



การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน **GABRB3** ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม
An Association Study of the GABRB3 Gene in Thai Children with Autism

กอบกุล ทองสีพัญญู
Kobkul Tongsippunyoo

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต 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

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน GABRB3 ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม
ผู้เขียน นางสาวกอบกุล ทองสีพัญญู
สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นพ.พรพต ลิ้มประเสริฐ) (ดร.อรุณรัศมี วณิชชานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นพ.พรพต ลิ้มประเสริฐ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พญ.สินิจธร รุจิระบรรเจิด)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
โมเลกุลและชีวสารสนเทศ

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

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GABRB3* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม
ผู้เขียน นางสาวกอบกุล ทองสีพัพัญญู
สาขาวิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

ออทิซึม (Autism) เป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติในสามด้านหลักคือ ด้านสังคม ด้านการสื่อสารทางภาษา และด้านความสนใจที่จำเพาะซ้ำเติม จากการศึกษาความสัมพันธ์และการถ่ายทอดยีน *GABRB3* บนแขนยาวของโครโมโซม 15 ตำแหน่ง q11-13 ในผู้ป่วยออทิซึม พบว่ายีน *GABRB3* เป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดภาวะออทิซึม ดังนั้นจึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมจำนวน 144 ราย เทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 251 ราย และศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 121 ครอบครัว โดยผู้ป่วยทุกรายต้องผ่านการตรวจตามเกณฑ์การวินิจฉัย Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV) การศึกษานี้เลือกสไนป์ 7 ตำแหน่งบนยีน *GABRB3* (rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648) ครอบคลุมบริเวณโปรโมเตอร์ถึงอินทรอน 8 การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์ในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Population base case control) และศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลในครอบครัว (Family based association) โดยใช้วิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) การศึกษาโดยวิธี Population base case control พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ rs4542636 ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (อัลลีล: $P = 0.004018$; $df = 1$; จีโนไทป์: $P = 0.01347$; $df = 2$) นอกจากนี้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ rs20317 ($P = 0.04087$; $df = 2$) และสไนป์ rs3212333 ($P = 0.0280$; $df = 2$) ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลในครอบครัวไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ทุกตำแหน่งในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม การศึกษาพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่อัลลีล และความถี่จีโนไทป์ของสไนป์บางตำแหน่งในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่ายีน *GABRB3* อาจเป็นยีนหนึ่งที่เป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดภาวะออทิซึมในเด็กไทย ในอนาคตควรศึกษาตัวอย่างผู้ป่วยที่มากขึ้นเพื่อยืนยันผลการศึกษาในครั้งนี้

Thesis Title An association study of the *GABRB3* gene in Thai children with autism

Author Miss Kobkul Tongsippanyoo

Major Program Molecular Biology and Bioinformatics

Academic Year 2009

ABSTRACT

Autism is a complex genetic neurodevelopmental disorder, characterized by impairment in social interactions and language and patterns of repetitive or stereotyped behaviors. Earlier association and linkage studies have shown that the γ -aminobutyric acid type A receptor beta 3 subunit gene (*GABRB3*), located on the chromosome 15q11-q13, involved with autism. The aim of this study was to investigate the association study between *GABRB3* gene and Thai children with autism. We analyzed SNPs of the *GABRB3* gene in 144 patients with autism, comparing them to 251 normal controls. Parents of 121 out of the 144 patients were also recruited into this study. The study used seven single-nucleotide polymorphisms (rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 and rs2081648) from the promoter to intron 8 and two methods of association study, the population based case control method and the family based association based on the Transmission Disequilibrium Test (TDT). The population based case control study demonstrated that an allele at rs4542636 showed significant association with patients with autism ($P = 0.004018$; $df = 1$). In genotypic distributions, there were significant differences between patients and controls at rs4542636 ($P = 0.01347$; $df = 2$). Moreover, genotypic distributions at rs20317 ($P = 0.04087$; $df = 2$) and rs3212333 ($P = 0.0280$; $df = 2$) were significant differences between patients and controls. The TDT found no significant association in autism families in all SNPs. Consequently, our findings suggest that the *GABRB3* gene is associated with autism in Thai children. Further studies will be required to confirm an association.

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นพ.พรพต ลีประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะ จนงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร.อรุณรัตน์ วัฒนชานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พญ.สินิจธร รุจิระบรรเจิด กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่สละเวลาในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึง พญ.อัฉรีย์ อินทุโสมา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา ที่ให้คำแนะนำและข้อชี้แนะในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันวิจัยจีโนม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BT-B-01-MG-18-4814) ที่ให้ทุนการศึกษา และสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณคณาจารย์ที่สั่งสอนวิชา เจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศที่อำนวยความสะดวก และการดำเนินการด้านเอกสาร เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา เจ้าหน้าที่หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ เจ้าหน้าที่หน่วยธาลัสซีเมีย เจ้าหน้าที่คลังเลือดภาคิวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความรู้ เทคนิคในการทำวิจัย เอื้อเพื่อสถานที่ และอุปกรณ์ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร.ธัญญา ศรีโพธิ์ ที่ให้คำปรึกษา ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิค และชี้แนะการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณนักศึกษาและผู้ช่วยวิจัย คุณจารุณี มหารัตน์ คุณวราพงศ์ สุวรรณรัตน์ คุณนรทัย ไหมศรีขาว คุณเชษฐตุพล พูลจันทร์ คุณออรุณวารรณ ปลั่งอ่อน และคุณสุภาภรณ์ แทนพ่อ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ และความมีน้ำใจช่วยเหลืองานต่างๆ จนทำให้งานครั้งนี้ประสบความสำเร็จ รวมถึงการมีส่วนร่วมทำให้มีความสุขในการทำงาน

ขอขอบคุณน้องนักศึกษาหลักสูตรวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศรุ่น 2 รวมถึงขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา

ขอบพระคุณความรักและกำลังใจจากบุคคลในครอบครัวทุกท่านทั้งคุณยาย คุณแม่ น้องชาย รวมถึงเพื่อนๆ ที่เปรียบเสมือนคนในครอบครัว

กอบกุล ทองสิพพัญญู

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
เนื้อเรื่อง	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	26
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	27
วัสดุและอุปกรณ์	27
วิธีดำเนินการ	32
บทที่ 3 ผลการวิจัย	68
บทที่ 4 บทวิจารณ์	101
บทที่ 5 บทสรุป	115
รายการเอกสารอ้างอิง	116
ภาคผนวก	125
ประวัติผู้เขียน	137

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน <i>ARX</i> ที่พบในผู้ป่วยที่มีภาวะปัญญาอ่อน และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนโครโมโซมเอกซ์	6
2. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน <i>ARX</i> ที่พบในผู้ป่วย Partington syndrome	7
3. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน <i>ARX</i> ที่พบในผู้ป่วยโรคลมชักแบบ West syndrome/Infantile spasms X-linked syndrome (WS/ISSX)	8
4. แสดงยีนที่สร้างโปรตีน $GABA_A$ receptor บนโครโมโซมในตำแหน่งต่างๆ	12
5. แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>GABRB3</i> กับผู้ป่วยออทิซึม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และวิธี MTDT ในการศึกษา	17
6. แสดงการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ใหม่ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 155CA-2 บนยีน <i>GABRB3</i> กับออทิซึม โดยใช้วิธีการ MTDT	18
7. แสดงตำแหน่งสไนป์สแฮพโลไทป์ที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของยีน <i>GABRB3</i> กับภาวะออทิซึม	19
8. แสดงตำแหน่งสไนป์สที่ใช้ในการศึกษาบนยีน <i>GABRB3</i>	21
9. แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>GABGB3</i> , <i>GABRA5</i> และ <i>GABRG3</i> บนโครโมโซม 15 กับภาวะออทิซึม	22
10. แสดงข้อดีข้อเสียของการศึกษาด้วยวิธี Population base case control และ Family based association	25
11. แสดงจำนวนผู้ป่วยออทิซึม และ PDD-NOS ที่ใช้ในการศึกษา	28
12. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน <i>ARX</i> โดยวิธีการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)	30
13. แสดงตำแหน่งสไนป์สบนยีน <i>GABRB3</i> ที่ใช้ในการศึกษา	41
14. แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับศึกษาจีโนไทป์ของสไนป์สในแต่ละตำแหน่ง	45
15. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส rs4542636	48
16. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส rs2081648	49
17. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส rs4906902	50
18. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส rs20317	51
19. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส rs3212333	52

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
20. แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs1367959	53
21. แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs4906683	54
22. แสดงสีซึ่งบอกการถ่ายทอดไปด้วยกันของค่าLD (Standard Color Scheme)	60
23. แสดงค่าฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตีของสนิปส์ทุกตำแหน่ง	79
24. ความถี่อัลลีลของสนิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน <i>GABRB3</i> ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด เทียบกับกลุ่มควบคุม	81
25. ความถี่จีโนไทป์ของสนิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน <i>GABRB3</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม	83
26. ความถี่จีโนไทป์ของสนิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน <i>GABRB3</i> ในกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	84
27. ความถี่จีโนไทป์ของสนิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน <i>GABRB3</i> ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เทียบกับกลุ่มควบคุม	85
28. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของสนิปส์ rs4906902 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	87
29. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของสนิปส์ rs20317 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	88
30. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของสนิปส์ rs3212333 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	89
31. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของสนิปส์ rs1367959 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	90
32. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของสนิปส์ rs4542636 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	91
33. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของสนิปส์ rs4906683 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	92

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
34. แสดงค่า <i>P</i> -value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สนิปส์ rs2081648 บนยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม	93
35. ค่า <i>P</i> -value ของการถ่ายทอดอัลลีลของสนิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน <i>GABRB3</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด	94
36. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน <i>GABRB3</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด	96
37. แสดงผลการศึกษายีน <i>ARX</i> ที่พบ c.430G>T (p.A144S) ในผู้ป่วย (TM34-3)	105
38. ความถี่อัลลีลของสนิปส์ในแต่ละเชื้อชาติ	109
39. การเปรียบเทียบความถี่อัลลีลแต่ละเชื้อชาติ	110
40. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน <i>ARX</i> ในผู้ป่วย X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia (XLAG) and ACC-AG, agenesis of corpus callosum with abnormal genitalia	126
41. ยีนที่คาดว่าสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม	127
42. แสดงตำแหน่ง SNPs ที่มีการศึกษาบนยีน <i>GABRB3</i>	129

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1. แสดงการสังเคราะห์สารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA	10
2. แสดงลักษณะของ GABA _A GABA _C และ GABA _B receptors	10
3. แสดงรูปแบบ (isoforms) ของ GABA _A receptor แบบต่างๆที่พบในสมองของสัตว์	11
4. แสดงตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ และสโนิปที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>GABA receptor (GABRB3, GABRG3, GABRA5)</i> บนโครโมโซม 15 กับภาวะออทิซึม	14
5. แสดง β 3-mRNA isoform 1 และ 2 ของยีน <i>GABRB3</i>	15
6. แสดงการศึกษาสโนิปบนตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยโรค Childhood absence epilepsy (CAE)	20
7. แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน <i>ARX</i>	33
8. แผนผังแสดงขั้นตอนการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน <i>ARX</i> โดยวิธีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ในผู้ป่วยออทิซึมเฉพาะผู้ชาย	35
9. แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ <i>Ava II</i>	35
10. แสดงผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>Ava II</i>	37
11. แสดงแผนผังขั้นตอนการศึกษาคือความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>GABRB3</i> ในผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการถ่ายทอดในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม	39
12. แสดงตำแหน่งสโนิปในยีน <i>GABRB3</i> ที่ใช้ในการศึกษา	42
13. แสดงการออกแบบไพรเมอร์ด้วยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ (Biallelic-ARMS PCR)	44
14. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสโนิป rs4542636	48
15. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสโนิป rs2081648	49
16. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสโนิป rs4906902	50
17. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสโนิป rs20317	51
18. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสโนิป rs3212333	52
19. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสโนิป rs1367959	53
20. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสโนิป rs4906683	54
21. แสดงข้อมูล (input) นามสกุล .dat ที่ใช้ในการศึกษาด้วยโปรแกรมแฮพโพลิว	57

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
22. แสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมแฮพโพลิว v4.0	58
23. แสดงผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรมแฮพโพลิว v4.0	60
24. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่า Hardy-Weinberg Equilibrium	62
25. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK เพื่อวิเคราะห์ Association analysis	62
26. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK เพื่อวิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT	63
27. แสดงผลการทดสอบค่า Hardy-Weinberg Equilibrium โดยโปรแกรม PLINK บน command line	64
28. แสดงผลการทดสอบค่า Hardy-Weinberg Equilibrium จากโปรแกรม PLINK	64
29. แสดงผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรม PLINK บน command line	65
30. แสดงผลการวิเคราะห์ Association analysis จากโปรแกรม PLINK	66
31. แสดงผลการวิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT จากโปรแกรม PLINK	67
32. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมของการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T ในยีน ARX	68
33. แสดงการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวที่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.430G>T	69
34. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ในการศึกษาการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี	70
35. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs4906902	71
36. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs20317	72
37. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs3212333	73
38. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs1367959	74
39. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสลิปส์ rs4542636	75
40. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs4906683	76
41. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสลิปส์ rs2081648	77

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
42. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD) บนยีน <i>GABRB3</i>	95
43. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริเวณสไนป์ rs3212333	98
44. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริเวณสไนป์ rs1367959	99
45. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริเวณสไนป์ rs4542636	100
46. แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่ง 144 (ลูกศรชี้) ของ Polyalanine tract ที่ 2 ของโปรตีน ARX	102
47. แสดงแบบจำลองโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ARX	103
48. แสดงแบบจำลองการเกิด Phosphorylation ในโปรตีน ARX บริเวณ polyalanine tract 2	104

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ARX	=	<i>Aristaless Related Homeobox</i>
GABA	=	γ -Amino Butyric Acid
GABRA5	=	<i>γ-Amino Butyric Acid type A receptor alpha 5</i>
GABRG3	=	<i>γ-Amino Butyric Acid type A receptor grammar 3</i>
GABRB3	=	<i>γ-Amino Butyric Acid type A receptor beta 3</i>
PDDs	=	Pervasive Developmental Disorders
PDD-NOS	=	Pervasive Developmental Disorders-Not Otherwise Specifide
APS	=	ammonium persulfate
ARMS	=	amplification refractory mutation system
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
dATP	=	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymidine triphosphate
7-deaza-dGTP	=	7-deaza- deoxyguanosine-5'-triphosphate
dNTPs	=	dATP+ dCTP+ dGTP+ dTTP
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylenediamine tetra-acetic acid, disodium salt
PCR	=	polymerase chain reaction
RNA	=	ribonucleic acid
SNP	=	single nucleotide polymorphism
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	=	Tris acetate, EDTA
TBE	=	Tris borate, EDTA
et al.	=	et ali (Latin) and others
Het	=	heterozygosity
IQ	=	intelligence quotient

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

ml	=	milliliter
μ M	=	micromolar
mM	=	millimolar
MR	=	mental retardation
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
ng	=	nanogram
OD	=	optical density
rpm	=	revolution per minute
sec	=	second (s)
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethyl-ethylenediamine
U	=	unit (s)
UTR	=	untranslated region
MAF	=	minor allele frequency
min	=	minute (s)
μ l	=	microliter
UV	=	ultraviolet
Kb	=	kilobase pair (s)
LD	=	linkage disequilibrium
M	=	molar
bp	=	base pair(s)
$^{\circ}$ C	=	degree Celsius

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ออทิสซึม (Autism) เป็นภาวะความผิดปกติของสมองที่ทำให้เกิดความบกพร่องทางพัฒนาการในสามด้านหลัก ได้แก่ ด้านสังคม ด้านภาษาและการสื่อสาร รวมถึงมีพฤติกรรมและความสนใจจำเพาะซ้ำเติม อาการเหล่านี้เกิดในช่วงต้นของชีวิตมักเกิดก่อนอายุ 3 ปี อุบัติการณ์การเกิดโรคออทิสซึมในคนไทยพบประมาณ 10 ในเด็ก 10,000 คน และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้น ออทิสซึมพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 4:1 จากการศึกษาพบร้อยละ 75 ของผู้ป่วยออทิสซึมมีภาวะปัญญาอ่อน และร้อยละ 30 มีอาการชักร่วมด้วย ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดภาวะออทิสซึมที่ชัดเจน แต่พบร้อยละ 10 ของผู้ป่วยออทิสซึมมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของยีนเดี่ยว ความผิดปกติของโครโมโซม การติดเชื้อมาระหว่างตั้งครรภ์ หรือปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับสิ่งแวดล้อม (Multifactorial inheritance) ส่วนร้อยละ 90 ของผู้ป่วยออทิสซึมยังไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับการเกิดภาวะออทิสซึม พบยีนมากกว่า 10 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง เช่น ยีน *FMR1*, *RELN*, *MECP2*, *GABRB3*, *NLGN3* และ *NLGN4X* เป็นต้น

การศึกษาส่วนหนึ่งพบความไม่สมดุลของสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA neurotransmitter system ในผู้ป่วยออทิสซึม คือ มีปริมาณสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA (Gamma-Amino Butyric Acid) ในพลาสมาและสมองสูงกว่ากลุ่มควบคุม และพบการทำงานของ GABA receptors ในสมองของผู้ป่วยออทิสซึมลดลง เมื่อกลไกการทำงานของสารสื่อประสาทแบบยับยั้งผิดปกติไป ส่งผลให้สมองถูกกระตุ้นมากเกินไปไม่สามารถควบคุมกลไกการทำงานตามปกติได้ จากการศึกษาพบยีน *GABA type A receptors* บางตำแหน่งเป็น candidate gene ของภาวะออทิสซึมด้วย GABA type A receptor เป็น chloride channels ที่ทำงานร่วมกับสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA ในระบบสมองส่วนกลางของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจาก GABA type A receptor มีหลายหน่วยย่อย ที่สร้างขึ้นจากยีนหลายตำแหน่งบนโครโมโซม 4, 5, 6, 15 และ X พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* บนแขนยาวของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q11-13 กับภาวะออทิสซึม คือ พบผู้ป่วยออทิสซึมร้อยละ 1-5 มีการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนยีนตำแหน่งนี้เป็นสองเท่า (Duplication) และพบการหักของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q13.3 แล้วกลับมาเชื่อมต่อกัน (Isodicentric chromosome 15) จากการศึกษาจีโนมไวด์สแกน (Genome wide scans) การศึกษาความสัมพันธ์ (Association analysis) และการถ่ายทอดในครอบครัว (linkage analysis) โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) และ สนิปส์ (single nucleotide

polymorphisms; SNP) สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับการเกิดภาวะออทิซึมมากขึ้น

การศึกษานี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ (Association analysis) ของยีน *GABRB3* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม โดยแบ่งลักษณะของการศึกษาออกเป็น 2 แบบ คือ การศึกษาความสัมพันธ์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีล และความถี่ของจีโนไทป์ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเทียบกับกลุ่มประชากรปกติ (Population base case control) และวิเคราะห์การถ่ายทอดอัลลีลในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม (Family based association) โดยวิธีการ Transmission Linkage Disequilibrium (TDT) ซึ่งใช้สปีส์ที่ครอบคลุมทั่วทั้งยีน *GABRB3*

การตรวจเอกสาร

ออทิซึม

ออทิซึม (Online Mendelian in Man, OMIM 209850) เป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติใน 3 ด้านหลัก คือ ด้านสังคม ด้านการสื่อสารทางภาษา และมีพฤติกรรมหรือความสนใจจำเพาะซ้ำเติม อาการดังกล่าวข้างต้นมักแสดงออกก่อนอายุ 3 ปี ส่วนกลุ่มอาการที่มีการแสดงออกของภาวะออทิซึมไม่ครบเกณฑ์วินิจฉัยทั้ง 3 ด้านหลัก และมีการแสดงอาการเมื่ออายุมากกว่า 3 ปีขึ้นไป เรียกผู้ป่วยในกลุ่มนี้ว่า Pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) ปัจจุบันจึงมักเรียกกลุ่มอาการออทิซึมที่มีความรุนแรงแตกต่างกันว่า Autism Spectrum Disorders (ASD) การศึกษาพบเด็กในกลุ่มอาการออทิซึม มีระดับความสามารถ หรือระดับสติปัญญาตั้งแต่ต่ำกว่าปกติมากไปจนถึงความสามารถสูงกว่าคนทั่วไป

ในปี พ.ศ. 2546 (ค.ศ. 2003) Fombonne ได้รวบรวมข้อมูลความชุกของภาวะออทิซึมทั่วโลกในช่วงปี พ.ศ. 2509 ถึงปี พ.ศ. 2536 (ค.ศ. 1966-1993) มีค่าเฉลี่ยของความชุกเท่ากับ 3-5 คน ต่อประชากร 10,000 คน และในช่วงปี พ.ศ. 2537 ถึงปี พ.ศ. 2546 (ค.ศ. 1994-2003) พบค่าเฉลี่ยของความชุกเพิ่มขึ้นเป็น 7-10 คน ต่อประชากร 10,000 คน และพบอัตราการเกิดภาวะออทิซึมในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงในอัตราส่วน 4:1 (Fombonne, 2003; Fombonne, 2005) สำหรับในประเทศไทย กรมสุขภาพจิตได้ศึกษาความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะออทิซึมในเด็กอายุ 1 ปี ถึง 5 ปี ที่มาตรวจสุขภาพในคลินิกสุขภาพเด็กของโรงพยาบาลและสถานเอนามัยทั่วประเทศ พบความชุกของการเกิดภาวะออทิซึม เท่ากับ 6 คน ต่อประชากร 10,000 คน และมีรายงานความชุกของภาวะออทิซึมในประเทศไทยประมาณ 10 คน ต่อประชากร 10,000 คน (Poolsupasit et al., 2005) จะเห็นได้ว่าจำนวนผู้ป่วยออทิซึมเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากเกณฑ์การวินิจฉัยที่ครอบคลุมอาการของโรคมมากขึ้น มีความแม่นยำและรวดเร็ว รวมทั้งการให้ความรู้ที่แพร่หลายมากกว่าเดิม เกณฑ์ในการวินิจฉัยกลุ่มอาการออทิซึมมีหลายแบบที่เป็นมาตรฐาน เช่น การวินิจฉัยด้วยลักษณะทางคลินิกตามเกณฑ์ของ American Psychiatric Association Manual of Psychiatric Diseases, 4th edition (DSM-IV) แบบสัมภาษณ์ Autism Diagnostic Interview-Revises (ADI-R) หรือแบบสังเกตพฤติกรรม Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) เป็นต้น

ในปัจจุบันไม่ทราบสาเหตุของการเกิดออทิซึมที่ชัดเจน แต่ร้อยละ 10 ของผู้ป่วยออทิซึมมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของยีนเดี่ยว ความผิดปกติของโครโมโซม ความเสี่ยงระหว่างการตั้งครรภ์ หรือการคลอดของมารดา เช่น มารดาเป็นหัดเยอรมันในระยะตั้งครรภ์ มีการบาดเจ็บก่อนคลอด ระหว่างคลอด หรือหลังการคลอด ส่วนร้อยละ 90 ของผู้ป่วยออทิซึมยัง

ไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) โรคทางพันธุกรรมที่พบว่ามีอาการออทิซึมร่วม คือ กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (Fragile X syndrome) กลุ่มอาการเรตต์ (Rett syndrome) กลุ่มอาการทูเบอร์สเคอโรซิส (Tuberous sclerosis complex) สาเหตุที่สำคัญของการเกิดภาวะออทิซึม คือ พันธุกรรมร่วมกับสิ่งแวดล้อม (Multifactorial inheritance) จากการศึกษาพบปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยสำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึม เพราะพบออทิซึมในคู่แฝดร่วมไข่ (monozygotic twins) ทั้งสองคนมากถึงร้อยละ 60-91 แต่พบการเกิดภาวะออทิซึมในแฝดต่างไข่ (dizygotic twins) ทั้งสองคนเพียงร้อยละ 0-10 (Freitag et al., 2007) เนื่องจากร้อยละ 75 ของผู้ป่วยออทิซึมมีภาวะปัญญาอ่อน และร้อยละ 30 มีภาวะชักร่วมด้วย การกลายพันธุ์ของยีน ARX เป็นสาเหตุของภาวะปัญญาอ่อนร่วมกับอาการชัก จึงเชื่อว่าการกลายพันธุ์ของยีน ARX อาจสัมพันธ์กับการเกิดภาวะออทิซึม การศึกษาที่จึงสนใจตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน ARX ในผู้ป่วยออทิซึมก่อนทำการศึกษาในขั้นต่อไป

ยีน ARX

ยีน *Aristaless Related Homeobox (ARX)* เป็นโปรตีนในกลุ่ม paired class of homeoprotein ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1997 เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน (Activating or Repressing transcription) ในตอนต้นของการพัฒนาการของสมอง และพัฒนาการของระบบประสาทส่วนกลาง ยีน ARX พบบนแขนสั้นของโครโมโซมเอกซ์ในตำแหน่ง 22.1 (Xp22.1) มีขนาดประมาณ 12.5 กิโลเบส ประกอบด้วย 5 เอกซอน ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 562 ตำแหน่ง จากการศึกษาด้วยวิธี Northern blotting analysis พบโปรตีน ARX แสดงออกมากในสมองของเด็ก และลดลงในสมองผู้ใหญ่ นอกจากนี้พบการแสดงออกของโปรตีนข้างต้นในอวัยวะอื่นๆ เช่น หัวใจ กล้ามเนื้อ และตับ (Ohira et al., 2002) การศึกษาโดยหยุดการทำงานของยีน ARX (knockout) ในหนู พบหนูคลอดก่อนกำหนดและตายในเวลาถัดไป หนูมีขนาดสมองที่เล็กกว่าปกติ รวมทั้งความผิดปกติของ Olfactory bulbs และ testes นอกจากนี้พบกระบวนการสร้างสารสื่อประสาทแบบยับยั้งลดลงในตำแหน่ง ventricular zone ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำงานของกระบวนการสร้างสารสื่อประสาทแบบยับยั้งใน GABAergic interneuron (Kitamura et al., 2002)

