 29: E88-8.
- Ylisaukko-Oja, T., Peyrard-Janvid, M., Lindgren, C.M., Rehnström, K., Vanhala, R., Peltonen, L., Järvelä, I. and Kere, J. 2005. Family-based association study of DYX1X1 variants in autism. *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 127-130.
- Yonan, A.L., Alarcon, M., Cheng, R., Magnusson, P.K., Spence, S.J., Palmer, A.A., Grunn, A., Juo, S.H., Terwilliger, J.D., Liu, J., Cantor, R.M., Geschwind, D.H. and Gilliam, T.C. 2003. A genome wide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 886-897.

- Youings, S.A., Murray, A., Dennis, N., Ennis, S., Lewis., McKechnie, N., Pound, M., Sharrock, A. and Jacob, P. 2000. FRAXA and FRAXE: The results of a five year survey. *J. Med. Genet.* 37: 415-421.
- Zhou, Y., Law, H.Y., Boehm, C.D., Yoon, C.S., Cutting, G.R., Ng, I.S. and Chong, S.S. 2004. Robust fragile X (CGG)_n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J. Med. Genet.* 41: e45.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 28. ความชุกของออทิซึมในแต่ละประเทศ

Year	Authors	Country	Area	Size of target population	Number of subjects with autism	Diagnostic Criteria
1966	Lotter	UK	Middlesex	78,000	32	Rating scale
1970	Brask	Denmark	Aarhus County	46,500	20	Clinical
1970	Treffert	USA	Wisconsin	899,750	69	Kanner
1976	Wing <i>et al.</i>	UK	Camberwell	25,000	17 ^a	24 Items rating scale of Lotter
1982	Hoshino <i>et al.</i>	Japan	Fukushima- Ken	609,848	142	Kanner's criteria
1983	Bohman <i>et al.</i>	Sweden	County of Västerbotten	69,000	39	Rutter criteria
1984	McCarthy <i>et al.</i>	Ireland	East	65,000	28	Kanner
1986	Steinhausen <i>et al.</i>	Germany	West Berlin	279,616	52	Rutter
1987	Burd <i>et al.</i>	USA	North Dakota	180,986	59	DSM-III
1987	Matsuishi <i>et al.</i>	Japan	Kurume City	32,834	51	DSM-III
1988	Tanoue <i>et al.</i>	Japan	Southern Ibaraki	95,394	132	DSM-III
1988	Bryson <i>et al.</i>	Canada	Part of Nova-Scotia	20,800	21	New RDC
1989	Sugiyama et Abe	Japan	Nagoya	12,263	16	DSM-III
1989	Cialdella et Mamelle	France	Department (Rhône)	135,180	61	DSM-III like
1989	Ritvo <i>et al.</i>	USA	Utah	769,620	241	DSM-III
1991	Gillberg <i>et al.</i>	Sweden	South-West Gothenburg+ Bohuslän County	78,106	74	DSM-III-R
1992	Fombonne et du Mazaubrun	France	4 régions 14 départements	274,816	154	Clinical- ICD-10 like
1992	Wignyo sumarto <i>et al.</i>	Indonesia	Yogyakarta (SE of Jakarta)	5,120	6	CARS
1996	Honda <i>et al.</i>	Japan	Yokohama	8,537	18	ICD-10
1997	Fombonne <i>et al.</i>	France	3 department	325,347	174	Clinical ICD-10-like

ตารางที่ 28. ความชุกของออทิซึมในแต่ละประเทศ (ต่อ)

Year	Authors	Country	Area	Size of target population	Number of subjects with autism	Diagnostic Criteria
1997	Webb <i>et al.</i>	UK	South Glamorgan, Wales	73,301	53	DSM-III-R
1997	Arvidsson <i>et al.</i>	Sweden (West coast)	Mölnlycke	1,941	9	ICD-10
1998	Sponheim and Skjeldal	Norway	Akershus County	65,688	34	ICD-10
1999	Taylor <i>et al.</i>	UK	North Thames	490,000	427	ICD-10
1999	Kadesjö <i>et al.</i>	Sweden (Central)	Karlstad	826	6	DSM-III- R/ICD-10 Gillberg's criteria (Asperger syndrome)
2000	Baird <i>et al.</i>	UK	South-East Thames	16,235	50	ICD-10
2000	Powell <i>et al.</i>	UK	West Midlands	25,377	62	Clinical/ ICD10/ DSM-IV
2000	Kielinen <i>et al.</i>	Finland	North (Oulu & Lapland)	152,732	187	ICD-8/ ICD-9/ ICD-10
2001	Bertrand <i>et al.</i>	USA	Brick Township, New Jersey	8,896	36	DSM-IV
2001	Fombonne <i>et al.</i>	UK	Angleterre & Pays de Galles	10,438	27	DSM-IV/ ICD-10
2001	Magnússon and Saemundsen	Iceland	Whole Island	43,153	57	Mostly ICD-10
2001	Chakrabarti et Fombonne	UK (Midlands)	Staffordshire	15,500	26	ICD10/ DSM-IV