จากการศึกษาพบการกลายพันธุ์แบบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอะลานีนจำนวน 8 ตัว ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 428 ถึง 451 (c.428_451 duplication; 24 bp) ในเอกซอน 2 ของยีน ARX เป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย (common mutation) ซึ่งพบมากถึงร้อยละ 60 ของการกลายพันธุ์ที่พบทั้งหมด และการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยนี้พบรวมกับการกลายพันธุ์แบบอื่นๆ รวมถึงร้อยละ 90 ในเอกซอน 2 ของยีน ARX การกลายพันธุ์ของยีน ARX พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะปัญญาอ่อน ผู้ป่วยโรค Partington syndrome และผู้ป่วย Infantile spasms ที่มีการถ่ายทอดในครอบครัว ซึ่งผู้ป่วยบางรายมีอาการออทิซึมร่วมด้วย (Stromme et al., 2002) (ดังแสดงในตารางที่ 1-3) ส่วนการกลายพันธุ์ที่พบในเอกซอนอื่นๆ บนยีน ARX มักพบในผู้ป่วยกลุ่มที่มีโครโมโซมสมองผิดปกติร่วมกับอวัยวะเพศกำกวม (Sherr, 2003) เป็นต้น

เนื่องจากผู้ป่วยออทิซึมส่วนใหญ่มีภาวะปัญญาอ่อนร่วมด้วย และการกลายพันธุ์ของยีน ARX เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะปัญญาอ่อน รวมทั้งพบผู้ป่วยบางรายที่มีการกลายพันธุ์ของยีน ARX มีอาการของออทิซึมร่วมด้วย จึงเชื่อว่าการกลายพันธุ์ของยีน ARX อาจสัมพันธ์กับการเกิดภาวะออทิซึม การกลายพันธุ์ของยีน ARX เป็นโรคพันธุกรรมยีนด้อยบนโครโมโซมเอกซ์ (X-Linked Recessive; XLR) กล่าวคือผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชายที่มีแม่ และผู้หญิงคนอื่นๆ ในครอบครัวเป็นพาหะของโรค การศึกษานี้จึงสนใจตรวจการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมก่อนทำการศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 1. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน *ARX* ที่พบในผู้ป่วยที่มีภาวะปัญญาอ่อน และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อยบนโครโมโซมเอกซ์ (คัดลอกจาก Gecz J et al., 2006)

เอกซอน	การผ่าเหล่า	ลักษณะทางคลินิก	ลักษณะของการผ่าเหล่า	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	เอกสารอ้างอิง
1	c.98 T>C	NS-XLMR	Missense	1	Gecz et al., 2006
	c.112 C>T	NS-XLMR	Missense	1	Gecz et al., 2006
2	c.304 ins (GCG)3	NS-XLMR	Insertion	1	Gecz et al., 2006
	c.304 ins (GCG)2	NS-XLMR	Insertion	1	Gecz et al., 2006
	c.304 ins (GCG)1	NS-XLMR	Insertion	2	Gecz et al., 2006
	c.333_334 ins(GCG)7	XLMR	Duplication	6	Gecz et al., 2006
	c.428_451 dup	NS-XLMR	Duplication	20	Gecz et al., 2006, Stromme et al.,2002
	c.428_451 dup	XLMR	Duplication	1	De Souza Gestinari-Duarte et al., 2006
	c.428_451 dup	XLMR	Duplication	18	Szczaluba et al., 2006
	c.428_451 dup	NS-XLMR	Duplication	2	Rujirabanjerd et al., 2007
	c.429_452 del	NS-XLMR	Deletion	1	Gecz et al., 2006
	c.431_454 del	NS-XLMR	Deletion	1	Gecz et al., 2006

ตัวย่อแสดง NS-XLMR; Non-Syndromic X-Linked Mental Retardation, XLMR; X-Linked Mental Retardation

ตารางที่ 1. (ต่อ)

เอกซอน	การผ่าเหล่า	ลักษณะทาง คลินิก	ลักษณะของ การผ่าเหล่า	จำนวน ผู้ป่วย (ราย)	เอกสารอ้างอิง
2	c.488 A>G	NS-XLMR	Missense	1	Gecz et al., 2006
	c.448_456 del	NS-XLMR	Deletion	1	Gecz et al., 2006
	c.856 G>A	NS-XLMR	Missense	1	Gecz et al., 2006
4	c.1074-3T>C	XLMR	variant	1	De Souza Gestinari-Duarte et al., 2006
	c.1347C>T, (p.G449G)	XLMR	silent	2	De Souza Gestinari-Duarte et al., 2006
รวม	-	-	-	61	-

ตัวย่อแสดง NS-XLMR; Non-Syndromic X-Linked Mental Retardation, XLMR; X-Linked Mental Retardation

ตารางที่ 2. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน **ARX** ที่พบในผู้ป่วย **Partington syndrome**

(คัดลอกจาก Gecz J et al., 2006)

เอกซอน	การผ่าเหล่า	ลักษณะทาง คลินิก	ลักษณะของ การผ่าเหล่า	จำนวน ผู้ป่วย (ราย)	เอกสารอ้างอิง
2	c.428_451 dup	PRTS	Duplication	2	Gecz et al., 2006

ตัวย่อแสดง PRTS; Partington syndrome

ตารางที่ 3. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน ARX ที่พบในผู้ป่วยโรคลมชักแบบ West syndrome/Infantile spasms X-linked syndrome (WS/ISSX)

(คัดลอกจาก Gecz J et al., 2006)

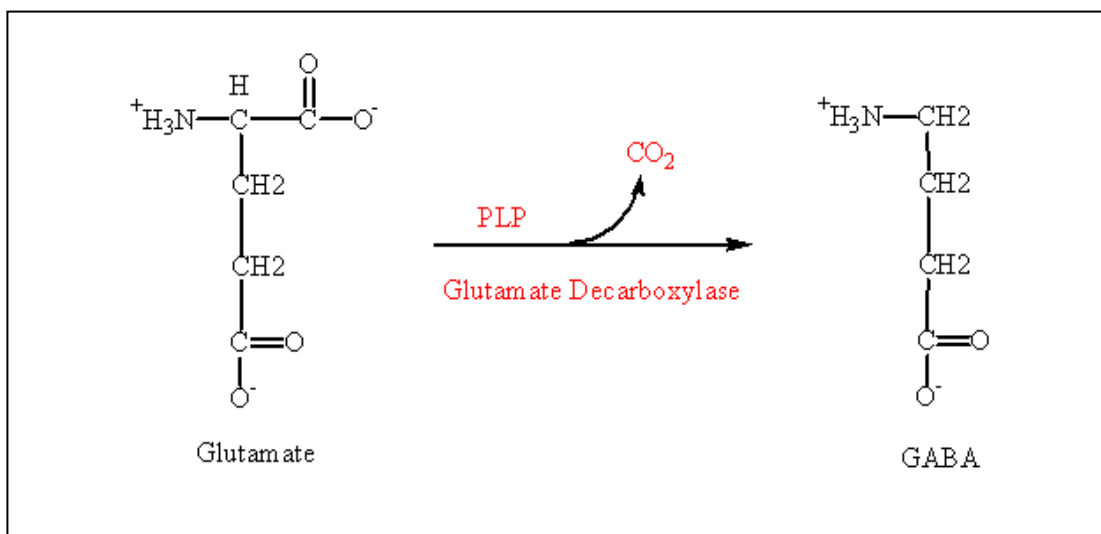
เอกซอน	การผ่าเหล่า	ลักษณะทาง คลินิก	ลักษณะของ การผ่าเหล่า	จำนวน ผู้ป่วย (ราย)	เอกสารอ้างอิง
2	c.298_330 dup(GCG)9	Infantile epileptic	Duplication	2	Kato et al., 2007
	c.304 ins (GCG)7	ISSX	Insertion	3	Gecz et al., 2006
	c.333_334 ins(GCG)7	ISSX	Insertion	6	Guerrini et al., 2007
	c.335_336 ins(GCG)7	ISSX	Insertion	1	Wallerstein et al., 2008
	c.428_451 dup	ISSX	Duplication	2	Gecz et al., 2006
	c.447G>C	ISSX	silent	2	Wallerstein et al., 2008
4	IVS 4-816_EX5701 del	ISSX	Deletion	1	Gecz et al., 2006
	c.1465 delG (Fs491X)	ISSX	Nonsense	1	Wallerstein et al., 2008
รวม	-	-	-	18	-

ตัวย่อแสดง ISSX; Infantile Spasms X-linked syndrome

GABA receptors (Gamma-Amino Butyric Acid receptor)

การศึกษาส่วนหนึ่งพบการทำงานที่ผิดปกติของระบบสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA neurotransmitter system ในผู้ป่วยออทิซึม คือ มีปริมาณ GABA (Gamma-Amino Butyric acid) ในพลาสมาและสมองสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Dhossche et al., 2002; Hussman, 2001) และพบการทำงานของโปรตีน GABA type A receptors ในสมองของผู้ป่วยออทิซึมลดลง (Fatemi et al., 2009; Blatt et al., 2001) ส่งผลให้สมองถูกกระตุ้นมากเกินไปจนไม่สามารถควบคุมกลไกการทำงานตามปกติได้ รวมทั้งพบยีน *GABA type A receptors* บางตำแหน่งเป็น candidate gene ของออทิซึม เช่นยีน *GABA type A receptors beta 3 (GABRB3)* และยีน *GABA type A receptors alpha 4 (GABRA4)* เป็นต้น

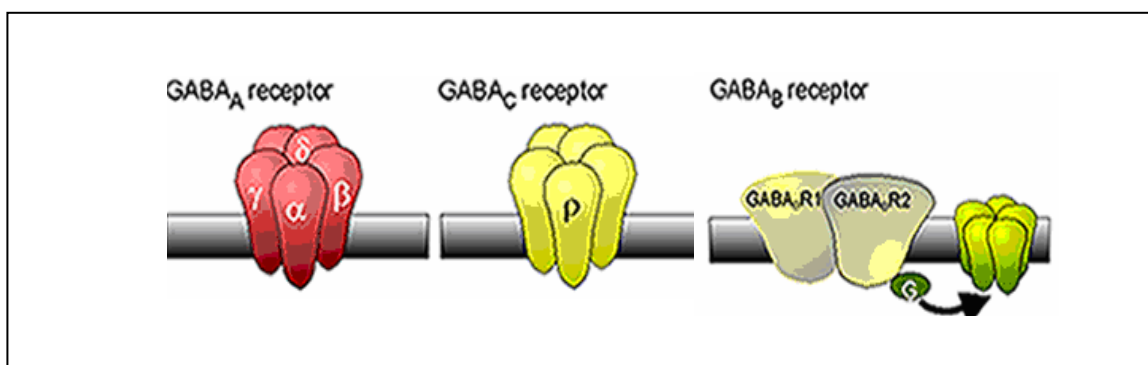
Gamma-Amino Butyric Acid receptor (GABA receptors) เป็นโปรตีน receptor ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทของ postsynaptic ทำหน้าที่เป็น Ion-channel-linked receptor หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า transmitter-gate ion channel โดยโปรตีน receptor ประเภทนี้มีกลไกการทำงานที่ไม่ซับซ้อน คือ ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายสารสื่อประสาทให้ผ่านเข้าออก synapses อย่างรวดเร็ว ในกรณีของเซลล์ในระบบประสาท โปรตีน receptor ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณเคมีในรูปสัญญาณสื่อกระแสประสาท (neurotransmitter) ให้เคลื่อนไปตามเอกซอน (exon) ก่อนที่สัญญาณนั้นจะถูกเปลี่ยนให้มาอยู่ในรูปสัญญาณทางไฟฟ้า ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย เมื่อสารสื่อประสาทจับกับโปรตีน receptor เกิดการกระตุ้นให้มีการปิดและเปิดของช่องสำหรับไอออนอิสระแต่ละชนิด เช่น Na^+ , K^+ , Ca^{2+} หรือ Cl^- ให้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว GABA receptors ทำงานร่วมกับสารสื่อประสาทแบบยับยั้งที่พบในสมองและจอตา เรียกว่า GABA (Gamma-Amino Butyric Acid) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่หลั่งออกมาจากปลายประสาทด้าน presynaptic inhibition และรวมตัวกันอย่างจำเพาะกับสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA ที่สร้างจากกระบวนการ decarboxylation ของกลูตาเมต โดยเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) (ดังแสดงในรูปที่ 1) ซึ่งพบอยู่ในปลายประสาทของสมอง



รูปที่ 1. แสดงการสังเคราะห์สารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA

(www.rpi.edu/~bellos/new_page_2.htm)

GABA receptors แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ GABA type A receptors (GABA_A) GABA type B receptors (GABA_B) และ GABA type C receptors (GABA_C) ดังแสดงในรูปที่ 2

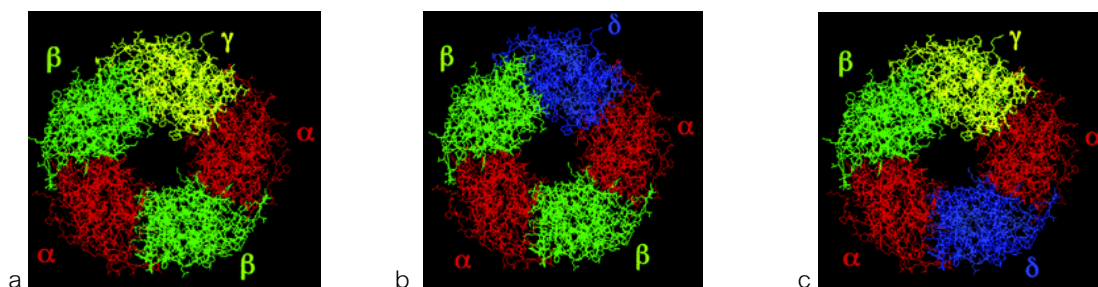


รูปที่ 2. แสดงลักษณะของ GABA_A GABA_C และ GABA_B receptors

(http://www.biocenter.helsinki.fi/biophysiol/GABA/GABAR_structure.htm)

Gamma-Amino Butyric Acid type A receptor (GABA_A receptor) เป็น GABA receptor ที่พบมากที่สุด ในสมอง GABA_A receptor เป็น ionotropic receptor ซึ่งมีลักษณะแบบ transmembrane heteroligomeric protein (ดังแสดงในรูปที่ 2) ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของคลอไรด์ไอออนเข้าสู่เซลล์ประสาท (chloride ion channel) กระบวนการสังเคราะห์และรวมตัวกันเป็น GABA_A receptor เกิดขึ้นในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ส่งต่อไปยังกอลจิคอมเพลกซ์ (golgi apparatus) และขนส่งไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท

ตัวรับ กระบวนการนี้ต้องอาศัยโปรตีนและกระบวนการต่างๆ ที่ซับซ้อน GABA_A receptor ทำงานร่วมกับสารสื่อประสาทแบบยับยั้ง GABA (inhibitory neurotransmitter) ที่เข้าจับในตำแหน่งรอยเชื่อมต่อระหว่างหน่วยย่อยของ α และ β (Jacop et al., 2008) เมื่อเกิดการรวมตัวกันส่งผลกระตุ้นให้ receptor เปิดออก คลอไรด์ไอออนไหลเข้าสู่ postsynaptic ในปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดกระบวนการไฮเปอร์โพลาไรเซชัน (hyperpolarization) เกิดการยับยั้งการทำงานของสารสื่อประสาทอย่างรวดเร็ว GABA_A receptor มีตำแหน่งจำเพาะต่อการทำงานของสารเคมีและยาในกลุ่ม benzodiazepines, barbiturates, anesthetics และ alcohols (Ma DQ and DeLong R, 2005) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการระงับประสาท ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว ระงับอาการชัก และทำให้หลับสบาย จากการศึกษาระดับโมเลกุลพบ GABA_A receptor เป็น heteropentameric complex แบ่งเป็น 8 กลุ่ม คือ แอลฟา (α), บีตา (β), แกมมา (γ), เดลตา (δ), เอปไซลอน (ϵ), เซตา (θ), พาย (π) และ โร (ρ) ที่มีทั้งหมด 19 หน่วยย่อย (ดังแสดงในตารางที่ 4) คือ $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π และ $\rho 1-3$ แม้ว่า GABA receptor มีหลายหน่วยย่อย แต่ส่วนประกอบหลักของ GABA_A receptor ที่พบบ่อย คือ 2 หน่วยย่อยของ α , 2 หน่วยย่อยของ β และ 1 หน่วยย่อยของ γ ส่วนรูปแบบอื่นที่พบบรองลงมา คือ $\alpha\beta\gamma$, $\alpha\beta\epsilon$, $\alpha\beta\pi$ หรือ $\alpha\beta\rho$ (Steiger JL. And Russek SJ., 2004) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3. แสดงรูปแบบ (isoforms) ของ GABA_A receptor แบบต่าง ๆ ที่พบในสมองของสัตว์ (<http://www.biochemsoctrans.org/bst/034/0868/bst0340868f02.htm?resolution=HIGH>)

โดยยีนที่สร้างโปรตีนเหล่านี้อยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกันแสดงในตารางที่ 4 (Glatt et al., 1997) GABA_A receptor ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่แตกต่างกัน โดยแต่ละหน่วยย่อยมีหน้าที่แตกต่างกันและสร้างขึ้นในช่วงอายุการเจริญเติบโตที่ต่างกัน (Laurie et al., 1992)

ตารางที่ 4. แสดงยีนที่สร้างโปรตีน GABA_A receptor บนโครโมโซมในตำแหน่งต่าง ๆ

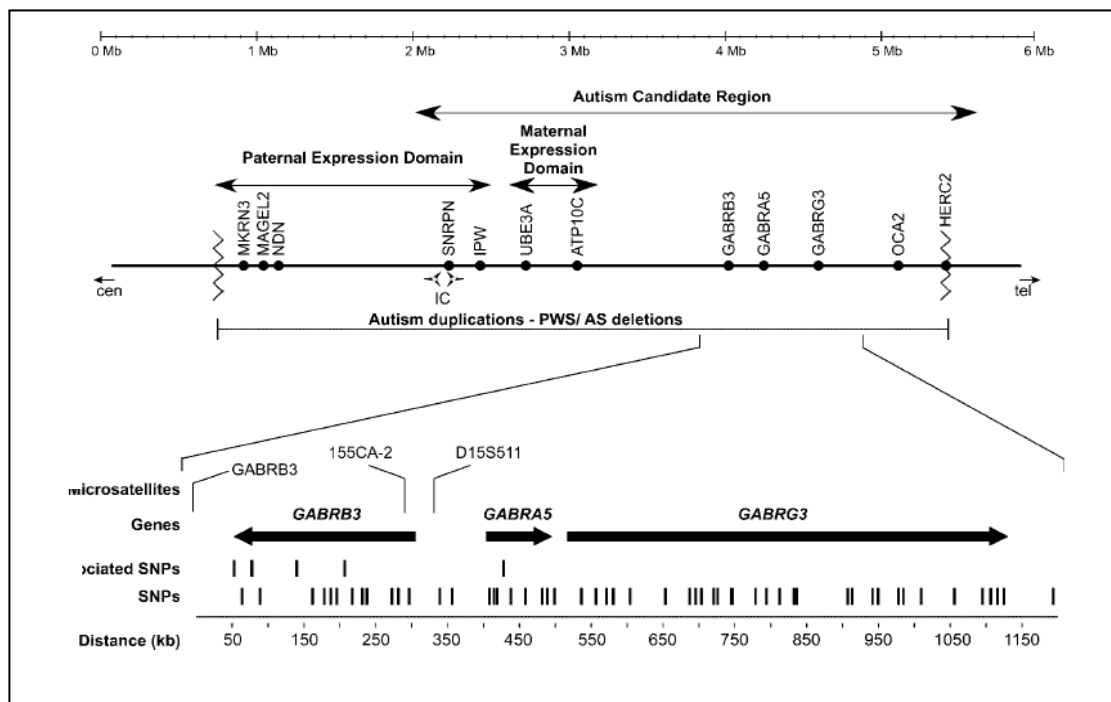
โครโมโซม	ตำแหน่ง	หน่วยย่อยของยีน GABA receptor
โครโมโซม 4	p14-q12	$\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$ และ $\gamma 1$
โครโมโซม 5	q31.1-q33.2	$\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 1$ และ $\gamma 2$
โครโมโซม 6	q14-q12	$\rho 1$ และ $\rho 2$
โครโมโซม 15	q11-q13	$\alpha 5$, $\beta 3$ และ $\gamma 3$
โครโมโซม X	q28	$\alpha 3$, ϵ และ δ

Gamma-Amino Butyric Acid type B receptor (GABA_B receptor) เป็น G protein-coupled receptors (GPCRs) หรือ seven transmembrane domain receptors มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย polypeptide เพียงเส้นเดียวที่ขดตัวขึ้นลงในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทใน postsynaptic เป็นจำนวน 7 ครั้ง ตัว GABA_B receptor ไม่ได้เป็นทางผ่านของไอออน แต่มีการส่งสัญญาณผ่าน second messenger (G-protein) เพื่อไปควบคุมการปิดและเปิดช่องไอออนตัวอื่น GABA_B receptor ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ GBR1 และ GBR2 พบได้ทั้งในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทตัวส่ง และเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทตัวรับ โดยทำหน้าที่เป็นทางผ่านของ potassium ion ในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทตัวรับ และเป็นทางผ่านของ calcium ion ในเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทตัวส่ง เนื่องจาก GABA_B receptor มีกลไกการทำงานที่ซับซ้อน จึงทำงานช้ากว่า GABA_A receptor การศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน GABA_B receptor สัมพันธ์กับผู้ป่วยที่มีอาการชักโดยไม่ทราบสาเหตุ (Idiopathic generalized epilepsy) (Simeone et al., 2003; Sander et al., 1999)

Gamma-Amino Butyric Acid type C receptor (GABA_C receptor) เป็นโปรตีน receptor ที่ถูกค้นพบขึ้นใหม่ ทำหน้าที่เป็น chloride channels เช่นเดียวกับ GABA_A receptor แต่กลไกการทำงานของ receptor ชนิดนี้ มีกลไกการทำงานช้าเช่นเดียวกับ GABA_B receptor พบ GABA_C receptor ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ $\rho 1-3$ แสดงออกมากใน retinal neurons และบางตำแหน่งในสมอง แต่พบ GABA_C receptor มีบทบาทสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณในเยื่อชั้นในของลูกตา (Qian and Dowling, 1994) จึงไม่น่าจะสัมพันธ์ต่อการเกิดออกซิซึม

ยีน *GABA type A receptor (GABRB3 GABRA5 และ GABRG3)* บนโครโมโซม 15

จากการศึกษาโดยวิธี Cytogenetics พบการกลายพันธุ์แบบการเพิ่มขึ้นส่วนของยีนเป็นสองเท่าบนโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q11-13 (Duplication) ที่ถูกถ่ายทอดมาจากแม่ และพบการหักของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q13.3 แล้วกลับมาเชื่อมต่อกันบนโครโมโซม 15 (Isodicentric chromosome 15) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 1-5 ในผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (Freitag CM, 2007; Koochek et al., 2006; Battaglia, 2005; Lord et al., 2000; Bass et al., 1999) นอกจากนี้พบการขาดหายของชิ้นส่วนยีนบนโครโมโซม 15 ตำแหน่ง q11-13 ส่งผลให้กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเปลี่ยนไป ซึ่งอยู่กับว่ายีนที่ขาดหายไปนั้นได้รับมาจากบิดาหรือมารดาเป็นสาเหตุสำคัญของโรค Prader-Willi Syndrome (MIM 176270) และโรค Angleman Syndrome (MIM 105830) ซึ่งพบผู้ป่วยในกลุ่มดังกล่าวข้างต้นมีอาการออทิซึมร่วมด้วย (Curran et al., 2006; McCauley et al., 2004) ยีน *GABA receptor* บนโครโมโซม 15q11-13 ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ ยีน *GABA type A receptor alpha 5 (GABRA5)*, ยีน *GABA type A receptor gamma 3 (GABRG3)* และยีน *GABA type A receptor beta 3 (GABRB3)* จากการศึกษาจีโนมไวด์สแกน (Genome wide scans) (Philippe et al., 1999) การศึกษาความสัมพันธ์ (Association analysis) และการถ่ายทอดในครอบครัว (linkage analysis) โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และสนิปส์ (ดังแสดงในรูปที่ 4) สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* บนโครโมโซม 15 กับภาวะออทิซึม



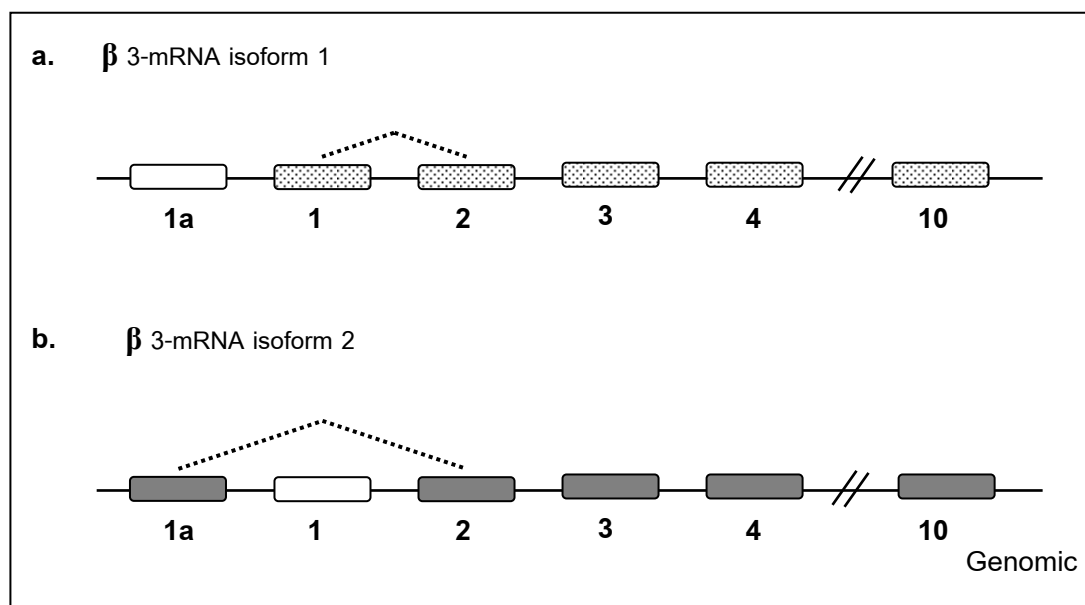
รูปที่ 4. แสดงตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ และสโตนิปที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABA receptor (GABRB3, GABRG3, GABRA5)* บนโครโมโซม 15 กับภาวะออทิซึม (คัดลอกจาก McCauley et al., 2004)

ยีน *GABA type A receptor alpha 5 (GABRA5)* อยู่บนแขนยาวของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q11.2-q12 ประกอบด้วย 11 เอกซอน มีความยาวประมาณ 86 กิโลเบส จากการศึกษพบเอกซอน 1 ของยีน *GABRA5* ประกอบด้วย 3 ส่วนย่อย คือ เอกซอน 1a, 1b, 1c โดยเอกซอน 2 ของยีนนี้เป็นบริเวณที่ไม่มีรหัสการสร้างโปรตีน (non-coding DNA) และมีตำแหน่งที่เริ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเอกซอน 3 (Glatt et al., 1997) พบการแสดงออกของยีน *GABRA5* มากใน Hippocampus แต่ไม่พบใน Cerebellum ของเด็กและผู้ใหญ่ (Kim et al., 2006; Laurie et al., 1992) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABA type A receptor (GABRB3, GABRA5 และ GABRG3)* กับภาวะออทิซึม พบเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* และ *GABRA5* กับภาวะออทิซึม (McCauley et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างยีนตำแหน่งนี้กับโรคทางระบบประสาทอื่นๆ ด้วยเช่นกัน เช่น โรค schizophrenia และ bipolar (Otani et al., 2005; Papadimitriou et al., 2001)

ยีน *GABA type A receptor gamma 3 (GABRG3)* ประกอบด้วย 5 เอกซอน ที่มีความยาวประมาณ 52.33 กิโลเบส อยู่บนแขนยาวของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q11-q13 เช่นเดียวกับยีน *GABRB3* และ *GABRA5* โดยยีน *GABRG3* ห่างจากยีน *GABRA5* ประมาณ 35 กิโลเบส และห่างจากยีน *GABRB3* ประมาณ 100 กิโลเบส จากการศึกษพบการแสดงออก

ของยีน *GABRG3* เพียงเล็กน้อยใน Hippocampus ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ (Laurie et al., 1992) การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GABA receptor (GABRB3, GABRA5 และ GABRG3)* บนโครโมโซม 15 โดยใช้สไนป์ส 3 ตำแหน่งบนยีน *GABRB3* สไนป์ส 4 ตำแหน่งบนยีน *GABRA5* และสไนป์ส 9 ตำแหน่งบนยีน *GABRG3* กับผู้ป่วยออทิซึม พบเฉพาะความสัมพันธ์ของยีน *GABRG3* กับผู้ป่วยออทิซึม (Menold et al., 2001) นอกจากนี้พบความสัมพันธ์ของยีนตำแหน่งนี้กับโรคภาวะติดแอลกอฮอล์ (alcohol dependence) (Dick et al., 2004)

ยีน *GABA type A receptor beta 3 (GABRB3)* อยู่บนแขนยาวของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q11.2-q12 ประกอบด้วย 9 เอกซอน มีความยาวประมาณ 250 กิโลเบส จากการศึกษาพบโปรตีน *GABRB3* มี 2 รูปแบบ (isoform) เนื่องจากเอกซอน 1 ของยีน *GABRB3* มี 2 ส่วน ประกอบด้วย เอกซอน 1a และเอกซอน 1 (ดังแสดงในรูปที่ 5) การแสดงออกของโปรตีน *GABRB3* ทั้งสองรูปแบบพบมากในสมองของมนุษย์ แต่ β 3-mRNA isoform 2 ซึ่งประกอบด้วยเอกซอน 1a พบมากในสมองของทารก และพบได้น้อยในสมองส่วน hippocampus ของผู้ใหญ่ ในขณะที่ β 3-mRNA isoform 1 พบกระจายทั่วไปในสมอง แสดงให้เห็นว่า β 3-mRNA isoform 2 มีความสำคัญต่อการพัฒนาการของสมองในวัยเด็ก จากการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *GABRB3* ในสมองลดลง ทำให้จำนวนของ $GABA_A$ receptor ใน thalamic reticular neurons ลดลงด้วย แสดงว่า β 3 subunit มีความสำคัญต่อการสร้าง $GABA_A$ receptors ในช่วงต้นของการพัฒนาการของสมอง (Urak et al., 2006)



รูปที่ 5. แสดง β 3-mRNA isoform 1 และ 2 ของยีน *GABRB3* โดยกล่องสี่ดำ คือ ตำแหน่งเอกซอน (ดัดแปลงจาก Urak et al., 2006)

จากการศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้สปีดโครบคลุ่มทั่วทั้งยีน *GABA receptor* (*GABRB3*, *GABRG3* และ *GABRA5*) กับภาวะออทิซึม พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึม (McCauley et al., 2004) เนื่องจากยีน *GABRB3* เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของสมองในตอนต้นของการเจริญเติบโต การศึกษาส่วนมากเลือกศึกษาและพบความสัมพันธ์ระหว่างยีนตำแหน่งนี้กับภาวะออทิซึม (Curran et al., 2006; McCauley et al., 2004) นอกจากนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างยีนตำแหน่งนี้กับภาวะออทิซึมในชาวเกาหลี (Kim et al., 2006)

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึม

จากการศึกษายืนยันความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers) จำนวน 9 ตำแหน่ง จากบริเวณกึ่งกลางถึงปลายของโครโมโซม 15 ในตำแหน่ง q11-13 ครอบคลุมตำแหน่งของยีน *GABRB3*, *GABRA5* และ *GABRG3* (ดังตารางที่ 5) กับผู้ป่วยผู้ป่วยออทิซึม โดยใช้วิธี multiallelic transmission-disequilibrium test (MTDT) ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ พบไมโครแซทเทลไลท์ 155CA-2 marker บนตำแหน่งยีน *GABRB3* สัมพันธ์กับภาวะออทิซึม (Buxbaum et al., 2002; Cook et al., 1998)

MTDT เป็นรูปแบบการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งบนโครโมโซมโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่คาดว่าจะมีการถ่ายทอดไปกับยีนที่ก่อโรคในครอบครัวออทิซึม วิธีการนี้เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธี Transmission disequilibrium test (TDT) เนื่องจากวิธี TDT ใช้ศึกษาความแตกต่างของเครื่องหมายทางพันธุกรรมแค่ 2 แบบ แต่วิธี MTDT ใช้ศึกษาความแตกต่างของเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้มากกว่า 2 แบบขึ้นไป

ตารางที่ 5. แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับผู้ป่วยออทิซึม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และวิธี MTDT ในการศึกษา (คัดลอกจาก Cook et al., 1998)

ไมโครแซทเทลไลท์	ระยะห่างของไมโครแซทเทลไลท์ (Kb)	MTDT (χ^2)	df	P-value	เอกสารอ้างอิง
D15S128	300	6.72	8	0.5667	Christian et al. (in press), Sutcliffe et al. (1997)
D15S1506	100	4.52	8	0.8074	Sutcliffe et al. (1997)
<i>UBE3A</i> Intron 1	50	0.16	1	0.6892	Sutcliffe et al. (1997)
D15S122	20	12.10	8	0.1466	Sutcliffe et al. (1997)
D15S10	0.2	3.31	3	0.3458	Cook et al. (1994)
<i>UBE3A</i> OP2 3A/3B 1	1,000	0.05	1	0.8231	Sutcliffe et al. (1997)
D15S97	150	8.59	9	0.4763	Glatt et al. (1997)
<i>GABRB3</i> 155CA-2	800	28.63	10	0.0014	Glatt et al. (1997), Robinson and Lalande (1995)
D15S156		3.23	4	0.5193	Cook et al. (1994)

* หมายถึง df = degree of freedom

แต่บางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 155CA-2 กับภาวะออทิซึม (Curran et al., 2005; Martin et al., 2000; Maestrini et al., 1999; Salmon et al., 1999) อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาหรือวิธีการที่ใช้ในการคำนวณหาความสัมพันธ์แตกต่างกัน นอกจากนี้ออทิซึมเป็นภาวะที่มีความซับซ้อนอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนหลายตำแหน่ง (locus heterogeneity) ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนในตำแหน่งเดียวกันในผู้ป่วยออทิซึมคนละกลุ่ม อาจพบความสัมพันธ์ในกลุ่มตัวอย่างหนึ่งแต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในอีกกลุ่มตัวอย่างหนึ่ง แม้ Buxbaum และคณะ ทำการศึกษาโดยใช้วิธี MTDT ในการศึกษาความสัมพันธ์ใหม่ในทุกการศึกษา แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง 155CA-2 และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมเช่นเดิม (ดังแสดงในตารางที่ 6) แสดงว่ากลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาอาจส่งผลต่อความสัมพันธ์ต่อการเกิดภาวะออทิซึมได้ (Buxbaum et al., 2002) จึงมีการศึกษาโดย

การแบ่งผู้ป่วยตามลักษณะอาการออกเป็นกลุ่มย่อย พบว่าช่วยเพิ่มความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับออทิซึมมากขึ้น และพบการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับครอบครัวออทิซึมที่มีลูกเป็นโรคตั้งแต่ 2 คนขึ้นไป มากกว่าในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่มีลูกเป็นโรคเพียงคนเดียว (Buxbaum et al. 2002; Ma et al., 2005; Shao et al., 2003)

ตารางที่ 6. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ใหม่ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 155CA-2 บนยีน *GABRB3* กับออทิซึม โดยใช้วิธี MTDT (คัดลอกจาก Buxbaum et al., 2002)

การศึกษา	จำนวนครอบครัว (Multiplex/simplex)	MTDT	df	P-value
Cook et al, 1998	132 (6/126)	28.63	10	0.0014
Maestrini et al, 1999	94 (86/8)	17.21	10	0.070
Maestrini et al, 1999	94 (86/8)	13.79	9	0.13
Salmon et al, 1999	139 (139/0)	17.57	11	0.092
Buxbaum et al, 2002	80	27.67	9	0.0011

นอกจากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น มีการศึกษาโดยใช้สไนป์ส (Single nucleotide polymorphisms; SNP) บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึม เนื่องจากสไนป์ส (SNPs) เป็นความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคน ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวที่ก่อให้เกิดความแตกต่างกันทางกายภาพ โดยทั่วไปพบสไนป์สในทุกๆ 300–1,000 เบสในจีโนมของมนุษย์ ซึ่งพบประมาณ 3 พันล้านเบส จากการศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้สไนป์ส rs2081648, rs1426217, rs754185, hCV8865209 และ rs2059574 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึม ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์สเหล่านี้กับผู้ป่วยออทิซึม แต่เมื่อเลือกศึกษาเฉพาะในครอบครัวที่ลักษณะทางคลินิกคล้ายคลึงกัน (Ashley-Koch et al., 2006; Ma et al., 2005) ในปี ค.ศ. 2004 McCauley และคณะ ศึกษาสไนป์สทั้งหมด 59 ตำแหน่งกระจายครอบคลุมยีน *GABAB3*, *GABRA5* และ *GARG3* บนโครโมโซม 15 ที่มีความยาวประมาณ 1 เมกกะเบส ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่มีลูกเป็นโรคตั้งแต่ 2 คนขึ้นไป (multiplex families) จำนวน 123 ครอบครัว โดยใช้วิธี Transmission disequilibrium test (TDT) พบสไนป์ส 5 ตำแหน่ง กระจายอยู่บนอินทรอน 6 ถึงบริเวณปลายของยีน *GABRB3* (Intergenic) และสไนป์ส 1 ตำแหน่งบนอินทรอน 6 ของยีน *GABRA5* สัมพันธ์กับภาวะออทิซึม และเมื่อศึกษาสไนป์สแฮพโลไทป์บนตำแหน่งข้างต้น (สไนป์สหลายตำแหน่งบนยีนเดียวกัน) พบแฮพโลไทป์ 2 แบบบนยีน *GABRB3* และยีน *GABRA5* สัมพันธ์กับภาวะออทิซึม (McCauley et al., 2004) นอกจากนี้

มีการศึกษาสไนป์สแฮพโพลไทป์บนตำแหน่ง rs10519563, rs8037653, rs4906683, rs1897365 และ rs768899 ของยีน *GABRB3* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 123 ครอบครัว พบสไนป์สแฮพโพลไทป์แบบ G-T-G-T-C ของสไนป์สแต่ละตำแหน่งข้างต้น สัมพันธ์กับภาวะออทิซึม ดังแสดงในตารางที่ 7 (Curran et al., 2006)

ตารางที่ 7. แสดงตำแหน่งสไนป์สแฮพโพลไทป์ที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์บนยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึม (คัดลอกจาก Curran et al., 2006)

	สไนป์ส 1	สไนป์ส 2	สไนป์ส 3	สไนป์ส 4	สไนป์ส 5	P-value
แฮพโพลไทป์ 1	C	T	A	T	T	0.21
แฮพโพลไทป์ 2	C	T	A	C	C	0.0348
แฮพโพลไทป์ 3	C	T	G	T	C	0.764
แฮพโพลไทป์ 4	G	T	G	T	C	0.000019

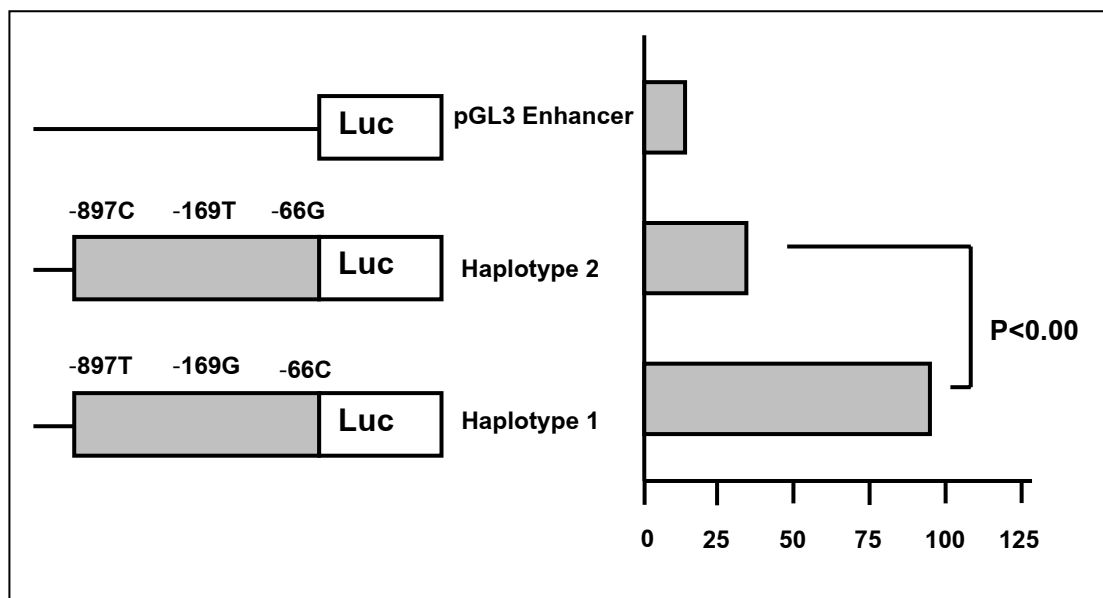
สไนป์ส 1 คือ rs10519563 (Intron 4), สไนป์ส 2 คือ rs8037653 (Intron 4), สไนป์ส 3 คือ rs4906683 (Intron 4), สไนป์ส 4 คือ rs1897356 (Intron 3), สไนป์ส 5 คือ rs768899 (Intron 3)

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบถึงบล็อก (ตำแหน่งของสไนป์สแฮพโพลไทป์บนยีนที่คาดว่ามีการถ่ายทอดไปด้วยกันในคนที่ เป็นโรค) บนยีน *GABRB3* ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์สบนยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึมได้

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึมในประชากรเอเชียมีน้อย แต่พบความสัมพันธ์ของสไนป์ส rs2081648 ในอินทรอน 8 ของยีน *GABRB3* กับครอบครัวชาวเกาหลี (Trios families) จำนวน 104 ครอบครัว และพบสไนป์สแฮพโพลไทป์ที่กระจายอยู่ในอินทรอน 6 ถึงอินทรอน 8 ของยีน *GABRB3* สัมพันธ์กับครอบครัวผู้ป่วยที่มีภาวะออทิซึมด้วย จึงยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึมมากขึ้น (Kim et al., 2006) เนื่องจากพบความสัมพันธ์ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 155CA-2 ในอินทรอน 3 บนยีน *GABRB3* กับภาวะออทิซึม จึงมีการศึกษาสไนป์สรอบๆ ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์นี้ในผู้ป่วยออทิซึมชาวญี่ปุ่น แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์สตำแหน่งข้างต้นกับภาวะออทิซึม (Tochigi et al., 2007)

นอกจากนี้มีการศึกษาสไนป์สบนตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยโรคลมชักโดยไม่ทราบสาเหตุ Childhood absence epilepsy (CAE) พบสไนป์สแฮพโพลไทป์บางแบบ (ดังแสดงในรูปที่ 6) มีผลลดกลไกการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ในเซลล์

(Urak et al., 2006) เนื่องจากหนึ่งในสามของผู้ป่วยออทิซึมมีภาวะชักร่วมด้วย จึงเลือกศึกษา สนิปส์แฮพลotype ที่บ่งกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม



*หมายเหตุ ตำแหน่ง -897 คือสนิปส์ rs4906902, ตำแหน่ง -169 คือสนิปส์ rs4906901 และ ตำแหน่ง -66 คือสนิปส์ rs20317

รูปที่ 6. แสดงการศึกษาสนิปส์บนตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยโรค **Childhood absence epilepsy (CAE)** จากการศึกษาการทำงานของยีน *GABRB3* ที่มีสนิปส์ แฮพลotype ที่บนตำแหน่งโปรโมเตอร์ พบแฮพลotype แบบที่ 2 มีผลลดกลไกการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ในเซลล์ เมื่อเทียบกับแฮพลotype แบบที่ 1 (คัดลอกจาก Urak et al., 2006)

ตารางที่ 8. แสดงตำแหน่งสไนป์สที่ใช้ในการศึกษาบนยีน **GABRB3**

บล็อก	สไนป์ส	ตำแหน่ง ¹	ระยะห่างจากสไนป์สตำแหน่งแรก (bp)	เอกสารอ้างอิง
1	rs4906902	โปรโมเตอร์ (-897)	0	Urak et al., 2006
	rs4906901	โปรโมเตอร์ (-169)	728	Urak et al., 2006
	rs20317	โปรโมเตอร์ (-66)	831	Urak et al., 2006; Curran et al., 2006
2	rs3212333	อินทรอน 3	5491	Curran et al., 2006
	rs1367959	อินทรอน 3	101,700	Curran et al., 2006
	rs4542636	อินทรอน 3	150,000	McCauley et al., 2004 <i>P</i> = 0.03 (TDT)
3	rs4906683	อินทรอน 4	164,000	Curran et al., 2006 <i>P</i> = 0.01 (TDT)
4	rs2081648	อินทรอน 8	220,000	Ashley-Koch et al., 2006; Ma et al, 2005; McCauley et al., 2004; Kim et al., 2006 <i>P</i> = 0.027 (TDT)

¹อ้างอิงตาม GenBank accession No. NT_026446

ตารางที่ 9. แสดงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABGB3*, *GABRA5* และ *GABRG3* บนโครโมโซม 15 กับภาวะออทิซึม (Freitag, 2007)

Gene/polymorphism	จำนวนครอบครัว	ลักษณะการศึกษา	P-value	เอกสารอ้างอิง
<i>GABRB3</i> / 2 ms Other / 5 ms	13 parent-child pairs 125 trios	Family based association	(155CA-2 in <i>GABRB3</i>) $P = 0.0014$	Cook et al., 1998
<i>GABRB3</i> / 7 ms including 155CA-2	86 multiplex 8 trios	Family based association	Non Significance	Maestrini et al., 1999
<i>GABRB3</i> / 8 ms (including 155CA-2)	139 multiplex	Family based association	Non Significance	Salmon et al., 1999
<i>GABRB3</i> / 2 ms <i>GABRA5</i> / 1 ms <i>GABRG3</i> / 2 ms	63 multiplex	Linkage analysis	(D15S217) $P = 0.03$	Bass et al., 2000
<i>GABRB3</i> / 3 ms (including 155CA-2) <i>GABRA5</i> / 1 ms	54 trios 13 parent-child pairs 36 multiplex	Family based association	$P = 0.03$	Martin et al., 2000
<i>GABRB3</i> / 3 SNPs <i>GABRA5</i> / 4 SNPs <i>GABRG3</i> / 9 SNPs	91 multiplex 135 trios	Family based association	(539C>T) $P = 0.02$ (687T>C) $P = 0.03$ for <i>GABRG3</i>	Menold et al., 2001
<i>GABRB3</i> / 5 ms	59 multiplex 21 trios	Family based association	(155CA-2) $P = 0.002$	Buxbaum et al., 2002

*หมายเหตุ ms = microsatellites

ตารางที่ 9. (ต่อ)

Gene/polymorphism	จำนวน ครอบครัว	ลักษณะการศึกษา	P-value	เอกสารอ้างอิง
GABRB3 / 17 SNPs GABRA5 / 8 SNPs GABRG3 / 9 SNPs	123 multiplex	Family based association	$P < 0.05$ for GABRB3 hCV2911914 rs1432007 hCV2901140 rs4542636 rs878960 $P = 0.03$ for hCV252720	McCauley et al., 2004
GABRB3 / 5 ms	148 trios	Family based association	Non Significance	Curran et al., 2005
GABRB3 / 5 SNPs GABRA5 / 4 SNPs GABRG3 / 5 SNPs	265 multiplex 205 trios	Family based association and Interaction of genetic variants	Non Significance	Ashley-Koch et al., 2006
GABRB3 / 4 SNPs	104 trios	Family based association and Interaction of genetic variants	$P = 0.027$ (rs2081648)	Kim et al., 2006
GABRB3 / 6 SNPs GABRA5 / 2 SNPs GABRG3 / 3 SNPs	166 patients	Association	Non Significance	Tocigi et al., 2007

*หมายเหตุ ms = microsatellites

วิธีการศึกษาและเครื่องหมายทางพันธุกรรม

สำหรับภาวะหรือโรคที่ไม่ทราบว่ามี การกลายพันธุ์ของยีน หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนยีนเป็นสาเหตุหรือเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค มีวิธีการสืบหาที่นิยมใช้ คือ การทำแผนที่ยีนในบริเวณที่สนใจซึ่งมักอาศัยเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic marker) ที่ใกล้เคียงกับยีนบริเวณที่คาดว่าจะก่อโรค โดยเครื่องหมายทางพันธุกรรมส่วนมากที่นิยมใช้ในการศึกษา เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ (คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวซ้ำกันประมาณ 2-7 เบส) และสไนป์ส ในปัจจุบันมักนิยมใช้สไนป์ส เนื่องจากสไนป์สมีอัตราการกลายพันธุ์น้อยกว่าไมโครแซทเทลไลท์ พบได้บ่อยครอบคลุมยีนที่สนใจศึกษาได้มากกว่า มีวิธีตรวจที่ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลสไนป์สที่มีการศึกษามาแล้วใน เว็บไซต์ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) หรือเว็บไซต์สไนป์สของคนไทย <http://thaisnp.biotec.or.th/db>

โดยวิธีที่เลือกศึกษาความสัมพันธ์ (Association analysis) มีสองแบบ คือ

1. Population base case control คือ การศึกษาหาความสัมพันธ์โดยการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล หรือความถี่ของจีโนไทป์ ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเทียบกับกลุ่มประชากรปกติ ซึ่งประชากรทั้งสองกลุ่มควรมีเชื้อชาติ เพศ และอายุที่ใกล้เคียงกัน
2. Family based association โดยใช้วิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) คือ การวิเคราะห์การถ่ายทอดในครอบครัว โดยคาดว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมตำแหน่งนั้นๆ มีการถ่ายทอดจากพ่อ-แม่ไปสู่ลูกที่เป็นโรคได้บ่อยกว่าที่คาดไว้ทางสถิติ