ที่มา: Fombonne (2003)

ตารางที่ 29. ยีนที่คาดว่าจะก่อให้เกิดภาวะออทิซึม (Candidate genes) รวบรวมจากการศึกษาการถ่ายทอด ความสัมพันธ์ การถ่ายทอดไปด้วยกัน (transmission disequilibrium) การวิเคราะห์ด้วยสนิปส์ และการผ่าเหล่าของยีน

Chromosome locus	Gene	Gene/ protein function
2q24	<i>SLC25A12</i>	Mitochondrial aspartate/glutamate carrier
6p21	<i>GLO1</i>	Zinc metalloenzyme scavenges oxoaldehydes
6q21	<i>GRIK2</i>	Glutamate receptor 6 involved in neural development
7p15-p14.2	<i>HOXA1</i>	Homeobox gene involved in hindbrain development
7q22.1	<i>RELN</i>	Signaling protein involved in neuron migration
7q31	<i>WNT2</i>	Signaling proteins involved in embryonic patterning, cell proliferation and cell determination
7q31	<i>FOXP2</i>	Transcription factor involved in embryogenesis and neural functioning
7q32	<i>UBE2H</i>	Ubiquitin-dependent proteolytic system enzyme
7q36.2	<i>EN2</i>	Homeobox gene involved in midbrain and cerebellum development
10q23.31	<i>PTEN</i>	Tumor suppressor
11p15.5	<i>HRAS</i>	Oncogene GTPase involved in cell division, differentiation and apoptosis
12q14- q15	<i>AVPR1A</i>	Arginine vasopressin receptor involved in social behavior
15q11-q13	<i>UBE3A</i>	Angelman syndrome causative gene encodes ubiquitin protein ligase
15q11.2-q12	<i>ATP10C</i>	Phospholipid transporter involved in CNS signaling

ตารางที่ 29. ยีนที่คาดว่าจะก่อให้เกิดภาวะออทิซึม (ต่อ)

Chromosome locus	Gene	Gene/ protein function
15q11.2-q12	<i>GABRB3</i> , <i>GABRA5</i> , <i>GABRG3</i>	GABA receptor subunits
17q11.1-q12	<i>SLC6A4</i>	Serotonin transporter
17q11.2	<i>NF1</i>	Ras protein regulation
17q21-q22	<i>HOXB1</i>	Homeobox gene involved in hindbrain development
19q13.2	<i>APOE2</i>	Lipoprotein receptor involved in neuronal migration and lipid transport
20q13.12	<i>ADA</i>	Purine metabolism and immune response
Xq13	<i>NLGN3</i>	Neural synapse formation
Xp22.3	<i>NLGN4X</i>	Neural synapse formation
Xp22.13	<i>ARX</i>	Homeobox gene
Xq28	<i>MECP2</i>	Methyl-CpG-binding protein-2

ที่มา: Miles และคณะ (2005)

ตารางที่ 30. ตำแหน่งสลิปส์บนยีน *FMR1*

Polymorphism	Other name	Allele	Location	Nucleotide position (L29074)	Position relative to CGG repeat region (~Kb)	Heterozygosity	Allele frequency	
							Chinese	Japanese
rs2218611	-	A/T	5' UTR	-686029	-699.86	0.499	A - T -	A - T -
rs555559	WEX54	A/G	5' UTR	-384194	-398.68	N.D	A 1.0 G 0.0	A 1.0 G 0.0
rs17312728	WEX28	A/C	5' UTR	-170417	-184.25	0.202	A 1.0 C 0.0	A 1.0 C 0.0
rs236024	WEX83	C/T	5' UTR	-145811	-159.64	0.161	C 0.011 T 0.098	C 0.0 T 1.0
rs1868140	WEX44	C/G	5' UTR	-100998	-114.83	0.484	C 0.636 G 0.364	C 0.570 G 0.430
rs4824253	WEX88	A/G	5' UTR	-61468	-75.30	0.437	A 1.0 G 0.0	A 1.0 G 0.0
rs45631657	WEX70	C/T	5' UTR	-39758	-51.94	N/A	N/A	N/A
rs2121749	WEX74	A/G	5' UTR	-39941	-53.77	0.461	A 0.679 G 0.321	A 0.602 G 0.398
rs2197711	-	A/G	5' UTR	-35725	-49.56	0.487	A 0.614 G 0.386	A 0.580 G 0.420
rs5904647	WEX106	A/G	5' UTR	-21856	-35.69	0.487	A 0.389 G 0.611	A 0.420 G 0.580
rs5904648	WEX82	C/T	5' UTR	-7563	-21.40	0.484	C 0.611 T 0.389	C 0.580 T 0.420