ข้อดีข้อเสียของแต่ละการศึกษาแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10. แสดงข้อดีข้อเสียของการศึกษาด้วยวิธี **Population base case control** และ **Family based association**

วิธีการศึกษา	ข้อดี	ข้อเสีย
Population base case control	<ol style="list-style-type: none"> 1. เก็บตัวอย่างได้ง่าย 2. เป็นวิธีการที่ใช้ในการค้นหา ยีนที่เป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดโรค 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ถ้าพบความสัมพันธ์ก็ไม่สามารถบอกได้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมนั้นเป็นสาเหตุโดยตรงต่อการเกิดโรค 2. อาจพบผลบวกเทียมได้จากการเลือกกลุ่มตัวอย่าง และขนาดของกลุ่มตัวอย่างเล็กเกินไป
Family based association	<ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นวิธีที่ดีในการค้นหายีนหลักในการก่อโรค 2. ลดปัญหาผลบวกเทียมจากการเลือกกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา 	เก็บตัวอย่างให้ครบทั้งครอบครัวได้ยาก และใช้เวลานาน

วัตถุประสงค์

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* ต่อการเกิดภาวะออทิซึมในเด็กไทย

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

วัสดุ

ตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึม และกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึม

เลือกตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึม และ Pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) ที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 144 ราย โดยผู้ป่วยทุกรายต้องเป็นไปตามข้อกำหนดดังนี้

- (1) ผ่านการตรวจตามเกณฑ์ Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV) ว่าเป็นผู้ป่วยออทิซึม หรือ PDD-NOS
- (2) ไม่มีประวัติการคลอดผิดปกติหรือมีการติดเชื้อทางสมอง
- (3) ไม่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับกลุ่มอาการที่ชัดเจน เช่น กลุ่มอาการดาวน กลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลี และ กลุ่มอาการทูเบอร์สเคอโรซิส (Tuberous sclerosis complex)
- (4) ผู้ป่วยทุกรายมีผลการตรวจโครโมโซมและดีเอ็นเอของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะปกติ ในผู้ป่วยชายต้องมีผลการศึกษาการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX เป็นปกติ และผู้ป่วยหญิงต้องมีผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน MECP2 เป็นปกติเช่นเดียวกัน
- (5) ผู้ปกครองยินยอมให้เข้าร่วมโครงการมี Informs consent

ผู้ป่วยออทิซึมที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 144 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 103 ราย และผู้ป่วย PDD-NOS จำนวน 41 ราย จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์จำนวน 50 ราย (เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 41 ราย และผู้ป่วยหญิงจำนวน 9 ราย) และจากโรงพยาบาลรามธิบดีจำนวน 94 ราย (เป็นผู้ป่วยชายจำนวน 80 ราย และผู้ป่วยหญิงจำนวน 14 ราย) ดังแสดงในตารางที่ 11 ผู้ป่วยทั้งหมดมีอายุเฉลี่ย 50.53 เดือน \pm 2.21 เดือน โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาภาคกลาง มีเชื้อสายไทย-จีน และผ่านการตรวจวัดพฤติกรรมโดยใช้ Vineland Adaptive Behaviour Scales (VABS) และตรวจวัดระดับสติปัญญาโดยใช้แบบทดสอบ non verbal IQ (Binet-V) จากการตรวจจำนวน 121 ราย มีผลการตรวจวัด IQ เฉลี่ย 54.94 \pm 2.40 ในบางรายไม่สามารถประเมินได้เพราะมีข้อจำกัดในการให้ความร่วมมือของผู้ป่วย

ตารางที่ 11. แสดงจำนวนผู้ป่วยออทิสซึม และ PDD-NOS ที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่าง	เพศ (ราย)		จำนวนทั้งหมด (ราย)
	ชาย	หญิง	
ผู้ป่วยออทิสซึม	85	18	103
ผู้ป่วย PDD-NOS	36	5	41
ผู้ป่วยทั้งหมด	121	23	144

ตัวอย่างกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างกลุ่มควบคุมนำมาจากคลังเลือดของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์จำนวน 251 ราย เป็นผู้ชายจำนวน 174 ราย และผู้หญิงจำนวน 77 ราย โดยทุกตัวอย่างต้องผ่านการซักประวัติว่าไม่มีปัญหาทางจิตเวชและปัญหาพัฒนาการผิดปกติที่ชัดเจนใน 3 รุ่น ไม่มีประวัติการรักษาตัวในโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่อง หรือต้องทานยาเพื่อลดปัญหาสุขภาพจิต นอกจากนี้ยังเก็บข้อมูล วันเดือนปีเกิด ศาสนา โรคประจำตัว ประวัติการใช้ยาหรือสารเสพติด ประวัติภูมิแพ้ และเชื้อชาติของบรรพบุรุษ (ในรุ่นปู่ย่าตายายลงมา) เพื่อให้ได้กลุ่มควบคุมที่มีพื้นฐานใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษามากที่สุด การเลือกจำนวนกลุ่มควบคุมต้องมีจำนวนไม่น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วย หรือมากกว่าเป็นสองเท่าของจำนวนผู้ป่วย และต้องมีอัตราส่วนระหว่างผู้ชายต่อผู้หญิงเป็นสัดส่วนใกล้เคียง แต่การพิจารณาอายุระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องใกล้เคียงกัน (age match) เนื่องจากเลือกกลุ่มควบคุมที่มีอายุผ่านจุดที่จะมีโอกาสเกิดออทิสซึม (มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี) และลักษณะยีนของคนไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามอายุแม้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ขึ้น แต่เป็นส่วนน้อยมาก ดังนั้นในทางทฤษฎีถือว่ายอมรับได้ และในทางปฏิบัตินั้นไม่มีกลุ่มควบคุมที่ดีที่สุด แต่การเลือกต้องครอบคลุมรายละเอียดทั้งหมด โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการ การตรวจกรองและการศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมในผู้ป่วยไทยที่เป็นออทิสติก ที่ผ่านการประเมินของคณะกรรมการจริยธรรมของสถาบันที่เกี่ยวข้อง 3 สถาบันแล้ว (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, โรงพยาบาลรามารับดี และโรงพยาบาลธรรมศาสตร์)

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ประมาณ 5 ml ในหลอดปลอดเชื้อที่มีสารละลาย 0.5 M EDTA (500 μ l of 0.5 M EDTA / 15 ml of blood sample) ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ผสมเลือดให้เข้ากับสารละลาย EDTA โดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ 4-5 ครั้ง หลังจากนั้นแยกเอาเฉพาะเม็ดเลือดขาวโดยการเติมสารละลาย TE buffer ให้มีปริมาตรรวมประมาณ 14 ml แล้วปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำวิธีการเติมอีกสองครั้ง หรือจนกว่าสีแดงของฮีโมโกลบินในเลือดจะหายไป จึงนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ หรือเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากเลือด

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาย่อยโดยการเติมสาร Solution A, 10% SDS และ Proteinase K (10 mg/ μ l) เพื่อย่อยเซลล์เม็ดเลือดให้แตก บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน หรือจนกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจะย่อยหมด ซึ่งสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-chloroform โดยเติมสารละลาย saturated phenol chloroform และ isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 เป็นหนึ่งเท่าของปริมาณสารละลายตั้งต้น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนซึ่งมีดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ ทำวิธีการเติมซ้ำอีกครั้ง เติมสารละลาย chloroform และ isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ในปริมาณหนึ่งเท่า ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมเอธานอลบริสุทธิ์ที่เย็นในปริมาตรสองเท่า ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ เขี่ยตะกอนดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ที่มีร้อยละ 70 เอธานอลเย็นปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที เทเอธานอลทิ้ง ตากให้แห้งในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้สารละลาย TE buffer เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้งาน

สารเคมี

Acrylamide/Bis solution

Agarose

Ammonium persulfate

Betaine

BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)

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

Hot start Taq DNA polymerase (Immolase, Boline)

Hot start Taq DNA polymerase (QIAGEN)

QIAquick PCR purification kit (Qiagen)

Sodium bisulphate (Sigma)

Taq DNA polymerase (Invitrogen)

TEMED

Tris

Urea

อุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)
2. เครื่องถ่ายภาพยิววี (Bioimaging system SynGene)
3. ตู้ไฮบริไดส์ (Robin Scientific)
4. อิเล็กโตรฟอริซิสแบบแนวตั้งพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Protean II Xi cell, 20X20 cm, Biorad)
5. เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (PTC200, MJ Research)
6. เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (2720 Thermal cycler, Applied Biosystems)

สารเคมีอื่น ๆ

องค์ประกอบและปริมาณของสารเคมี ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข

1. 25% Ammonium persulfate
2. 6% polyacrylamide gel solution
3. 2.5 mM dNTP Mix
4. 2.5 mM dNTP Mix with 50% 7-Deaza dGTP
5. 2.5 mM dNTPs Mix with 100% 7-Deaza dGTP
6. Loading dye (for non-denature gel electrophoresis)
7. 8% Polyacrylamide gel
8. 10X TBE

วิธีการดำเนินงาน

การศึกษารั้งนี้ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. ตรวจกรองการกลายพันธุ์ (Screening mutation) ในเอกซอน 2 ของยีน ARX โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)
2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน GABRB3 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม โดยวิธี Population base case control และ Family based association โดยใช้วิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT)

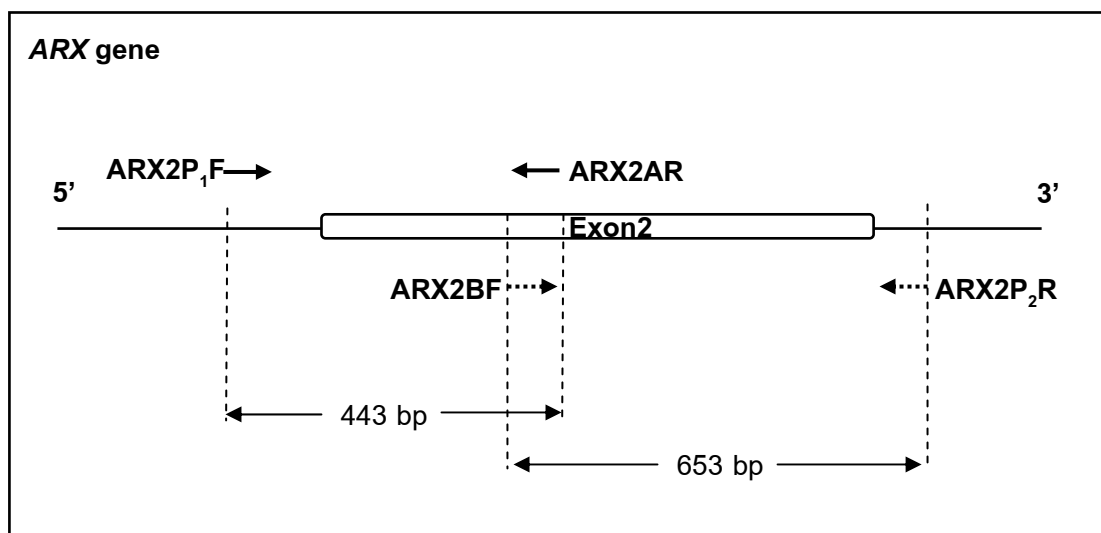
การตรวจสอบการกลายพันธุ์ (Screening mutation) ในเอกซอน 2 ของยีน ARX โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีน ARX เป็นความผิดปกติแบบ X-linked recessive กล่าวคือผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศชายที่มีแม่เป็นพาหะของโรค และพบการกลายพันธุ์ของยีน ARX มากถึงร้อยละ 90 ในเอกซอน 2 ในการศึกษาจึงสนใจตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX ในผู้ป่วยชายเท่านั้น เลือกผู้ป่วยชายออทิซึม และ PDD-NOS ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 128 ตัวอย่าง ที่มีผลการตรวจโครโมโซมและดีเอ็นเอของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะปกติ นำมาตรวจกรองการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย (common mutation) ในเอกซอน 2 ของยีน ARX ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก คือการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยการทำ PCR (Polymerase chain reaction) ให้ครอบคลุมทั่วทั้งเอกซอน 2 ของยีน ARX นำผลพีซีอาร์มาแยกด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แยกผลพีซีอาร์ออกจากเจลโดยวิธี gel purification และนำมาหาลำดับดีเอ็นเอด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Genetic Analyzer) รุ่น 3130 เปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอใน GenBank ตาม Accession No. NT_011757 (DNA) และ NM_139058 (mRNA)

ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX แบ่งออกเป็น 2 ส่วน เนื่องจากเอกซอนตำแหน่งนี้มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วน 2A (ใช้ไพรเมอร์ 2P₁F และ 2AR) และส่วน 2B (ใช้ไพรเมอร์ 2BF และ 2P₂R) ที่ออกแบบโดย Rujirabanjerd และคณะ (2007) ในเส้น forward ตำแหน่ง 2A (2P₁F) และเส้น reverse ตำแหน่ง 2B (2P₂R)

และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Kato และคณะ (2004) ในเส้น reverse ตำแหน่ง 2A (2AR) และเส้น forward ตำแหน่ง 2B (2BF) ดังแสดงในรูปที่ 7 และรายละเอียดตามตารางที่ 12



รูปที่ 7. แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX*

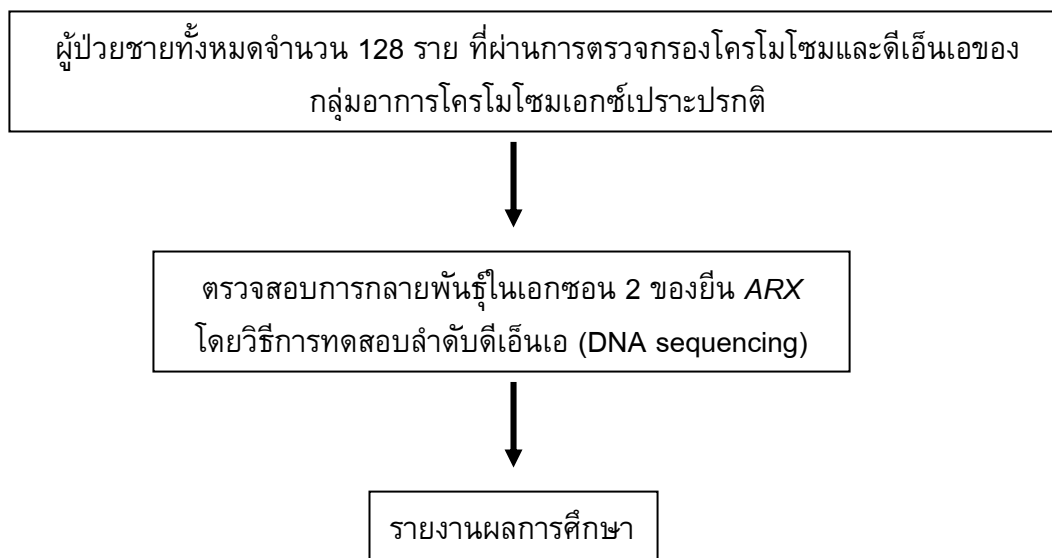
ตารางที่ 12. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* โดยวิธีการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

ชื่อ	ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ (5'-3')	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)	ออกแบบโดย
ARX2P ₁ F	ACGCCTGGGCCTAGGCACTG	443	Rujirabanjerd et al., 2007
ARX2AR	CTCGCGGTACGACTTGC		Kato et al., 2004
ARX2BF	CCTGGGACACGCTCAAGAT	653	Kato et al., 2004
ARX2P ₂ R	TGCCTCTCTGCCGCTGCGA		Rujirabanjerd et al., 2007

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอตั้งต้นของการทดสอบการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1X PCR Buffer $MgCl_2$ 0.75 มิลลิโมลาร์ dNTPs (50% 7-deaza dGTP) 200 ไมโครโมลาร์ ไพโรเมอร์ 1.25 ไมโครโมลาร์ Betaine 1.2 โมลาร์ Hot start Taq DNA polymerase 0.25 ยูนิต เพิ่มปริมาณด้วย MJ thermal cycle ในสภาวะดังนี้ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 61 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลพีซีอาร์ทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี gel purification ดังนี้ หลังจากทำการแยกผลพีซีอาร์ด้วยเจลโพลีอะคริลาไมด์แล้ว ตัดเจลเฉพาะในตำแหน่งผลพีซีอาร์ที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดที่เติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อแยกผลพีซีอาร์ออกจากเจล บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง ดูดสารละลาย Elution buffer ออกใส่หลอดใหม่ เติม Elution buffer จำนวน 100 ไมโครลิตร ในหลอดเดิม บ่มซ้ำที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดสาร Elution buffer รวมกันในหลอดเดียว เติมเอทานอลบริสุทธิ์ที่เย็น จำนวน 800 ไมโครลิตร แช่เย็นที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นตกตะกอนผลพีซีอาร์ โดยนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทเอทานอลบริสุทธิ์ออก ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง นาน 2 ชั่วโมง

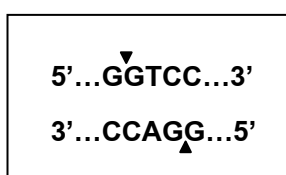
การเตรียมปฏิกิริยาสำหรับตรวจสอบการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3-10 นาโนกรัม ไพโรเมอร์ที่เป็น forward หรือ reverse 1.6 พิกโกโมล BigDye terminator v1.1 ready reaction premix 1X และบัพเฟอร์ BigDye terminator sequencing buffer 1X เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler 2720 สภาวะการทำปฏิกิริยา ได้แก่ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ ตกตะกอนผลพีซีอาร์ ด้วยวิธี sodium acetate/ethanol ละลายผลพีซีอาร์ด้วยสารละลาย HiDi-formamide ปริมาตร 12 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปหาลำดับดีเอ็นเอด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Genetic Analyzer) รุ่น 3130 และตัวอย่างดีเอ็นเอบางส่วนส่งทดสอบที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี



รูปที่ 8. แผนผังแสดงขั้นตอนการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX โดยวิธีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ในผู้ป่วยอหิวาต์เฉียบเฉื่อยผู้ชาย

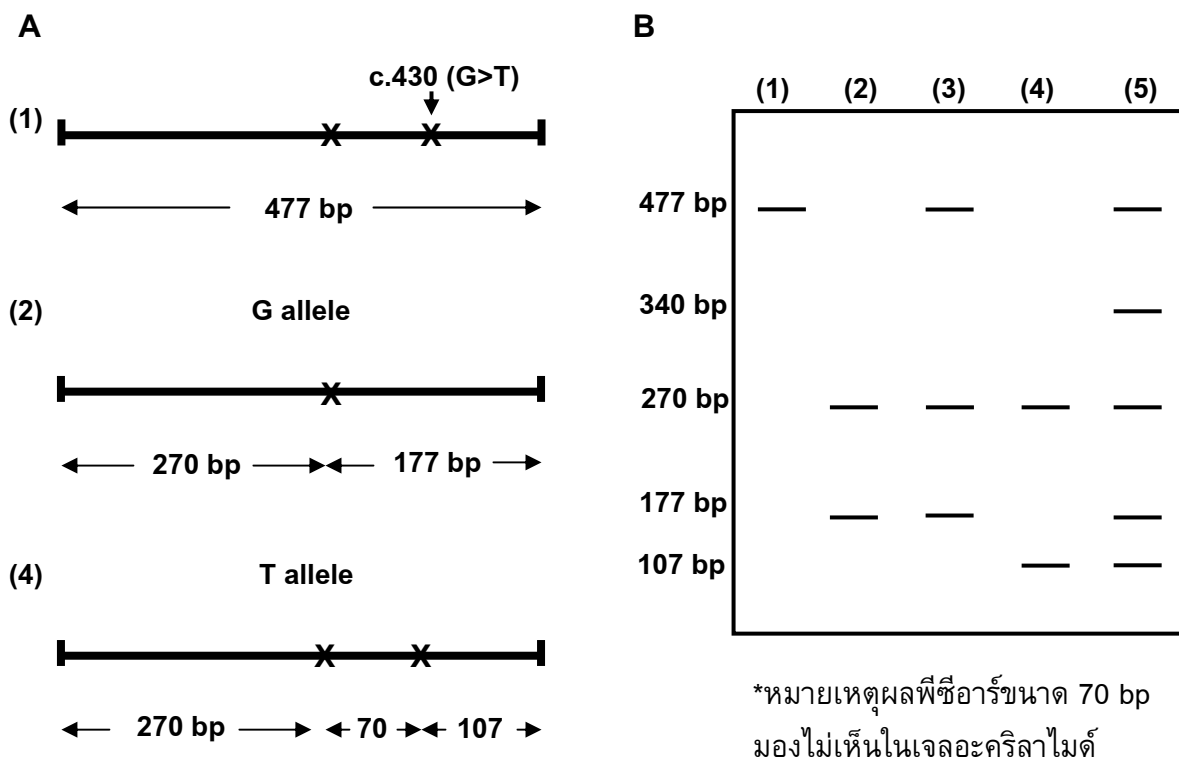
การศึกษาการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

เนื่องจากพบนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง 430 มีการเปลี่ยนเบสกวานีนเป็นเบสไทมีน (c.430G>T) ในผู้ป่วยอหิวาต์เฉียบเฉื่อย 1 ราย (TM34-3) ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการผ่าเหล่าใหม่หรือเป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย จึงทำการศึกษานิวคลีโอไทด์ตำแหน่งนี้ในคนปกติ ซึ่งเลือกจากกลุ่มควบคุมข้างต้นจำนวน 500 อัลลีล (ประกอบด้วยผู้ป่วยหญิงจำนวน 185 ราย และผู้ป่วยชายจำนวน 130 ราย) เพื่อยืนยันผลการศึกษา โดยตำแหน่ง c.430G>T ทำให้เกิดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับการตัดของเอนไซม์ *Ava* II จึงเลือกทำการศึกษด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยใช้โปรแกรม Restriction mapper 3 (<http://www.restrictionmapper.org/>) ออกแบบการศึกษา มีตำแหน่งตัดจำเพาะดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9. แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ *Ava* II

ในการศึกษาใช้เอนไซม์ *Ava* II 2 ยูนิต ในการย่อยผลพีซีอาร์ โดยปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6-12 ชั่วโมง การทำพีซีอาร์ใช้ 50% 7-deaza-dGTP เป็นส่วนเพิ่ม ประสิทธิภาพของพีซีอาร์เนื่องจากมี high CG DNA template ส่งผลให้ผลพีซีอาร์ทั้งหมดที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีนิวคลีโอไทด์กวานีน (G) ปกติประมาณครึ่งหนึ่ง และนิวคลีโอไทด์ G ที่เป็น 7-deaza-dGTP อีกครึ่งหนึ่ง แม้ 7-deaza-dGTP มีโครงสร้างคล้ายกับนิวคลีโอไทด์ G แต่มีผลขัดขวางต่อการย่อยของเอนไซม์ *Ava* II โดยผลพีซีอาร์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์มีขนาด 447 bp (Uncut) ถ้าตำแหน่ง c.430 มีนิวคลีโอไทด์เป็น G (พบในคนปกติ) เอนไซม์ *Ava* II จะตัดผลพีซีอาร์ให้มีขนาด 270 bp (control) และ 177 bp (อัลลีล G) แต่ถ้ามีการเติม 7-deaza-dGTP ในตำแหน่งข้างต้น เอนไซม์ *Ava* II ไม่สามารถตัดผลพีซีอาร์บางส่วนได้ ทำให้มีผลพีซีอาร์ขนาด 447 bp เหลืออยู่ ถ้าตำแหน่ง c.430 มีนิวคลีโอไทด์เป็นไทมีน (T) ซึ่งพบในผู้ป่วย (TM34-3) เอนไซม์ *Ava* II จะตัดผลพีซีอาร์ให้มีขนาด 270 bp (control), 107 bp (T Allele) และ 70 bp แต่ถ้าผลพีซีอาร์นั้นมีการเติม 7-deaza-dGTP เอนไซม์ *Ava* II ไม่สามารถตัดผลพีซีอาร์บางตำแหน่งที่ควรตัดได้ ส่งผลให้ผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดแบบสุ่มเพิ่มอีก 3 แบบ คือ ที่มีขนาด 447, 340 และ 177 bp ดังนั้นผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* II ของอัลลีลแบบ “T” ในผู้ชาย (มีโครโมโซมเอ็กซ์ 1 แห่ง) เป็นแบบ 447, 340, 270, 177, 107 และ 70 bp (70 bp มองไม่เห็นในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส) ทำให้ไม่สามารถแยกรูปแบบจากผู้หญิงที่มีอัลลีล “T” ได้ว่าเป็นแบบโฮโมไซกัสหรือเฮเทอโรไซกัส ดังนั้นเมื่อมีขนาด PCR 107 bp ต้องตรวจสอบซ้ำด้วยวิธีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอต่อไป (ดังแสดงในรูปที่ 10)



รูปที่ 10. แสดงผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* II รูป A แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* II รูป B แสดงภาพจำลองผลพีซีอาร์ในเจลอะคริลาไมด์

- (1) แสดงตัวอย่างที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Uncut)
- (2) แสดงผลพีซีอาร์ที่มี G allele ในตำแหน่ง c.430 (ขนาด 270 และ 177 bp)
- (3) แสดงผลพีซีอาร์ที่มี G allele ในตำแหน่ง c.430 และเติมนิวคลีโอไทด์ G ที่เป็น 7-deaza-dGTP (ขนาด 477, 270 และ 177 bp)
- (4) แสดงผลพีซีอาร์ที่มี T allele ในตำแหน่ง c.430 (ขนาด 270, 107 และ 70 bp)
- (5) แสดงผลพีซีอาร์ที่มี T allele ในตำแหน่ง c.430 และเติมนิวคลีโอไทด์ G ที่เป็น 7-deaza-dGTP (ขนาด 477, 340, 270, 117, 107 และ 70 bp)

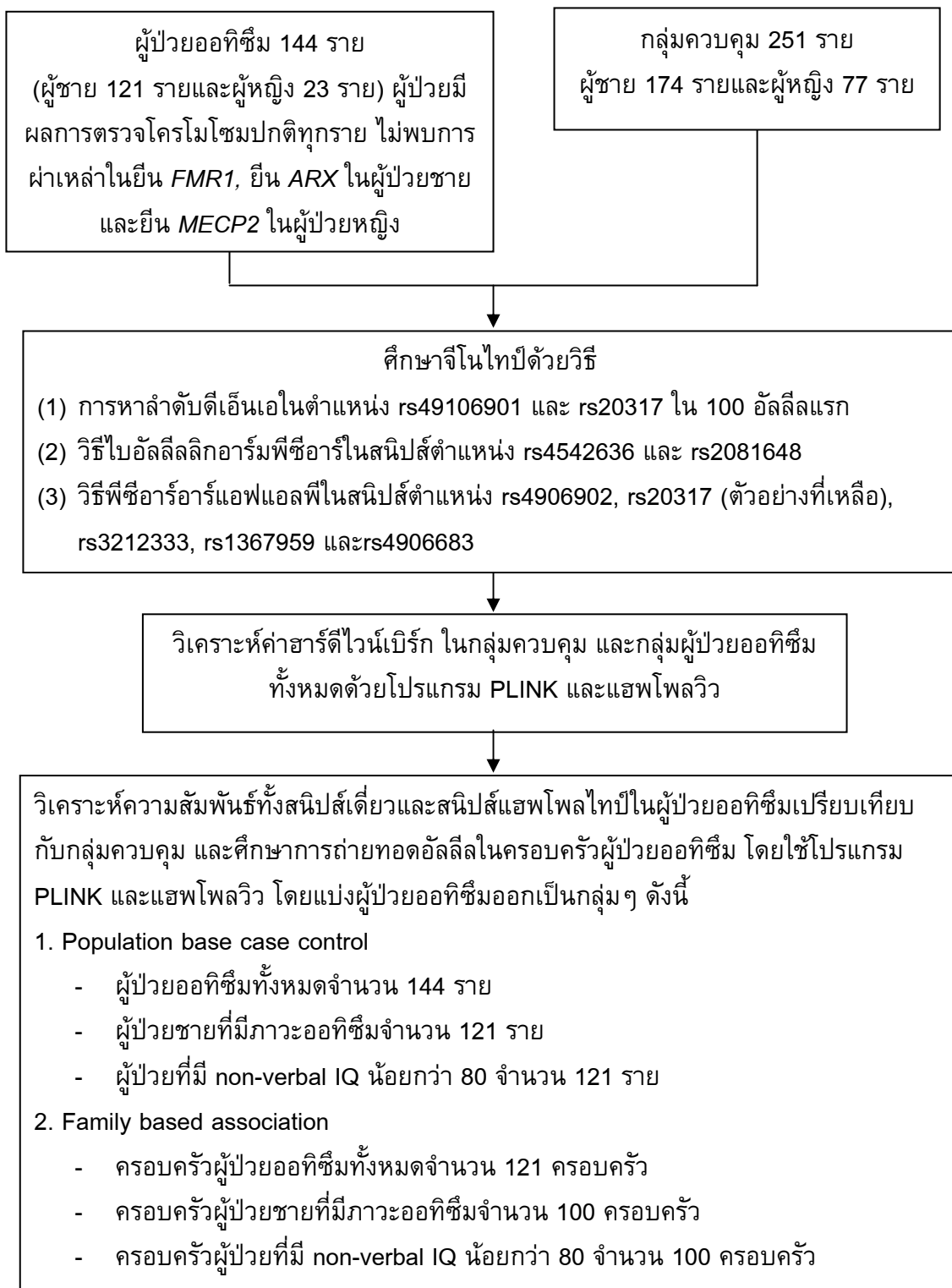
การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม

วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับออทิซึมแบ่งออกเป็น 2 วิธี

1. Population base case control คือ การศึกษาหาความสัมพันธ์โดยการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล หรือความถี่ของจีโนไทป์ ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคเทียบกับกลุ่มประชากรปกติ
2. Family based association โดยใช้วิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) คือ การวิเคราะห์การถ่ายทอดในครอบครัว โดยคาดว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมตำแหน่งนั้นๆ มีการถ่ายทอดจากพ่อหรือแม่ไปสู่ลูกที่เป็นโรคได้บ่อยกว่าที่คาดไว้ทางสถิติ

ในการศึกษาด้วยวิธี Population base case control ซึ่งใช้กลุ่มควบคุมในการศึกษา อาจพบผลบวกปลอมจากการเลือกกลุ่มควบคุมได้ ดังนั้นในการศึกษาจึงต้องวิเคราะห์การกระจายของความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ทุกตำแหน่งในกลุ่มควบคุมก่อนนำมาศึกษา โดยความถี่ของจีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมต้องเป็นไปตามทฤษฎีสสมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) ($P\text{-value} > 0.05$) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสลิปส์แต่ละตำแหน่งกับออทิซึม และศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์แฮพลอไทป์กับออทิซึม โดยใช้โปรแกรม PLINK และโปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview) เปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้จากโปรแกรมทั้งสอง เพื่อให้ได้ผลการศึกษาถูกต้องที่สุด ในการศึกษาทำการแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยตามลักษณะทางคลินิก ได้แก่ ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (ออทิซึม และ PDD-NOS) จำนวน 144 ราย ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดเฉพาะเพศชายจำนวน 121 ราย และผู้ป่วยที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 จำนวน 121 ราย (ดังรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 11)

*หมายเหตุ ผู้ชายที่ใช้ในการศึกษาการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* มีจำนวน 128 ราย แต่จำนวนผู้ป่วยชายที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GABRB3* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมมีจำนวน 121 ราย เนื่องจากต้องคัดผู้ป่วยชายที่ไม่ผ่านเกณฑ์การวินิจฉัยออกไป 7 ราย คือผู้ป่วย 5 ราย มีปัญหาการคลอด ผู้ป่วย 1 ราย พบ c.430G>T บนยีน *ARX* และผู้ป่วย 1 ราย มีปัญหาทางเทคนิค



รูปที่ 11. แสดงแผนผังขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิสซึมทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการถ่ายทอดในครอบครัวผู้ป่วยออทิสซึม

การเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม (ตำแหน่งสไนป์ส์)

สไนป์ส์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกจากตำแหน่งสไนป์ส์ที่มีรายงานผลการศึกษามาแล้ว หรือสไนป์ส์บางตำแหน่งจากฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) โดยสไนป์ส์ที่เลือกต้องมีการศึกษาในกลุ่มประชากรเอเชีย (จีนและญี่ปุ่น) หรือข้อมูลการศึกษาสไนป์ส์ของคนไทย (<http://thaisnp.biotec.or.th/db>) เพื่อให้ทราบถึงความถี่ของอัลลีล หรือสไนป์ส์บางตำแหน่งที่มีผลต่อกลไกการทำงานของยีน สไนป์ส์ที่กระจายบนตำแหน่งโปรโมเตอร์ เอกซอน และอินทรอนของยีนนั้นๆ

ตำแหน่งสไนป์ส์ที่เลือกทำการศึกษาทั้งหมด 8 ตำแหน่ง คือ rs4906902, rs4906901, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 จากการศึกษาศอบสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4906901 ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนไทย (Non-polymorphic) จึงตัดออกจากการศึกษาเหลือสไนป์ส์ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาสไนป์ส์ให้กระจายครอบคลุมทั่วทั้งยีน *GABRB3* สไนป์ส์ในสองตำแหน่งแรก (rs4906901 และ rs20317) อยู่บริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ สไนป์ส์ตำแหน่งที่สาม สี และห้า (rs3212333 rs1367959 และrs4542636) อยู่ในอินทรอน 3 สไนป์ส์ตำแหน่งที่หก (rs4906683) อยู่ในอินทรอน 4 และสไนป์ส์ตำแหน่งสุดท้าย (rs2081648) อยู่ในอินทรอน 8 บนยีน *GABRB3* ดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 12

ตารางที่ 13. แสดงตำแหน่งสโนิปส์บนยีน *GABRB3* ที่ใช้ในการศึกษา

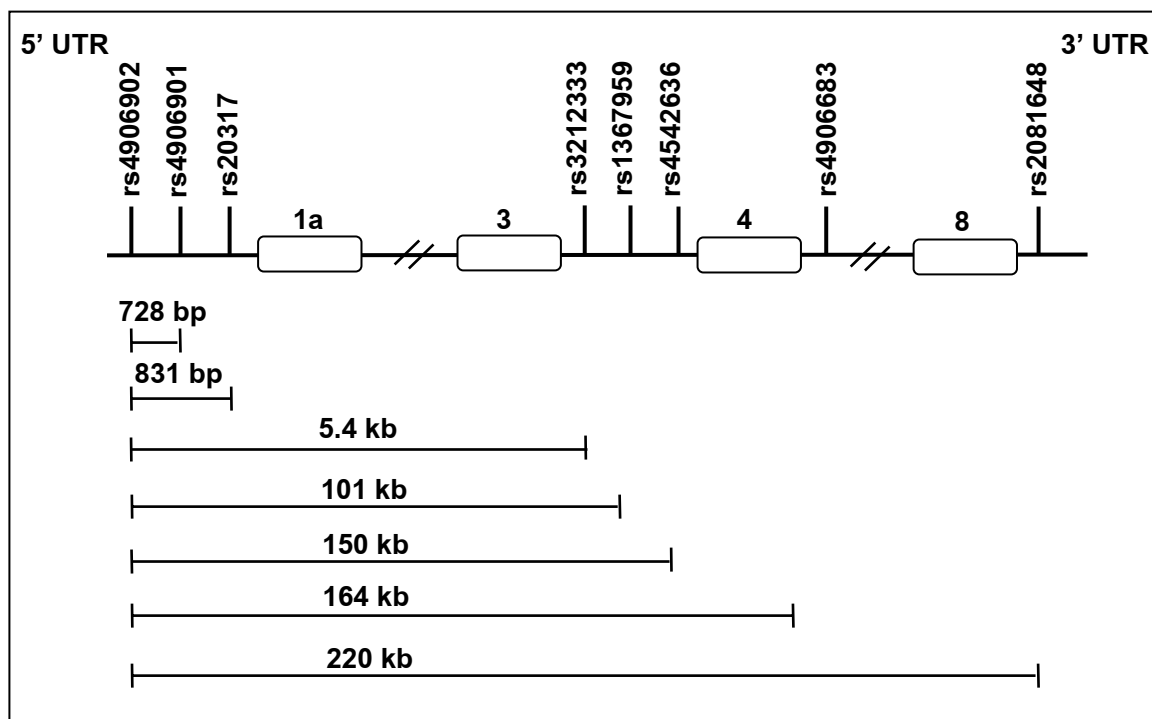
สโนิปส์	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์	อัลลีล	ความถี่อัลลีล (NCBI)	
			คนจีน	คนญี่ปุ่น
rs4906902 ^a	-897 in Promoter	A/G	A:0.689 G:0.311	A:0.656 G:0.344
rs4906901 ^a	-169 in Promoter	A/C	-	-
rs20317 ^{a, c}	-66 in Promoter	C/G	-	-
rs3212333 ^c	Intron 3	C/G	-	-
rs1367959 ^c	Intron 3	C/T	C:0.733 T:0.267	C:0.784 T:0.216
rs4542636 ^b	Intron 3	C/T	C:0.789 T:0.211	C:0.844 T:0.156
rs4906683 ^c	Intron 4	A/G	A:0.214 G:0.786	A:0.170 G:0.830
rs2081648 ^d	Intron 8	A/G	A:0.310 G:0.690	A:0.260 G:0.740

^a เลือกตำแหน่งสโนิปส์ตามการศึกษาของ Urak et al., 2006

^b เลือกตำแหน่งสโนิปส์ตามการศึกษาของ McCauley JL et al., 2004

^c เลือกตำแหน่งสโนิปส์ตามการศึกษาของ Curran et al., 2006

^d เลือกตำแหน่งสโนิปส์ตามการศึกษาของ Ashley-Koch et al., 2007; Ma et al, 2005; Kim et al, 2006; McCauley JL et al., 2004



— อินทรอน

□ เอกซอน

—|—|— ระยะทางระหว่างสไนป์ส์แสดงในหน่วยเบส (ไม่เป็นสัดส่วนที่ถูกต้อง)

รูปที่ 12. แสดงตำแหน่งสไนป์ส์ในยีน *GABRB3* ที่ใช้ในการศึกษา

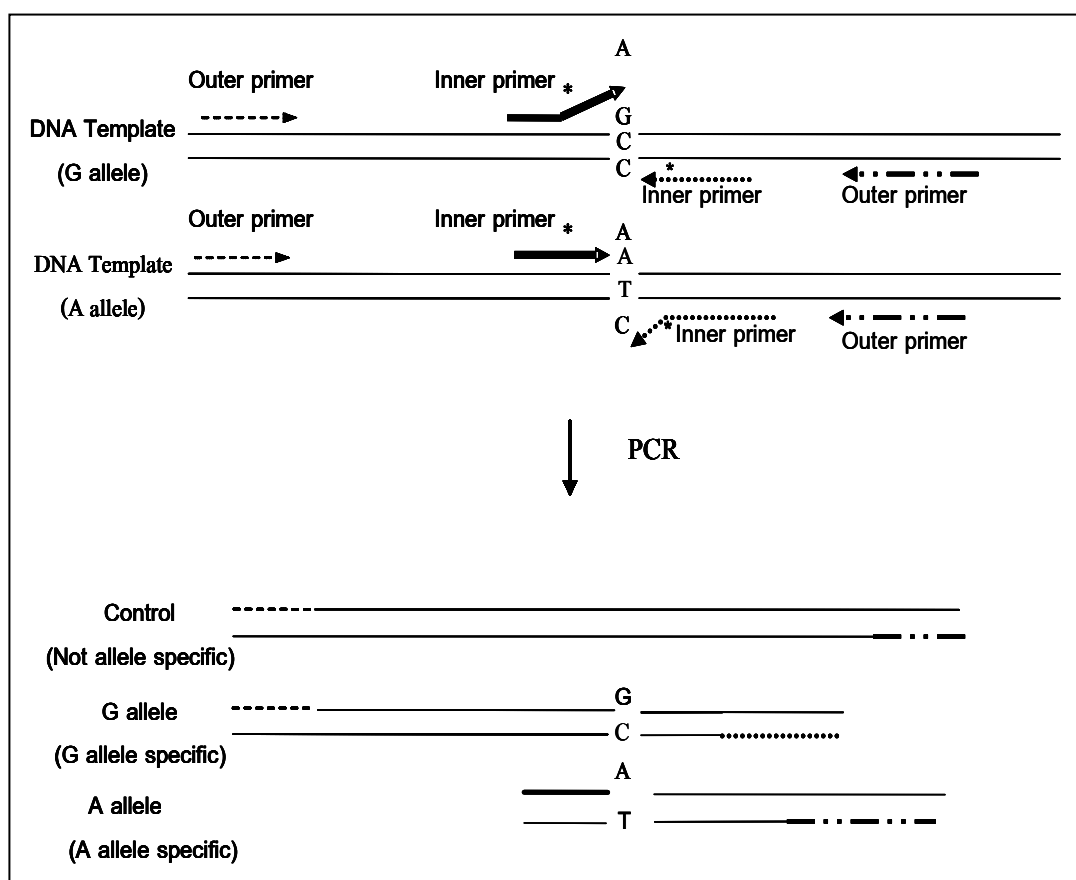
การออกแบบไพรเมอร์ (Primer)

การศึกษาจีโนมโทปของสนิปส์ ใช้วิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ (Biallelic-ARMS PCR techniques) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบสนิปส์ 2 อัลลีลในปฏิกิริยาเดียว โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 เส้น ไพรเมอร์ 2 เส้น จำเพาะต่อตำแหน่งสนิปส์ (inner primer forward และ reverse) และไพรเมอร์ด้านนอกอีก 2 เส้น (out primer forward และ reverse) ซึ่งมีระยะห่างจากตำแหน่งสนิปส์ที่เลือกทำการศึกษาดifferent กันไป ส่งผลให้ผลพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน จึงสามารถแยกความแตกต่างของอัลลีล 2 แบบ ตามขนาดของผลพีซีอาร์ที่ได้ รวมทั้งไพรเมอร์ด้านนอกยังเป็น internal control ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ดังแสดงในรูปที่ 13) ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) และตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Oligocal (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>) และโปรแกรม OligoAnalyzer (<http://www.genelink.com/tools/gl-downloads.asp>) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไพรเมอร์กับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast; blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา มีหลักการออกแบบไพรเมอร์ตามรายละเอียดดังนี้

- (1) ความยาวของไพรเมอร์ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์
- (2) เลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ (random base distribution) ไม่ควรมีลำดับเบสที่เรียงตัวซ้ำ ๆ และพยายามหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์กวานีน (polypurine) หรือนิวคลีโอไทด์ไซโตซีน (polypyrimidine) เรียงตัวซ้ำ ๆ กัน
- (3) ปริมาณนิวคลีโอไทด์ไซโตซีนและกวานีน (C+G content) ของไพรเมอร์แต่ละตำแหน่งควรอยู่ในช่วง 50%-60% ไม่ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี CG content ที่สูงมากเกินไป
- (4) ไพรเมอร์ที่เป็นตำแหน่งด้านนอก (outer primer) ทั้งสองข้างของตำแหน่งสนิปส์ควรออกแบบให้ไม่สมมาตรกันเพื่อให้ได้ขนาดของผลพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน จึงสามารถตรวจสอบผลได้
- (5) ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งสนิปส์ในแต่ละเส้น ต้องมีทิศทางการตรงกันข้ามกัน
- (6) ควรออกแบบผลพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน มีขนาดอยู่ในช่วง 100-500 คู่เบส
- (7) ตำแหน่งปลายสุดด้าน 3' ของแต่ละไพรเมอร์ต้องจำเพาะกับดีเอ็นเอตั้งต้น (complementary) และออกแบบให้ตำแหน่ง -1 หรือ -2 จากปลายด้าน 3'

ของไพรเมอร์คู่ในไม่สามารถจับกันได้ดีกับดีเอ็นเอตั้งต้น (mismatch) เพื่อความจำเพาะของอัลลีลที่ศึกษา

- (8) หลีกเลี่ยงการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกันเองหรือจับกับไพรเมอร์ชิ้นอื่นๆ
- (9) ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรออกแบบให้ใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 13. แสดงการออกแบบไพรเมอร์ด้วยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ (Biallelic-ARMS PCR)

รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาสลิปส์ทุกตำแหน่งแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14. แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับศึกษา
จีโนไทป์ของสลิปส์ในแต่ละตำแหน่ง

สลิปส์	ลำดับดีเอ็นเอ (5'-3')	วิธีการศึกษา
rs4906902 (A/G)	GABA-902F:GCCTCCTTCGGCTGTCATTAGAAGG	RFLP; <i>Tsp509 I</i>
	GABA-902R:TTTATCTCTGAATTTTTCAGGTAAGCGGTACA	
rs4906901 (A/C)	GABA-901F*:CCAGGGTCCAGGAGAGCCAGATG	Sequencing
	GABA-901R:GCCAGTAGCCTTCTAATGACAGCCG	
rs20317 (C/G)	GABA-317F*:CCAGGGTCCAGGAGAGCCAGATG	RFLP; <i>BstU I</i>
	GABA-317R:CCAGTAGCCTTCTCGCGACAGCCG	
rs3212333 (C/G)	GABA-333F:CTTCATTA ACTATCTGGTATTAGGGAC	RFLP; <i>Hinf I</i>
	GABA-333R:CATTGTATGTTACCCAAAAGGAACTC	
rs1367959 (C/T)	GABA-959F:GTTTTCTCTCCTAGTCACTGTCTC	RFLP; <i>Dde I</i>
	GABA-959R:GTTTCTTCTCGCTTCCTTGATTCTC	
rs4542636 (C/T)	GABA-636F:CTTGTGGACAGCGAGAGATGGAGAG	Biallelic- ARMS PCR
	GABA-636R:CCCACAGGTTACTACTAGGCACAGAGC	
	GABA-636TR:CTTCTTGTGGCAAGCATCTGAAGACAAAGA	
	GABA-636CF:GGCTTAGGGACTGATAGAGGACCTC	
rs4906683 (A/G)	GABA-683F:GGGGAATGGGGCAATGATTATCAAATGG	RFLP; <i>Taq^{oo} I</i>
	GABA-683R:GTAGACATGAATAGGGAAGATGGCTGAG	
rs2081648 (A/G)	GABA-648F:CATCTTCCACCTTTGATTATCTTC	Biallelic- ARMS PCR
	GABA-648R:CAATGTGTTCTGTTTCATTTGGG	
	GABA-648AF:GCTTACCATTTAAGTAGAACTGTGTA	
	GABA-648GR:GATTGTATTAGAATGTCCAGCATATC	

F = Forward primer, R = Reward primer

GABA-636TR, GABA-636CF, GABA-648AF, GABA-648GR ตั้งชื่อตามตำแหน่งอัลลีลที่
ศึกษาด้วยวิธี Biallelic- ARMS PCR

*หมายเหตุ เนื่องจากสลิปส์ rs4906901 และ rs20317 มีระยะห่างกันประมาณ 103 เบส จึงใช้
วิธีการ Sequencing ในการศึกษาสลิปส์ทั้งสองตำแหน่งในขั้นตอนแรก จากการศึกษาสลิปส์ทั้ง

สองตำแหน่งครบ 100 อัลลีล พบสไนป์ส์ตำแหน่ง rs4906901 ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนไทย (Non-polymorphic) คือ พบเฉพาะอัลลีล A เท่านั้น (ไม่พบอัลลีล C) จึงไม่ทำการศึกษาสไนป์ส์ rs4906901 ต่อไป เลือกศึกษาเฉพาะสไนป์ส์ rs20317 โดยเปลี่ยนวิธีการศึกษาเป็นวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีแทน แต่ยังคงใช้ Forward primer เดิม และออกแบบ Reverse primer ใหม่ เพื่อให้ง่ายต่อการทำการศึกษา

การศึกษาสไนป์ส์ด้วยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1X PCR Buffer dNTP 200 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.5 ยูนิต สำหรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ไพรมเมอร์ และสาร adjuvant ขึ้นกับแต่ละปฏิกิริยา (ตามรายละเอียดในตารางที่ 15-21) ผลพีซีอาร์ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง MJ thermal cycle ภายใต้สภาวะ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing temp ขึ้นกับแต่ละปฏิกิริยานาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลพีซีอาร์ที่ได้ แยกในโพลีอะครีลาไมด์เจลร้อยละ 6 แล้วอิล็กโทรฟอเรซิสใน 1X TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้ UV transilluminator จีโนไทป์แต่ละแบบแยกตามขนาดของผลพีซีอาร์ และในทุกตัวอย่างต้องมี internal control

แต่ในกรณีที่ไม่สามารถศึกษาสไนป์ส์ด้วยวิธีการไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ได้ ใช้วิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีแทน เนื่องจากเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ศึกษาสไนป์ส์เช่นกัน

วิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี (RFLP)

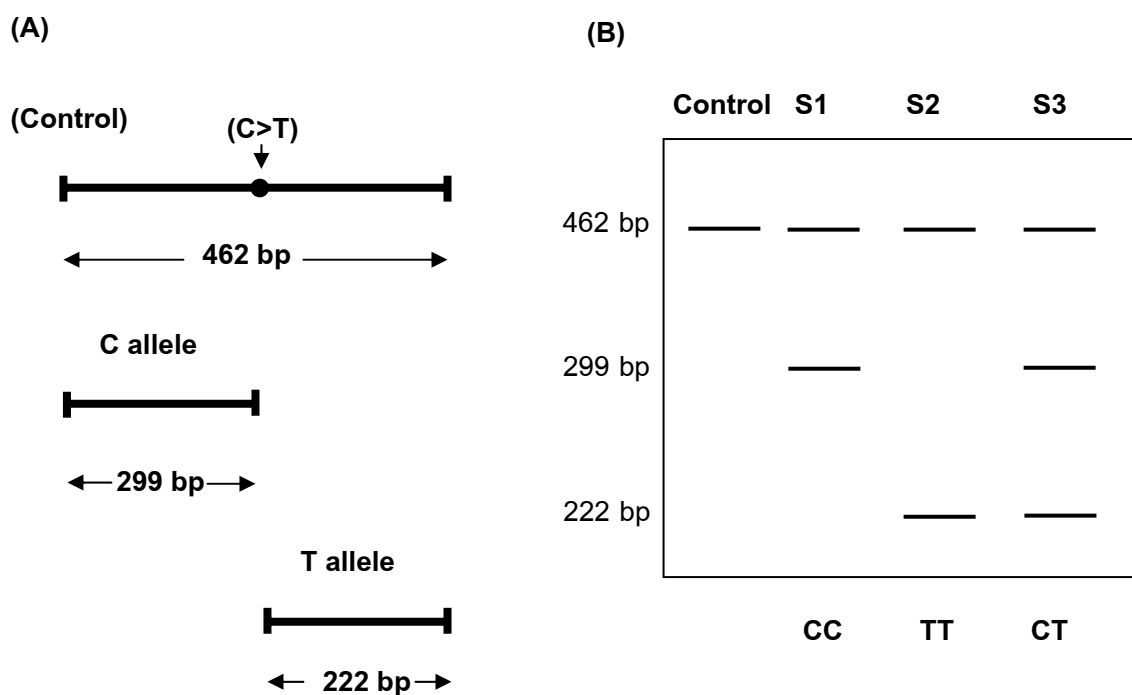
พีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) คือ ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอหรือผลพีซีอาร์ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) เป็นวิธีที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) หรือการกลายพันธุ์ (mutation) ในจีโนม ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทำให้เกิดตำแหน่งที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ ทำให้ได้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือผลพีซีอาร์แตกต่างกัน และสามารถแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนได้ โดยวิธีการนี้มีขั้นตอนในการศึกษา 3 ขั้นตอนหลัก คือ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรมเมอร์ที่จำเพาะ ตัดผลพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอาจใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ หลังจากนั้นนำผลพีซีอาร์ไปแยกขนาดโดยใช้