ตารางที่ 30. ตำแหน่งสไนป์บนยีน *FMR1* (ต่อ)

Polymorphism	Other name	Allele	Location	Nucleotide position (L29074)	Position relative to CGG repeat region (~Kb)	Heterozygosity	Allele frequency	
							Chinese	Japanese
rs25705	WEX85	C/T	5' UTR	780	-13.05	0.100	C 1.0 T 0.0	C 1.0 T 0.0
rs10521868	WEX1	A/C	5' UTR	11768	-2.07	0.156	A 0.0 C 1.0	A 0.0 C 1.0
rs1805420 ¹	WEX5, FMR12570	C/G	5' UTR	12570	-1.26	0.352	C 0.523 G 0.477	C 0.523 G 0.477
rs28902	ATL4	C/G	5' UTR	13304	- 0.53	0.049	C - G -	C - G -
FRAXA	-	CGG	Exon 1	13833	0	-	-	-
rs4949 ²	ATL1	A/G	Intron 1	19445	+5.6	0.481	A 0.375 G 0.625	A 0.409 G 0.591
rs25714 ³	IVS10	C/T	Intron 10	38410	+24.6	0.415	C 0.378 T 0.622	C 0.488 T 0.512
rs25702 ⁴	-	A/G	Intron 13	42950	+29.1	0.419	G 0.375 A 0.625	G 0.477 A 0.523

ที่มา: Brightwell และคณะ (2002) Ennis และคณะ (2007) และ dbSNP (NCBI)

¹ ความถี่อัลลีลในผู้ชายไทยกลุ่มควบคุม รายงานโดย Thanakitgosate (2007): C 0.632 และ G 0.368

² ความถี่อัลลีลในผู้ชายไทยกลุ่มควบคุม รายงานโดย Limprasert และคณะ (2001): A 0.312 และ G 0.688

³ ความถี่อัลลีลในผู้ชายไทยกลุ่มควบคุม รายงานโดย Limprasert และคณะ (2001): C 0.304 และ T 0.696

⁴ ความถี่อัลลีลในผู้ชายไทยกลุ่มควบคุม รายงานโดย Thanakitgosate (2007): A 0.609 และ G 0.391

ภาคผนวก ข

25% Ammonium persulfate (1 ml)

APS	0.25	g
Deionized distilled water	1	ml

6% denatured polyacrylamide gel solution

Urea	63	g
10XTBE	15	ml
40% acrylamide	22.5	ml
Sterile water up to 150 ml		

2.5mM dNTPs Mix (400 μ l)

100 mM dATP	10	μ l
100 mM dCTP	10	μ l
100 mM dGTP	10	μ l
100 mM dTTP	10	μ l
Deionized distilled water	360	μ l
Mix well, store at -20 °C		

2.5mM dNTPs Mix with 50% 7-Deaza-dGTP (400 μ l)

100mM dATP	10	μ l
100mM dCTP	10	μ l
100mM dTTP	10	μ l
100 mM dGTP	5	μ l
10 mM 7-deaza-dGTP	50	μ l
Deionized distilled water	315	μ l
Mix well, store at -20 °C		

2.5mM dNTPs Mix with 100% 7-Deaza-dGTP (400 μ l)

100mM dATP	10	μ l
100mM dCTP	10	μ l
100mM dTTP	10	μ l
100 mM 7-deaza-dGTP	10	μ l
Deionized distilled water	360	μ l
Mix well, store at -20 °C		

Loading dye (for denature gel electrophoresis)

Formamide	9.5	ml
0.5 M EDTA, pH 8.0	400	μ l
Bromophenol Blue	0.005	g
Xylene cyanol FF	0.005	g
Deionized distilled water	100	μ l
Mix well, store at -20 °C		

6X Loading dye (for non-denature gel electrophoresis)

Glycerol	1.2	ml
Xylene cyanol FF	0.006	g
Deionized distilled water	2.8	ml
Mix well, store at 4 °C		

6% Polyacrylamide gel (30 ml)

6% Acrylamide solution	30	ml
TEMED	50	μ l
25% APS	50	μ l
Mix well		

50XTAE (1,000 ml)

Tris base	242.28	g
Glacial acetic acid	57.1	ml
EDTA	18.61	g
Deionized distilled water to 1,000 ml, store at 4 °C		

10X TBE (1,000 ml)

Tris base	109.03 g
Boric acid	55.65 g
EDTA	7.45 g

Deionized distilled water up to 1,000 ml, store at room temperature

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวจารุณี มหารัตน์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4910220022	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ วิทยาเขตหาดใหญ่

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิทยาศาสตร์ งานชีวโมเลกุล ฝ่ายบริการเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์
ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Maharat, C., Intaraphad, A. and Jantarasamee, P. 2005. Development of pork DNA detection in meat products by PCR technique. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 27: 993-1002.