กระแสไฟฟ้าผ่านเจล เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัด แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัด คือ ถ้าเอนไซม์ที่เลือกใช้ในการศึกษาตัดผลพีซีอาร์ เมื่อมีอัลลีลแค่แบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น เช่น สนิปส์ rs20317 มีอัลลีลแบบ C/G ถ้าสนิปส์ตำแหน่งนี้เป็นอัลลีล C จะมีตำแหน่งที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่ถ้าสนิปส์เป็นอัลลีล G ไม่มีตำแหน่งที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (ดังแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 17) ทำให้ยากต่อการอ่านและแปลผลการศึกษา ดังนั้นในการศึกษาสนิปส์โดยใช้วิธีนี้ควรเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดผลพีซีอาร์ที่มีในอัลลีลทั้งสองแบบของสนิปส์ตำแหน่งนั้นๆ เพื่อง่ายต่อการอ่านผลการศึกษา เช่น สนิปส์ rs4906902 มีอัลลีลแบบ G/A ถ้าสนิปส์ตำแหน่งนี้เป็นอัลลีล G ทำให้เกิดตำแหน่งที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะหนึ่งตำแหน่ง ได้ผลพีซีอาร์ออกเป็นสองชิ้นที่มีขนาดแตกต่างกัน แต่เมื่อสนิปส์ตำแหน่งนี้เป็นอัลลีล A จะมีตำแหน่งที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ได้สองตำแหน่ง ทำให้ได้ผลพีซีอาร์เป็นสามชิ้นที่มีขนาดแตกต่างกัน สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลแบบต่างๆ ของสนิปส์ตำแหน่งนั้น (ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 16) แต่ถ้าไม่สามารถออกแบบดังกล่าวข้างต้นได้ ในการศึกษาจึงควรเลือกเอนไซม์ที่สามารถตัดผลพีซีอาร์ในตำแหน่งอื่น เพื่อให้เห็นความแตกต่างของผลพีซีอาร์และตรวจสอบว่าเอนไซม์ไม่สูญเสียสภาพการทำงาน

โดยยืนยันความถูกต้องของผลการศึกษาสนิปส์ ด้วยวิธีวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ หรือวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี โดยใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ในการศึกษาสนิปส์ rs4542636 (ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 14) และสนิปส์ rs2081648 (ดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 15) และใช้วิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีในการศึกษาสนิปส์ rs4906902 (ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 16) สนิปส์ rs20317 (ดังแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 17) สนิปส์ rs3212333 (ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 18) สนิปส์ rs1367959 (ดังแสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 19) และสนิปส์ rs4906683 (ดังแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 20)

ตารางที่ 15. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs4542636

ไพรมเมอร์		MgCl ₂ (μM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
GABA-636F	0.2	1.0	1.0 M Betaine	62	Control (462)
GABA-636R	0.1				C allele (299)
GABA-636CF	0.25				T allele (222)
GABA-636TR	0.25				

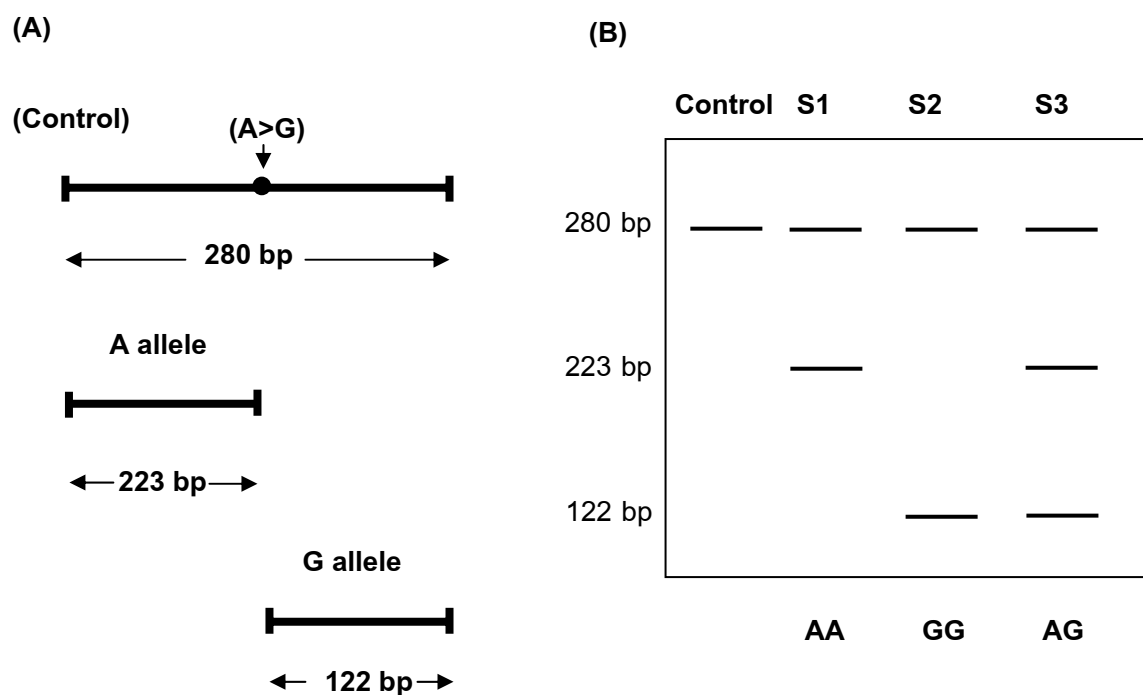


รูปที่ 14. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs4542636

รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 462 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ CC (ผลพีซีอาร์ขนาด 462, 299 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ TT (ผลพีซีอาร์ขนาด 462, 222 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ CT (ผลพีซีอาร์ขนาด 462, 299, 222 bp)

ตารางที่ 16. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2081648

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (μM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
GABA-648F	0.1	2.0	-	62	Control (280)
GABA-648R	0.05				G allele (122)
GABA-648AF	0.35				A allele (223)
GABA-648GR	0.15				

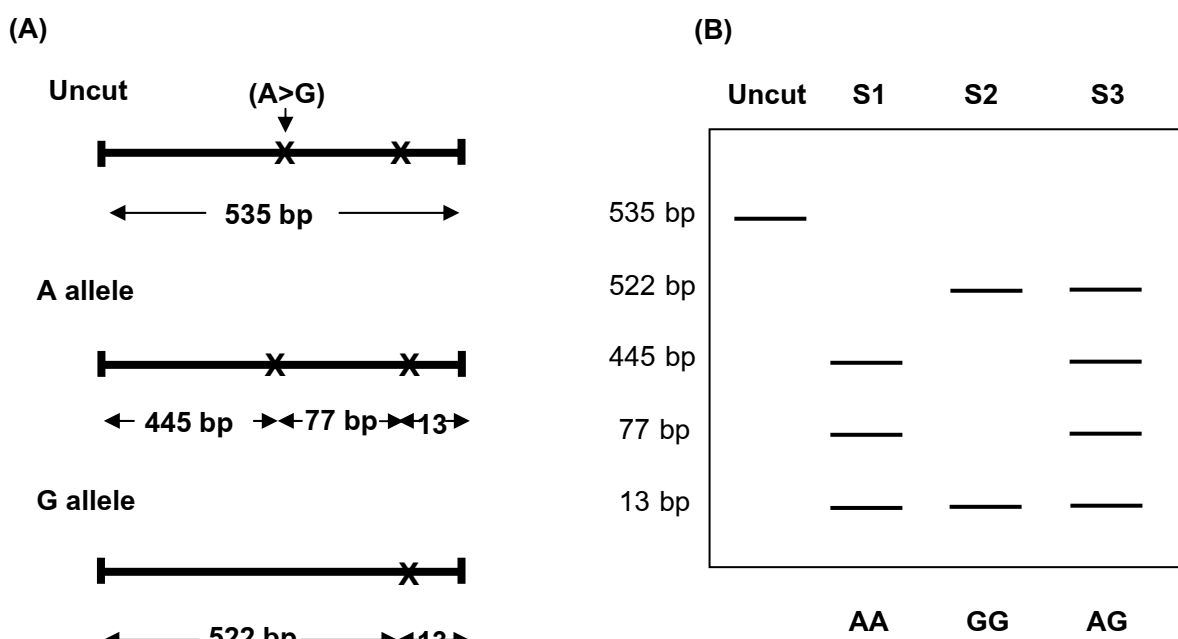


รูปที่ 15. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2081648

รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 280 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ AA (ผลพีซีอาร์ขนาด 280, 223 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ GG (ผลพีซีอาร์ขนาด 280, 122 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ CT (ผลพีซีอาร์ขนาด 280, 223, 122 bp)

ตารางที่ 17. แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs4906902

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (μM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	เอ็นไซม์ตัด จำเพาะ	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)					
GABA-902F	0.5	2.0	1.0 M Betaine	66	<i>Tsp509 I</i>	Uncut (535) A allele (445, 77 และ 13) G allele (522, 13)
GABA-902R	0.5					

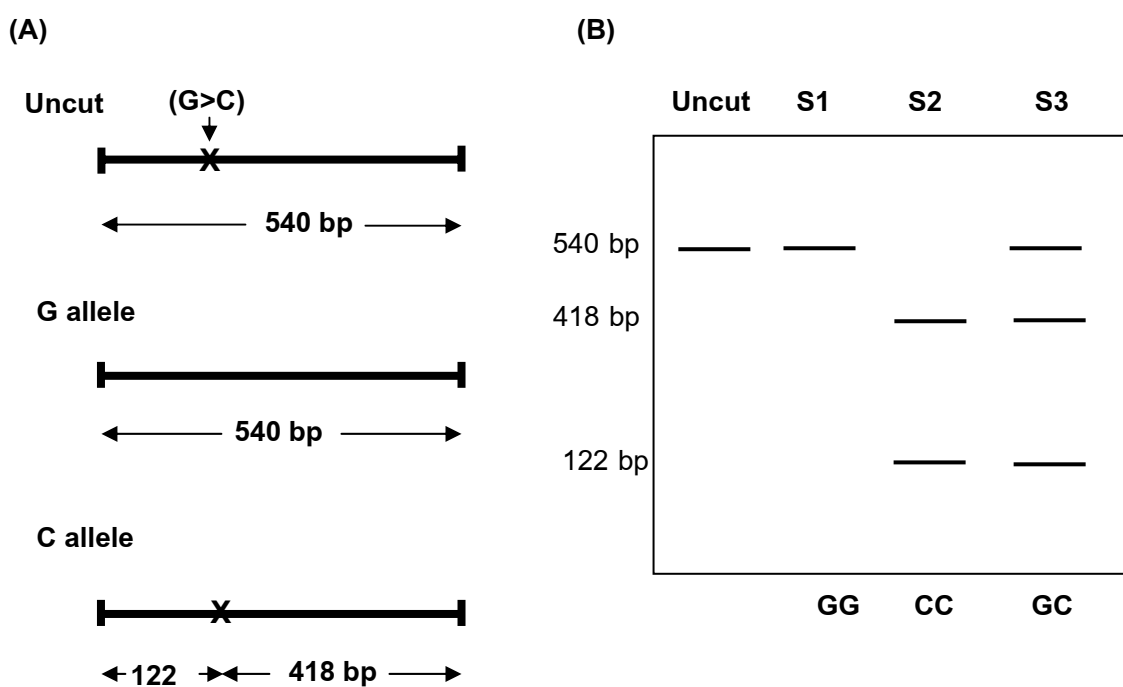


รูปที่ 16. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสลิปส์ rs4906902

รูป (A) แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Tsp509 I* รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Uncut มีขนาด 535 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ AA (ผลพีซีอาร์ขนาด 445, 77 และ 13 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ GG (ผลพีซีอาร์ขนาด 522 และ 13 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ AG (ผลพีซีอาร์ขนาด 522, 445, 77 และ 13 bp)

ตารางที่ 18. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs20317

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (μ M)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing ($^{\circ}$ C)	เอ็นไซม์ตัด จำเพาะ	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μ M)					
GABA-317F	0.5	1.5	1.0 M Betaine	64	<i>Bst</i> U I	Uncut (540)
GABA-317R	0.5					G allele (540)
						C allele (418, 122)

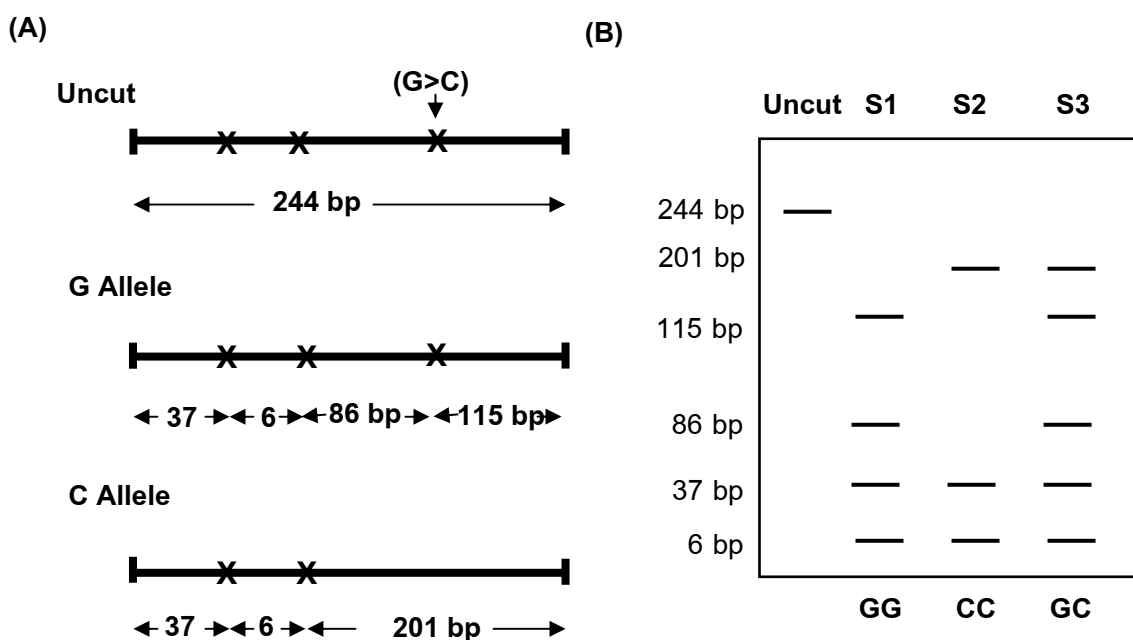


รูปที่ 17. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสลิปส์ rs20317

รูป (A) แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Bst*U I รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Uncut มีขนาด 540 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ GG (ผลพีซีอาร์ขนาด 540 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ CC (ผลพีซีอาร์ขนาด 418 และ 122 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ GC (ผลพีซีอาร์ขนาด 540, 418 และ 122 bp)

ตารางที่ 19. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs3212333

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (μM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	เอ็นไซม์ตัด จำเพาะ	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)					
GABA-333F	0.5	1.0	1.0 M Betaine	60	<i>Hinf</i> I	Uncut (244)
GABA-333R	0.5					C allele (201, 37, 6)
						G allele (115, 86, 37, 6)

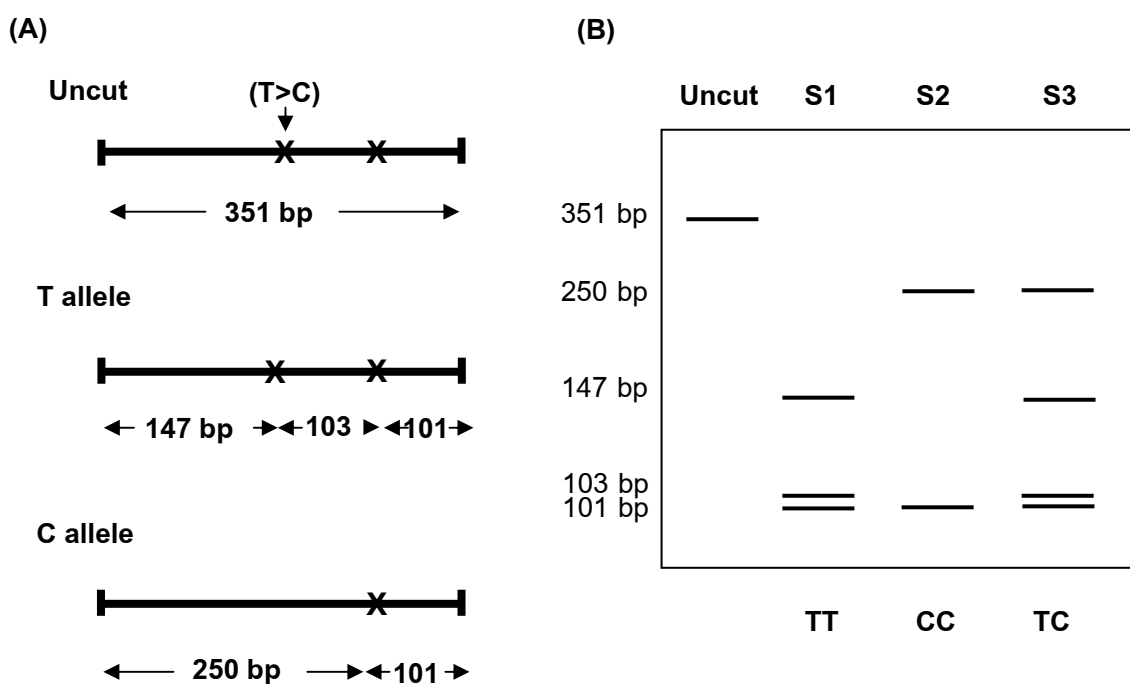


รูปที่ 18. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสลิปส์ rs3212333

รูป (A) แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hinf*I รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Uncut มีขนาด 244 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ GG (ผลพีซีอาร์ขนาด 115, 86, 37, 6 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ CC (ผลพีซีอาร์ขนาด 201, 37, 6 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ GC (ผลพีซีอาร์ขนาด 201, 115, 86, 37, 6 bp)

ตารางที่ 20. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs1367959

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (μM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	เอ็นไซม์ตัด จำเพาะ	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความ เข้มข้น (μM)					
GABA- 959F	0.25	1.0	-	60	<i>Dde</i> I	Uncut (351) C allele (250,101) T allele (147, 103,101)
GABA- 959R	0.25					



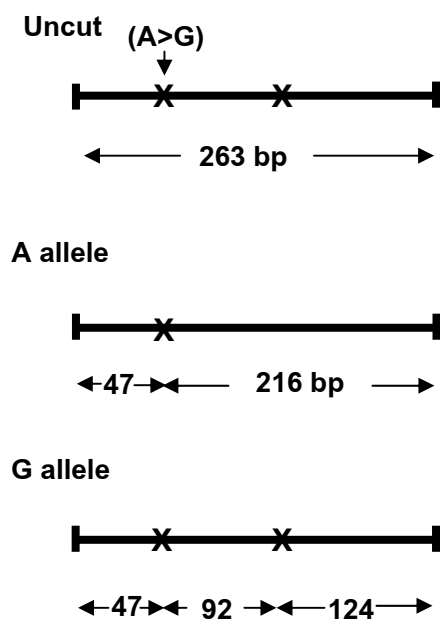
รูปที่ 19. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสลิปส์ rs1367959

รูป (A) แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Dde*I รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Uncut มีขนาด 351 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ TT (ผลพีซีอาร์ขนาด 147, 103, 101 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ CC (ผลพีซีอาร์ขนาด 250, 101 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ TC (ผลพีซีอาร์ขนาด 250, 147, 103, 101 bp)

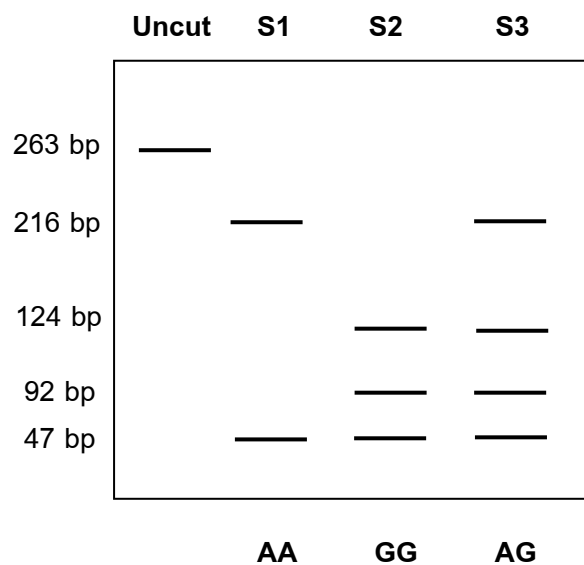
ตารางที่ 21. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs4906683

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (μM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	เอนไซม์ ตัดจำเพาะ	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)					
GABA-683F	0.1	1.0	-	64	Taq ^o I	Uncut (263)
GABA-683R	0.1					A allele (216,47)
						G allele (124, 92 และ 47)

(A)



(B)



รูปที่ 20. แสดงผลพีซีอาร์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสลิปส์ rs4906683

รูป (A) แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Taq^o I รูป (B) แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Uncut มีขนาด 263 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ AA (ผลพีซีอาร์ขนาด 216, 47bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ GG (ผลพีซีอาร์ขนาด 124, 92, 47 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ AG (ผลพีซีอาร์ขนาด 216, 124, 92, 47 bp)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการศึกษานิปัส ด้วยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ และวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี ทำการสุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาแล้ว มาทำการศึกษาลำดับด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ การเตรียมปฏิกิริยาสำหรับวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของนิปัส แต่ละตำแหน่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3-10 นาโนกรัม ไพรมเมอร์ที่เป็น forward หรือ reverse 1.6 พิกโกโมล BigDye terminator v1.1 ready reaction premix 1X และบัฟเฟอร์ BigDye terminator sequencing buffer 1X เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler 2720 สภาวะการทำปฏิกิริยา ได้แก่ 96 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ ตกตะกอนผลพีซีอาร์ด้วยวิธี sodium acetate/ ethanol ละลายผลพีซีอาร์ ด้วยสารละลาย HiDi-formamide 12 ไมโครลิตร นำไปทดสอบด้วยเครื่องทดสอบพันธุกรรม (Genetic Analyzer) รุ่น 3130

การวิเคราะห์ผลการศึกษา (การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ)

การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Pearson's chi-square test)

ในการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงกลุ่ม (Categorical data) ใช้การวิเคราะห์ด้วยไคสแควร์ (Chi-square analysis) ซึ่งเป็นการทดสอบสมมติฐานหลัก (null hypothesis) ที่ความถี่จากค่าที่สังเกต เป็นไปตามการกระจายความถี่ตามค่าที่คาดหวังหรือไม่ โดยพิจารณาความน่าจะเป็น (probability) ของไคสแควร์ ว่ามีค่าน้อยกว่าหรือมากกว่า 0.05 ($\chi^2 \leq 0.05$) ค่าไคสแควร์คำนวณจากค่าความแตกต่างของค่าความถี่ที่คำนวณได้ กับค่าทางทฤษฎียกกำลังสอง 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) version 4.0 (คัดลอกจากหนังสือวิเคราะห์เจาะลึกจีโนมมนุษย์ด้วยชีวสารสนเทศ)

โปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติทางด้านพันธุศาสตร์จากข้อมูลจีโนไทป์ของตัวอย่าง โปรแกรมสามารถแสดงค่าทางสถิติได้หลายรูปแบบ เช่น heterozygosity, HWE, %Genotype, Family Trio และยังมีความสามารถในการคำนวณ และวิเคราะห์สร้าง LD และ Haplotype Blocks ได้จากข้อมูลจีโนไทป์ โปรแกรมแฮพลอวิวเป็นโปรแกรมที่ใช้งานสะดวก และการนำเสนอข้อมูลของโปรแกรมที่เข้าใจง่าย สามารถดาวน์โหลดผ่านอินเทอร์เน็ตได้ (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>) โดยโปรแกรมแฮพลอวิวมีการติดตั้งค่าตัวแปรมาตั้งแต่ต้น (default parameter) ของแต่ละฟังก์ชันของโปรแกรม

1. โปรแกรมทำการคำนวณเฉพาะสถิติ pairwise LD สำหรับมาร์คเกอร์ที่มีการกำหนดระยะห่างระหว่างมาร์คเกอร์ตั้งค่าไว้ที่ 500 KB
2. โปรแกรมไม่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลมาร์คเกอร์ที่มีผลจีโนไทป์ไม่ถึง 50%
3. การศึกษา Association ผู้ใช้สามารถเลือกฟังก์ชันการทำงานได้ 2 แบบ คือ case controls หรือการศึกษาในครอบครัว (family trios)

ข้อมูลที่สามารถ input เข้าโปรแกรมได้หลายลักษณะ แต่ที่นิยมใช้แบบ standard linkage format โดยข้อมูลที่นำมาศึกษานั้นต้องประกอบด้วย pedigree name (family ID), individual ID, Paternal ID, Maternal ID, sex, affection status และ marker genotypes ดังแสดงในรูปที่ 21)

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
TM1-3	201	0	0	1	2	AA	GG	CT	AG	AG	
TM2-3	201	0	0	1	2	AA	GG	CC	GG	AG	
TM3-3	201	0	0	1	2	AG	CG	CC	GG	GG	
TM4-3	201	0	0	1	2	AG	CG	CC	AG	AG	
TM5-3	201	0	0	1	2	AA	GG	TT	AA	AG	
TM6-3	201	0	0	1	2	AG	CG	CC	GG	AG	
TM7-3	201	0	0	1	2	AG	CG	CC	AG	AG	
TM8-3	201	0	0	2	2	GG	CC	CC	GG	AG	
TM9-3	201	0	0	1	2	AG	CG	CT	AG	AG	

รูปที่ 21. แสดงข้อมูล (input) นามสกุล .dat ที่ใช้ในการศึกษาด้วยโปรแกรมแฮพโลวิว

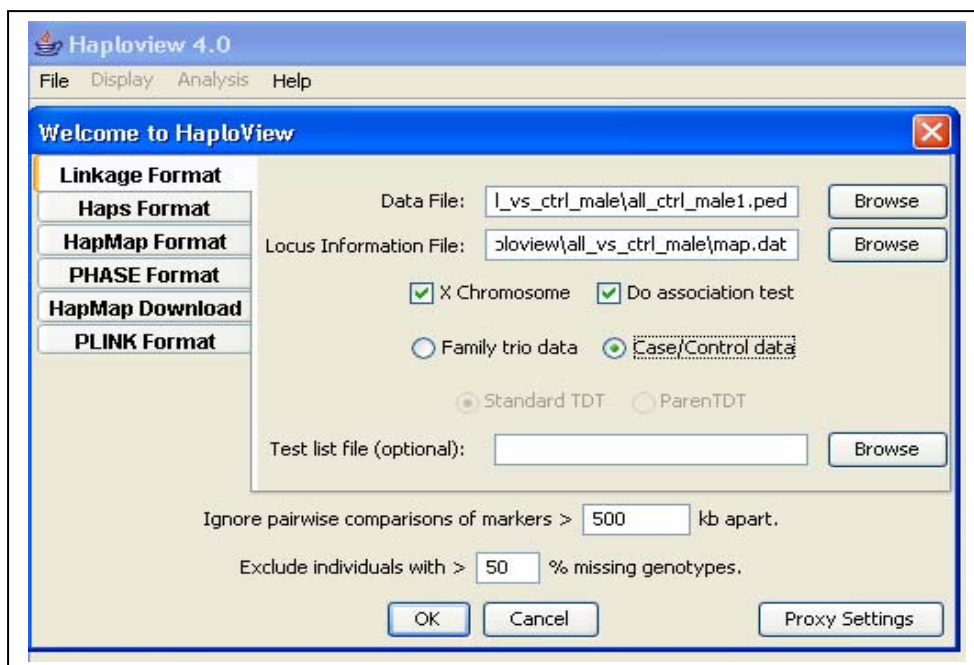
- (a) pedigree name เป็นตัวเลขแสดง individual family โดยตัวเลขจะเหมือนกันในกรณีที่เป็นข้อมูลที่มาจากรอบครัวเดียวกัน แต่ถ้าเป็นข้อมูลที่มาจากรอบครัวตัวเลขต้องไม่เหมือนกัน
- (b) individual ID เป็นหมายเลขประจำตัวเฉพาะของแต่ละบุคคลในการศึกษา โดยผู้ช่วยกำหนดรหัสเป็น 201 พ่อของผู้ป่วยเป็น 101 และแม่ของผู้ป่วยเป็น 102
- (c) Paternal ID เป็นหมายเลขประจำตัวเฉพาะของแต่ละบุคคลที่เป็นบิดาของบุคคลนั้น ในกรณีการวิเคราะห์แบบ Association analysis ไม่ใช่ข้อมูลครอบครัวจึงกำหนดค่าบิดาเป็น 0
- (d) Maternal ID เป็นหมายเลขประจำตัวเฉพาะของแต่ละบุคคลที่เป็นมารดาของบุคคลนั้น ในกรณีการวิเคราะห์แบบ Association analysis ไม่ใช่ข้อมูลครอบครัวจึงกำหนดค่ามารดาเป็น 0
- (e) sex เป็นการระบุเพศของตัวอย่างที่นำมาศึกษาใช้เลข 1 แทนเพศชาย และใช้เลข 2 แทนเพศหญิง และให้ค่าเป็น 0 เมื่อไม่ทราบเพศ
- (f) affection status เป็นการระบุสถานะที่มุ่งศึกษาและใช้ในการคำนวณ โดยเลข 0 แทนสถานะที่ไม่ทราบผลต่อการศึกษา ใช้เลข 2 แทนสถานะที่เป็นโรค และใช้เลข 1 แทนสถานะที่ไม่เป็นโรค

- (g) marker genotype แต่ละ marker แสดงจีโนไทป์ของแต่ละสลิปส์ แยกตามคอลัมน์ (แต่ละคอลัมน์แสดงอัลลีล แต่ละอัลลีลแยกกันด้วยช่องว่าง) โดยกำหนดจีโนไทป์เป็นลำดับเบส A, T, C, G หรือหมายเลข 1-4 (1=A, 2=C, 3=G และ 4=T) และใช้เลข 0 0 แทน marker ที่ไม่มีผลจีโนไทป์

ข้อมูล input บันทึกลงในโปรแกรม Excel และแปลงเป็นไฟล์นามสกุล .dat โดยเลือกชนิดของไฟล์เป็น text (tab delimited) ซึ่งสามารถเปิดด้วยโปรแกรม Notepad หรือ Excel ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ต้องลบหัวข้อคอลัมน์ และลบไฟล์บรรทัดสุดท้ายที่เว้นว่างออกให้เหลือเฉพาะข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์เท่านั้น สร้างแผนที่ของตำแหน่งสลิปส์บนยีนโดยใช้โปรแกรม Notepad โดยสลิปส์ตำแหน่งแรกกำหนดเป็นตำแหน่งอ้างอิง (ตั้งค่าที่ 100) และสลิปส์ตำแหน่งอื่นๆ เป็นระยะห่างจากตำแหน่งที่อ้างอิง ตั้งชื่อแผนที่สลิปส์เป็นไฟล์นามสกุล .dat เช่นกัน

การใช้โปรแกรม HaploView v4.0

1. เปิดโปรแกรมแฮพโลวิวขึ้นมา โดยสามารถเรียกใช้งานผ่าน shortcut ที่หน้าจอ (Desktop) หรือจาก Start Menu > Programes > HaploView > HaploView ตั้งแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22. แสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมแฮพโลวิว v4.0

- เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการนำมาศึกษาโดยระบุนามสกุลเป็นไฟล์ .dat เช่น Sample.dat ใน Data File และแผนที่ของตำแหน่งสไนป์บนยีน เช่น map.dat ใน Locus Information File โดยโปรแกรมจะทำการนำเข้าไปไฟล์ทั้งสองแบบอัตโนมัติ

ผลการศึกษาจากโปรแกรม HaploView v4.0 มีดังนี้

- การตรวจสอบคุณสมบัติของมาร์คเกอร์ (Check Markers) โปรแกรมจะทำการคำนวณข้อมูลพื้นฐานของแต่ละมาร์คเกอร์ และรายงานผลสำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ เช่น
 - ObsHET คือ ค่าที่ได้จากการนับ observed heterozygosity
 - PredHET คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณ predicted heterozygosity ($2*MAF*(1-MAF)$)
 - HWpval คือ ค่า P -value ของ Hardy-Weinberg equilibrium ซึ่งก็คือค่าโอกาสความน่าจะเป็นที่ข้อมูลจีโนไทป์นี้มีการกระจายแบบสมดุล
 - %Geno คือ ค่าเปอร์เซ็นต์ของการศึกษาจีโนไทป์ที่ได้ผลของแต่ละมาร์คเกอร์
 - FamTrio คือ จำนวนของครอบครัวที่มีผลจีโนไทป์ครบ
 - MendErr คือ จำนวนครอบครัวที่มีผลจีโนไทป์ไม่ครบไม่เป็นไปตามกฎของ Mendel
 - MAF คือ ค่า minor allele frequency ของแต่ละอัลลีล
 - Allele คือ แสดง Major และ Minor ของสไนป์แต่ละตำแหน่ง
 - Rating คือ ค่าที่บอกให้โปรแกรมวิเคราะห์ผล ถ้ามีเครื่องหมายถูกอยู่แสดงว่ามาร์คเกอร์นั้นผ่านการทดสอบ แต่ถ้าไม่มีเครื่องหมายถูกแสดงว่ามาร์คเกอร์นั้นไม่ผ่านการทดสอบ
- หน้าต่างแสดง Linkage disequilibrium (LD Plot) การศึกษาว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กันมีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าคาดหวัง ซึ่งพิจารณาจากค่า Lewontin's coefficient (D') ที่คำนวณจากระยะทางและความถี่อัลลีลของแต่ละคู่สไนป์ หากค่า D' มากกว่า 0.8 หมายความว่า มีการถ่ายทอดไปด้วยกันของคู่เครื่องหมายพันธุกรรม การสร้างบล็อกมาจากการเลือกพารามิเตอร์ solid spine ซึ่งโปรแกรมจะเลือกตำแหน่งที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันสูง (strong LD) ของสไนป์ตัวแรก และตัวสุดท้าย ใน LD chart และสไนป์ที่อยู่ใน LD เรียกว่า haplotype block ซึ่งสีในแต่ละบล็อกจะแสดงผลการศึกษาค่า LD ข้างต้น แสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22. แสดงสีซึ่งบอกการถ่ายทอดไปด้วยกันของค่าLD (Standard Color Scheme)

	D' < 1	D' = 1
LOD < 2	white	blue
LOD > 2	Shades of pink/red	bright red

หมายเหตุ LOD เป็นค่า log of the likelihood odds ratio

D' เป็นค่า the value of D prime between the two loci

3. หน้าจอแสดง Blocks และ Haplotypes โปรแกรมจะสร้าง haplotype block ได้หลายแบบ ผู้ใช้สามารถเลือกมาร์คเกอร์ที่ต้องการออกจากลักษณะการเป็น haplotype block โดยการคลิกที่ชื่อมาร์คเกอร์นั้น และสามารถสร้าง haplotype block เองได้โดยใช้ drad and drop กับมาร์คเกอร์ที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 23

The screenshot shows the Haploview 4.0 software interface. The title bar reads "Haploview 4.0 -- GABA1.dat". The menu bar includes "File", "Display", "Analysis", and "Help". The main window has tabs for "LD Plot", "Haplotypes", "Check Markers", "Tagger", and "Association". The "Check Markers" tab is active, displaying a table of markers with the following data:

#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWPval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alleles	Rating
1	rs4906902	100	0.463	0.44	0.367	100.0	0	0	0.327	A:G	✓
2	rs20317	931	0.438	0.433	0.9336	100.0	0	0	0.317	G:C	✓
3	rs4542636	150000	0.37	0.385	0.4923	100.0	0	0	0.261	C:T	✓
4	rs4906683	164000	0.421	0.39	0.1582	100.0	0	0	0.266	G:A	✓
5	rs2081648	220000	0.521	0.483	0.1402	100.0	0	0	0.407	G:A	✓

Below the table, there are several input fields and buttons:

- Using 397 singletons and 0 trios from 397 Families. (Advanced Views)
- HW p-value cutoff: 0.0010
- Min genotype %: 75
- Max # mendel errors: 1
- Minimum minor allele freq. 0.0010
- Buttons: Select All, Deselect All, Reset Values, Rescore Markers

รูปที่ 23. แสดงผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรมแฮพลอวิว v4.0

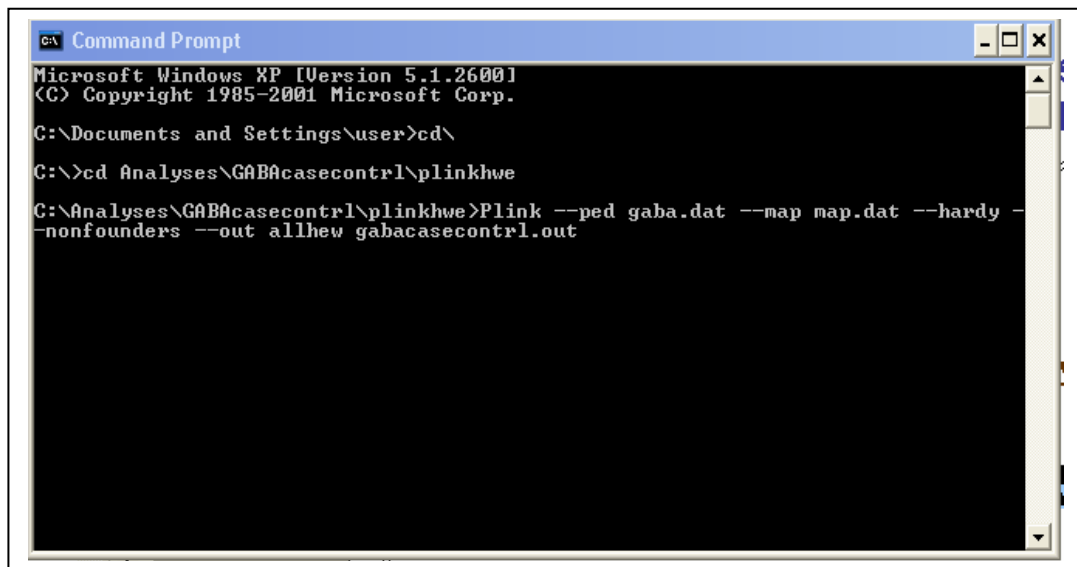
การศึกษาโดยใช้โปรแกรม PLINK v1.00

โปรแกรม PLINK เป็นโปรแกรมที่ทำงานบน command Prompt สั่งการทำงานได้โดยจัดเตรียมโปรแกรม PLINK และข้อมูล input ไว้ในคอมพิวเตอร์ โดยข้อมูล input จะบันทึกลงในโปรแกรม Excel และแปลงเป็นไฟล์นามสกุล .dat แล้วเก็บไว้ใน drive C: หรือ drive อื่นๆ แล้วแต่ความสะดวกของผู้ใช้งาน ซึ่งไฟล์ข้อมูล input ที่ใช้ในการศึกษาเป็นไฟล์ข้อมูลเดียวกันที่ใช้ศึกษาในโปรแกรม Haploview v4.0 ได้ โปรแกรม PLINK สามารถวิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium, Association analysis และ Family based association โดยวิธี TDT ซึ่งการเรียกคำสั่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งสามแบบนี้มีขั้นตอนในการเรียกคำสั่งเช่นเดียวกัน

การใช้โปรแกรม PLINK วิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium

เปิดหน้าต่าง Command Prompt โดยเลือกไปที่ Start > Accessories > Command Prompt จะปรากฏหน้าต่าง Command Prompt

1. เปลี่ยนตำแหน่งการทำงานไปที่ drive C: หรือ drive อื่นที่เก็บข้อมูลข้างต้นไว้ โดยใช้คำสั่ง cd\ เมื่อเข้าสู่ drive C: เลือกไฟล์วิเคราะห์ผลตามตำแหน่งที่จัดเก็บ เช่น ถ้าต้องการวิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium ของข้อมูลซึ่งอยู่ใน drive C: ในโฟลเดอร์ Analyses ในโฟลเดอร์ GABAcasecontrl และในโฟลเดอร์ plinkhwe ใช้คำสั่ง "cd Analyses\GABAcasecontrl\plinkhwe" (ดังแสดงในรูปที่ 24)
2. เลือกวิธีในการวิเคราะห์ผล เลือกตัวอย่างไฟล์ input และกำหนดไฟล์ output โดยใช้คำสั่งแตกต่างกัน เช่น
 - 2.1 คำสั่งเพื่อวิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium ใช้คำสั่ง `plink --ped gaba.dat --map map.dat --hardy --nonfounders --out allhew gabacasecontrl.out (all sample)` (ดังแสดงในรูปที่ 24)



```

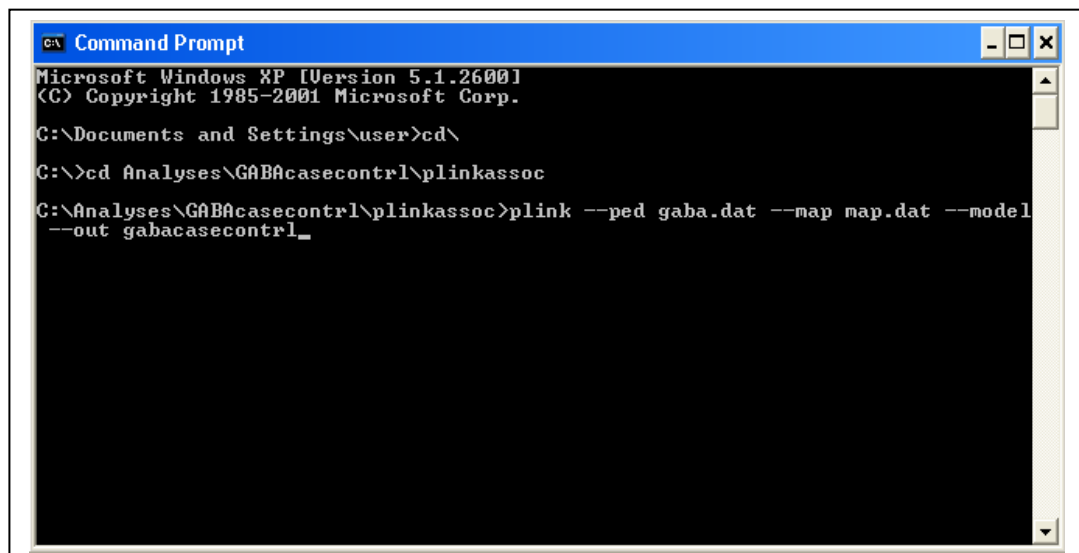
CA Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\Documents and Settings\user>cd\
C:\>cd Analyses\GABAcasecontrl\plinkhwe
C:\Analyses\GABAcasecontrl\plinkhwe>Plink --ped gaba.dat --map map.dat --hardy --nonfounders --out allhew gabacasecontrl.out

```

รูปที่ 24. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่า Hardy-Weinberg Equilibrium

2.2 คำสั่งในการวิเคราะห์ Association analysis ใช้คำสั่ง plink --ped gaba.dat --map map.dat --model --out gabacasecontrl (ดังแสดงในรูปที่ 25)



```

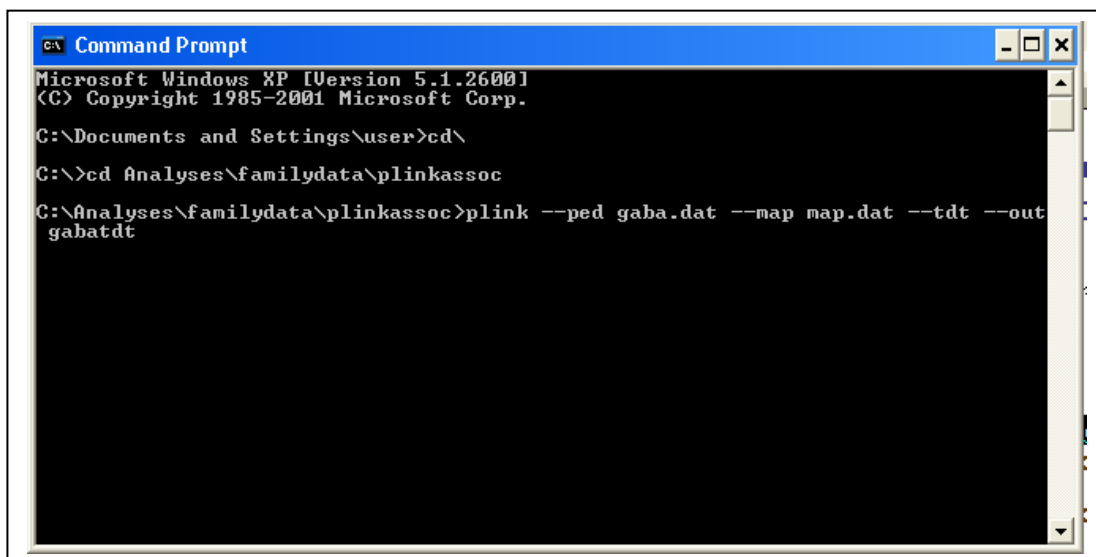
CA Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\Documents and Settings\user>cd\
C:\>cd Analyses\GABAcasecontrl\plinkassoc
C:\Analyses\GABAcasecontrl\plinkassoc>plink --ped gaba.dat --map map.dat --model --out gabacasecontrl_

```

รูปที่ 25. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK เพื่อวิเคราะห์ Association analysis

2.3 คำสั่งในการวิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT ใช้คำสั่ง
 plink --ped gaba.dat --map map.dat --tdt --out gabatdt (ดังแสดงในรูปที่
 26)



```

c:\ Command Prompt
Microsoft Windows XP [Version 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\Documents and Settings\user>cd\
C:\>cd Analyses\familydata\plinkassoc
C:\Analyses\familydata\plinkassoc>plink --ped gaba.dat --map map.dat --tdt --out
gabatdt
  
```

รูปที่ 26. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK เพื่อ
 วิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT

ผลการศึกษาจากโปรแกรม PLINK

การวิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium ผลการวิเคราะห์แสดงเป็นสอง
 ไฟล์ คือ Command Prompt และ Notepad ดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28 โดยผลการศึกษาแสดง
 ค่าต่างๆ เช่น จำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา จำนวนกลุ่มควบคุม จำนวนผู้ชาย และ
 ผู้ป่วยหญิงที่ใช้ในการศึกษา จำนวนผู้ป่วยหรือกลุ่มควบคุมที่มีอ่านผลผิดหรือไม่มีข้อมูลจีโนไทป์
 ใน Command Prompt และผลการวิเคราะห์ แสดงค่า *P*-value ของค่า Hardy-Weinberg
 Equilibrium ในตัวอย่างผู้ป่วยรวมกับกลุ่มควบคุม (ALL) เฉพาะผู้ป่วย (AFF) และเฉพาะกลุ่ม
 ควบคุม (UNAFF) ใน Notepad จากตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าค่า *p*-value มีค่ามากกว่า 0.5 แสดง
 ว่าข้อมูลในกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษานี้มีการกระจายตัวแบบ Hardy-Weinberg Equilibrium
 (ในกรณีที่ตั้งค่า significant *P*-value ไว้ที่ 0.05)

```

C:\Analyses\GABAcasecontrl\plinkhwe>Plink --ped gaba2.dat --map map1.dat --hardy
--nonfounders --out allhewgabacasecontrl.out

-----
      PLINK!           |      v1.00           |      05/Dec/2007
-----
      <C> 2007 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
      For documentation, citation & bug-report instructions:
      http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----

Web-based version check < --noweb to skip >
Connecting to web... failed connection
Problem connecting to web

Writing this text to log file [ allhewgabacasecontrl.out.log ]
Analysis started: Mon Jan 12 17:27:55 2009

Options in effect:
  --ped gaba2.dat
  --map map1.dat
  --hardy
  --nonfounders
  --out allhewgabacasecontrl.out

** For gPLINK compatibility, do not use '.' in --out **
5 (of 5) markers to be included from [ map1.dat ]
398 individuals read from [ gaba2.dat ]
398 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
146 cases, 252 controls and 0 missing
301 males, 97 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 5 SNPs
398 founders and 0 non-founders found
Writing list of removed individuals to [ allhewgabacasecontrl.out.irem ]
1 of 398 individuals removed for low genotyping < MIND > 0.1 >
Writing Hardy-Weinberg tests (all individuals) to [ allhewgabacasecontrl.out.hwe ]
0 markers to be excluded based on HWE test < p <= 0.001 >
  0 markers failed HWE test in cases
  0 markers failed HWE test in controls
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test < GENO > 0.1 >
0 SNPs failed frequency test < MAF < 0.01 >
After frequency and genotyping pruning, there are 5 SNPs

```

รูปที่ 27. แสดงผลการทดสอบค่า Hardy-Weinberg Equilibrium โดยโปรแกรม PLINK บน command line

```

allhew.out - Notepad
File Edit Format View Help

      SNP TEST      GENO O(HET) E(HET) P_HWD
rs4906902 ALL      38/182/174 0.4619 0.4404 0.3619
rs4906902 AFF      13/75/55 0.5245 0.4569 0.09989
rs4906902 UNAFF    25/107/119 0.4263 0.4299 0.8838
rs20317 ALL      37/176/181 0.4467 0.4332 0.6416
rs20317 AFF      9/74/60 0.5175 0.4364 0.03473
rs20317 UNAFF    28/102/121 0.4064 0.4314 0.3801

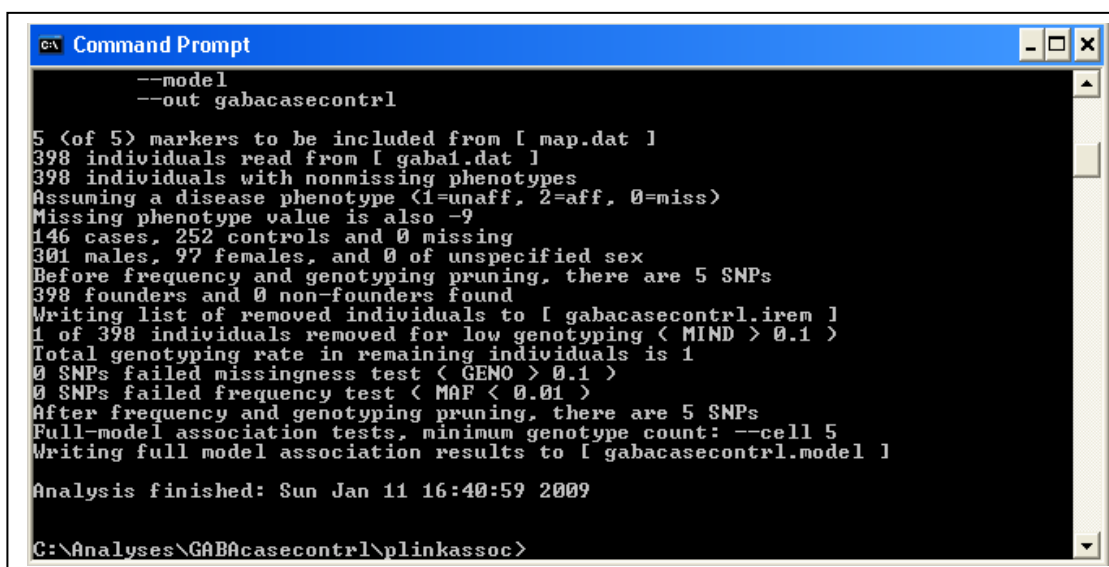
```

รูปที่ 28. แสดงผลการทดสอบค่า Hardy-Weinberg Equilibrium โดยโปรแกรม PLINK

ส่วนการวิเคราะห์ค่า Association analysis โปรแกรมจะเริ่มสร้างไฟล์ output ไว้สำหรับเก็บข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล input ตามชื่อที่ผู้ใช้งานทำการกำหนดไว้ เช่น ตั้งชื่อ output เป็น gabacasecontrl.out ผลการศึกษาจะแสดงทั้งใน Command Prompt ซึ่งบอกจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา จำนวนกลุ่มควบคุม จำนวนผู้ชาย และผู้ป่วยหญิงที่ใช้ในการศึกษา จำนวนผู้ป่วยหรือกลุ่มควบคุมที่มีการอ่านผลผิด หรือไม่มีข้อมูลจีโนไทป์ และอีกสามไฟล์ย่อยใน Notepad ที่แสดงผลการศึกษาด้วยวิธีการต่างๆ เช่น

- GENO คือการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม
- ALLELIC คือการวิเคราะห์ความแตกต่างของอัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม
- DOM คือการวิเคราะห์ผลรวมจีโนไทป์ที่พบมาก (Homozygous major allele) ต่อจำนวนจีโนไทป์ที่พบน้อย (Homozygous minor Allele+ Heterozygous)
- REC คือการวิเคราะห์จำนวนจีโนไทป์ที่พบน้อย (Homozygous minor Allele ต่อผลรวมจีโนไทป์ที่พบมาก (Homozygous major Allele + Heterozygous)

นอกจากนี้โปรแกรมยังแสดงค่า Chi-square test (CHISQ) ค่า degree of freedom (df) และค่า P-value (P) ของสนิปส์แต่ละตำแหน่งและการวิเคราะห์แบบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 29 และ 30



```

C:\ Command Prompt
--model
--out gabacasecontrl

5 (of 5) markers to be included from [ map.dat ]
398 individuals read from [ gaba1.dat ]
398 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
146 cases, 252 controls and 0 missing
301 males, 97 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 5 SNPs
398 founders and 0 non-founders found
Writing list of removed individuals to [ gabacasecontrl.irem ]
1 of 398 individuals removed for low genotyping ( MIND > 0.1 )
Total genotyping rate in remaining individuals is 1
0 SNPs failed missingness test ( GENO > 0.1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0.01 )
After frequency and genotyping pruning, there are 5 SNPs
Full-model association tests, minimum genotype count: --cell 5
Writing full model association results to [ gabacasecontrl.model ]

Analysis finished: Sun Jan 11 16:40:59 2009
C:\Analyses\GABAcasecontrl\plinkassoc>

```

รูปที่ 29. แสดงผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรม PLINK บน command line

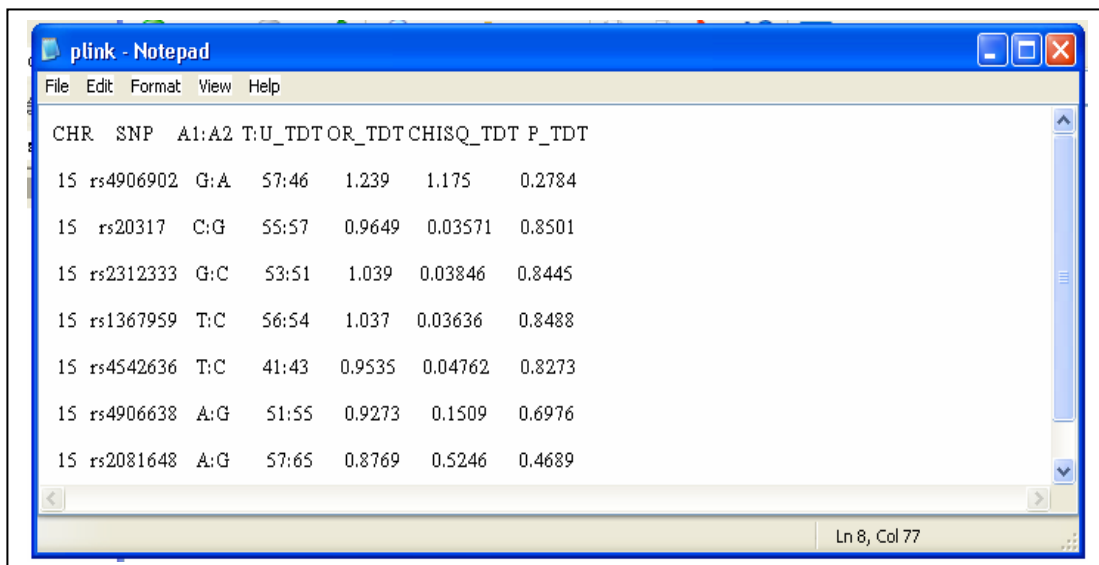
CHR	SNP	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
15	rs4906902	GENO	13/75/55	25/107/119	3.624	2	0.1633
15	rs4906902	TREND	101/185	157/345	1.42	1	0.2335
15	rs4906902	ALLELIC	101/185	157/345	1.35	1	0.2452
15	rs4906902	DOM	88/55	132/119	2.958	1	0.08543
15	rs4906902	REC	13/130	25/226	0.07899	1	0.7787
15	rs20317	GENO	9/74/60	28/102/121	5.585	2	0.06127
15	rs20317	TREND	92/194	158/344	0.04178	1	0.838
15	rs20317	ALLELIC	92/194	158/344	0.04048	1	0.8405
15	rs20317	DOM	83/60	130/121	1.432	1	0.2314

รูปที่ 30. แสดงผลการวิเคราะห์ Association analysis จากโปรแกรม PLINK

ส่วนการวิเคราะห์ค่า Family based association โดยวิธี TDT โปรแกรมจะสร้างไฟล์ output ไว้สำหรับเก็บข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล input ตามชื่อที่ผู้ใช้งานทำการกำหนดไว้ เช่น ตั้งชื่อ output เป็น gabatdt.out ผลการศึกษาจะแสดงทั้งใน Command Prompt เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ Association analysis คือบอกจำนวนครอบครัวผู้ป่วยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา จำนวนผู้ชาย และผู้ป่วยหญิงที่ใช้ในการศึกษา จำนวนผู้ป่วยที่มีอ่านผลผิดหรือไม่มีข้อมูลจีโนไทป์ และอีกสามไฟล์ย่อยใน Notepad ที่แสดงผลการศึกษา เช่น

- CHR คือตำแหน่งโครโมโซมที่ใช้ศึกษา
- SNP คือตำแหน่งสนิปส์
- A1:A2 คือลักษณะอัลลลีสในสนิปส์แต่ละตำแหน่ง
- T:U_TDT คือถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอดอัลลลีสแบบใดแบบหนึ่ง เช่น G:A=60:49 คือถ่ายทอดอัลลลีส G แต่ไม่ถ่ายทอดอัลลลีส A เท่ากับ 60 และถ่ายทอดอัลลลีส A แต่ไม่ถ่ายทอดอัลลลีส G เท่ากับ 49
- CHISQ_TDT คือค่า Chi-square test
- P_TDT คือค่า P-value

ดังแสดงในรูปที่ 31



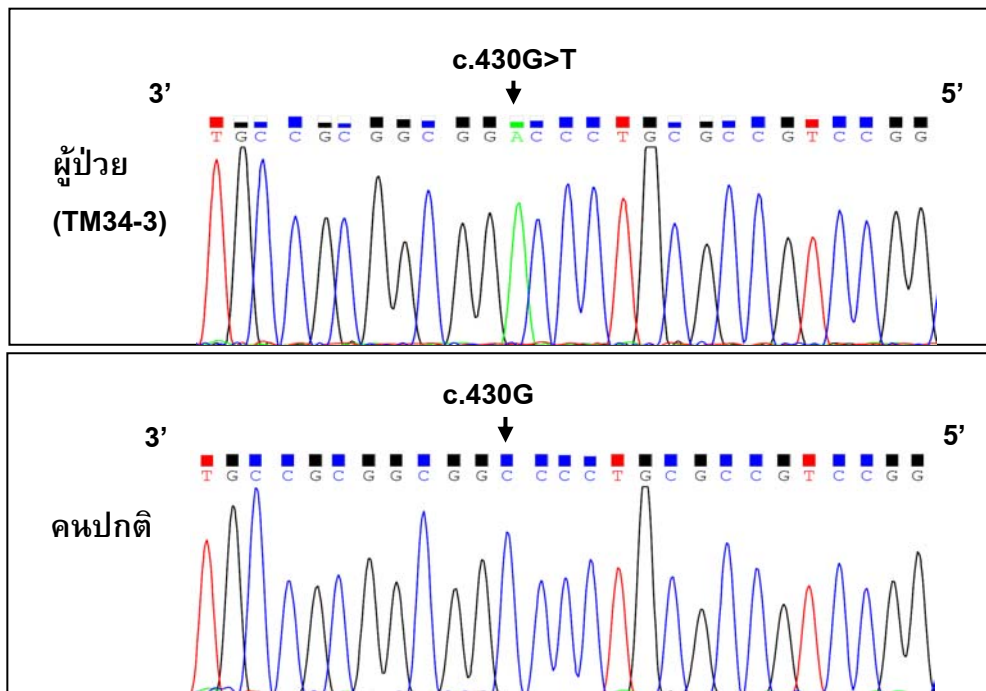
CHR	SNP	A1:A2	T:U_TDT	OR_TDT	CHISQ_TDT	P_TDT
15	rs4906902	G:A	57:46	1.239	1.175	0.2784
15	rs20317	C:G	55:57	0.9649	0.03571	0.8501
15	rs2312333	G:C	53:51	1.039	0.03846	0.8445
15	rs1367959	T:C	56:54	1.037	0.03636	0.8488
15	rs4542636	T:C	41:43	0.9535	0.04762	0.8273
15	rs4906638	A:G	51:55	0.9273	0.1509	0.6976
15	rs2081648	A:G	57:65	0.8769	0.5246	0.4689

รูปที่ 31. แสดงการวิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT จากโปรแกรม PLINK

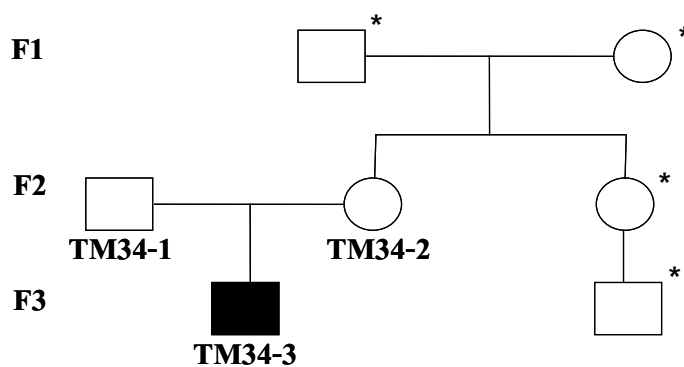
บทที่ 3 ผลการวิจัย

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมจำนวน 128 ราย

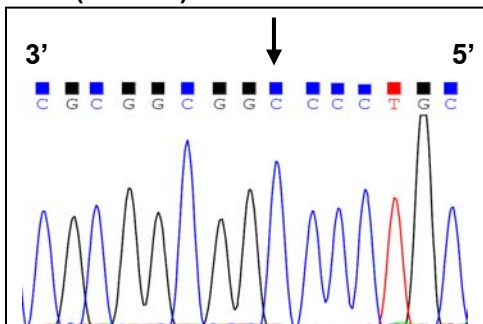
จากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมจำนวน 128 ราย พบการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง 430 จากเบสกวานีนเป็นเบสไทมีน (c.430G>T) ในผู้ป่วยออทิซึม 1 ราย (TM 34-3) ส่งผลให้กรดอะมิโนในตำแหน่งแรกบน polyalanine tract ที่ 2 เปลี่ยนจากกรดอะมิโนอะลานีนเป็นเซอรีน (p.A144S) (ดังแสดงในรูปที่ 32) และจากการศึกษาในครอบครัวพบนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง c.430G>T ในแม่เป็นแบบ heterozygous ดังแสดงในรูปที่ 33



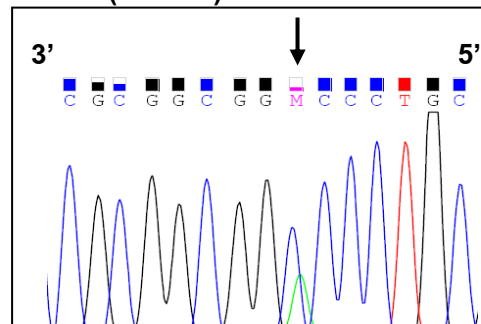
รูปที่ 32. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมของการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T ในยีน *ARX* บนเส้น reverse (3' → 5') ในผู้ป่วย (TM34-3) แสดงในรูปด้านบน และคนปกติแสดงในรูปด้านล่าง



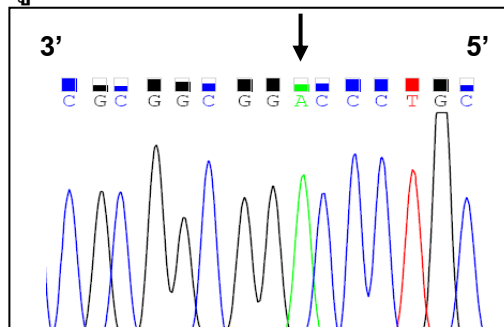
บิดา (TM34-1)



มารดา (TM34-2)



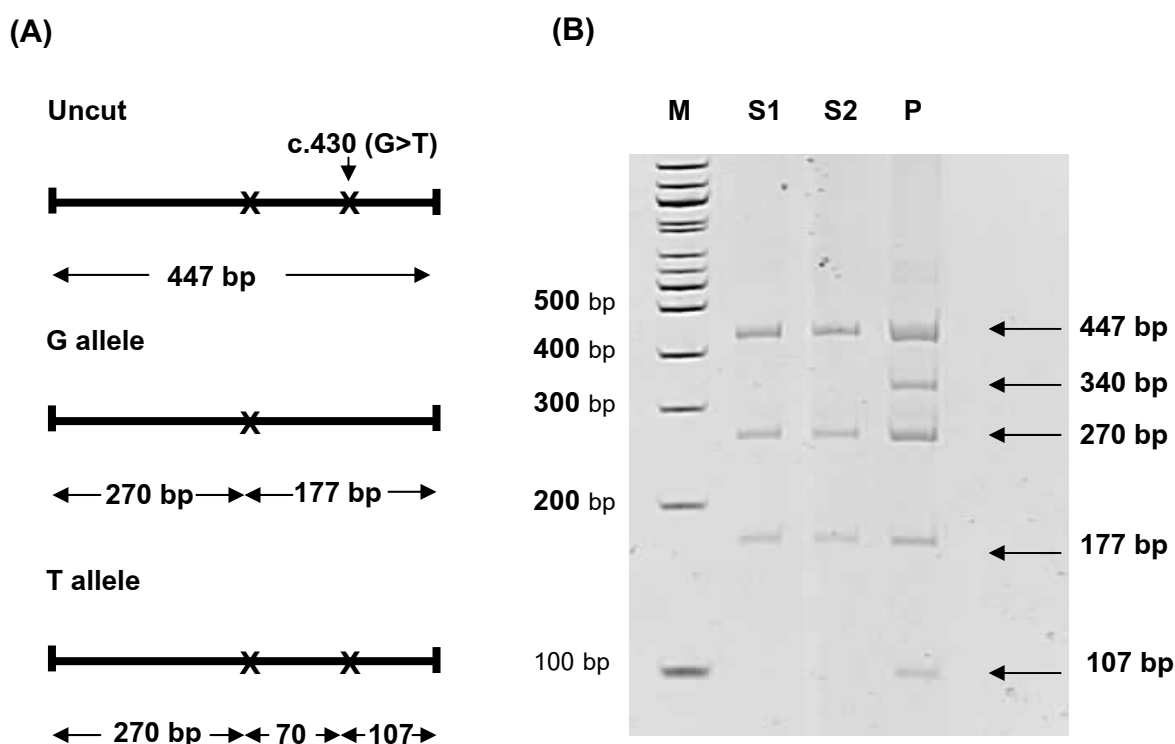
ผู้ป่วย (TM34-3)



หมายเหตุ * แสดงสมาชิกในครอบครัวที่ไม่ได้ตรวจลำดับเบส

รูปที่ 33. แสดงการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวที่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.430G>T ผู้ป่วย (TM34-3) ได้รับการถ่ายทอดนิวคลีโอไทด์ c.430G>T จากแม่ (TM34-2)

เนื่องจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ c.430G>T ที่พบข้างต้น ไม่มีรายงานมาก่อน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใหม่ หรือความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย จึงทำการศึกษาในคนปกติทั้งหมด 500 อัลลีล ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (ดังแสดงในรูปที่ 34) ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ c.430G>T ตำแหน่งนี้ในคนปกติทั้ง 500 อัลลีล

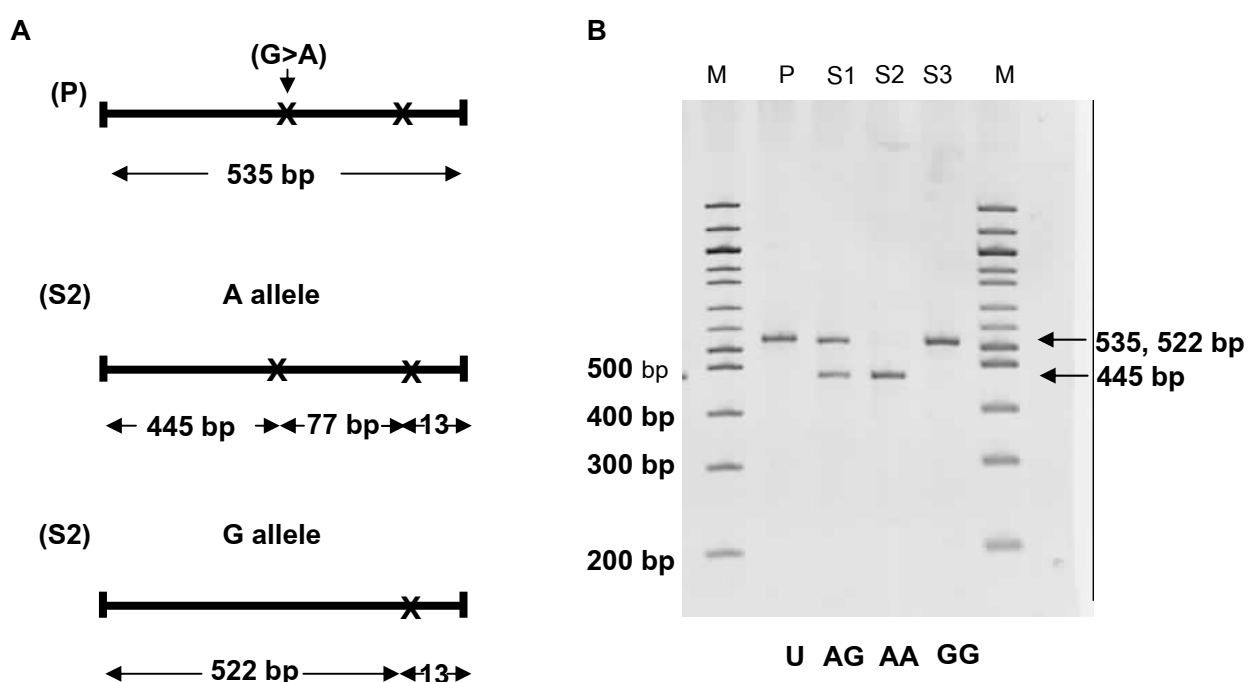


*หมายเหตุผลพีซีอาร์ขนาด 70 bp มองไม่เห็นในเจลอะคริลาไมด์

รูปที่ 34. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ในการศึกษาการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ c.430G>T โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี รูป (A) แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Ava* II รูป (B) แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ โดย M แสดงเครื่องหมาย 100 คู่เบส S1, S2 แสดงคนปกติ (ผลพีซีอาร์ขนาด 447, 270 และ 177 bp) P แสดงผู้ป่วยออทิซึม (TM34-3) ที่พบการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T (ผลพีซีอาร์ขนาด 447, 340, 270, 177, 107 bp) โดย 7-deaza-GTP ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ส่งผลให้การย่อยของเอนไซม์ *Ava* II ไม่สมบูรณ์ แต่ไม่มีผลต่อการแปลผลการศึกษา

การศึกษาจีโนไทป์ของสลิปส์

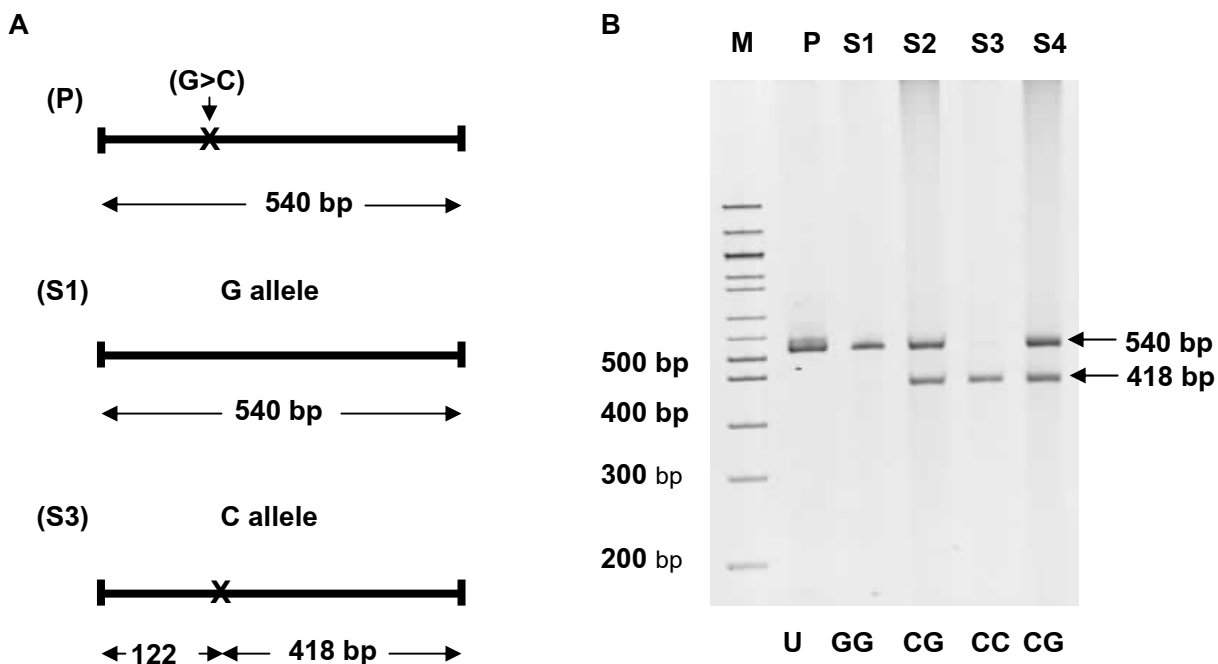
การศึกษาจีโนไทป์ใช้วิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ ในการศึกษาสลิปส์ตำแหน่ง rs4542636 และ rs2081648 (ดังแสดงรูปที่ 39 และ 41) และใช้วิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีในการศึกษาสลิปส์ตำแหน่ง rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959 และ rs4906683 (ดังแสดงในรูปที่ 35, 36, 37, 38 และ 40) โดยผลการศึกษาของแต่ละจีโนไทป์พิจารณาตามขนาดของผลพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 35-41



*หมายเหตุไม่เห็นผลพีซีอาร์ขนาด 77 และ 13 bp ในเจลอะครีลาไมด์

รูปที่ 35. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพีของสลิปส์ rs4906902

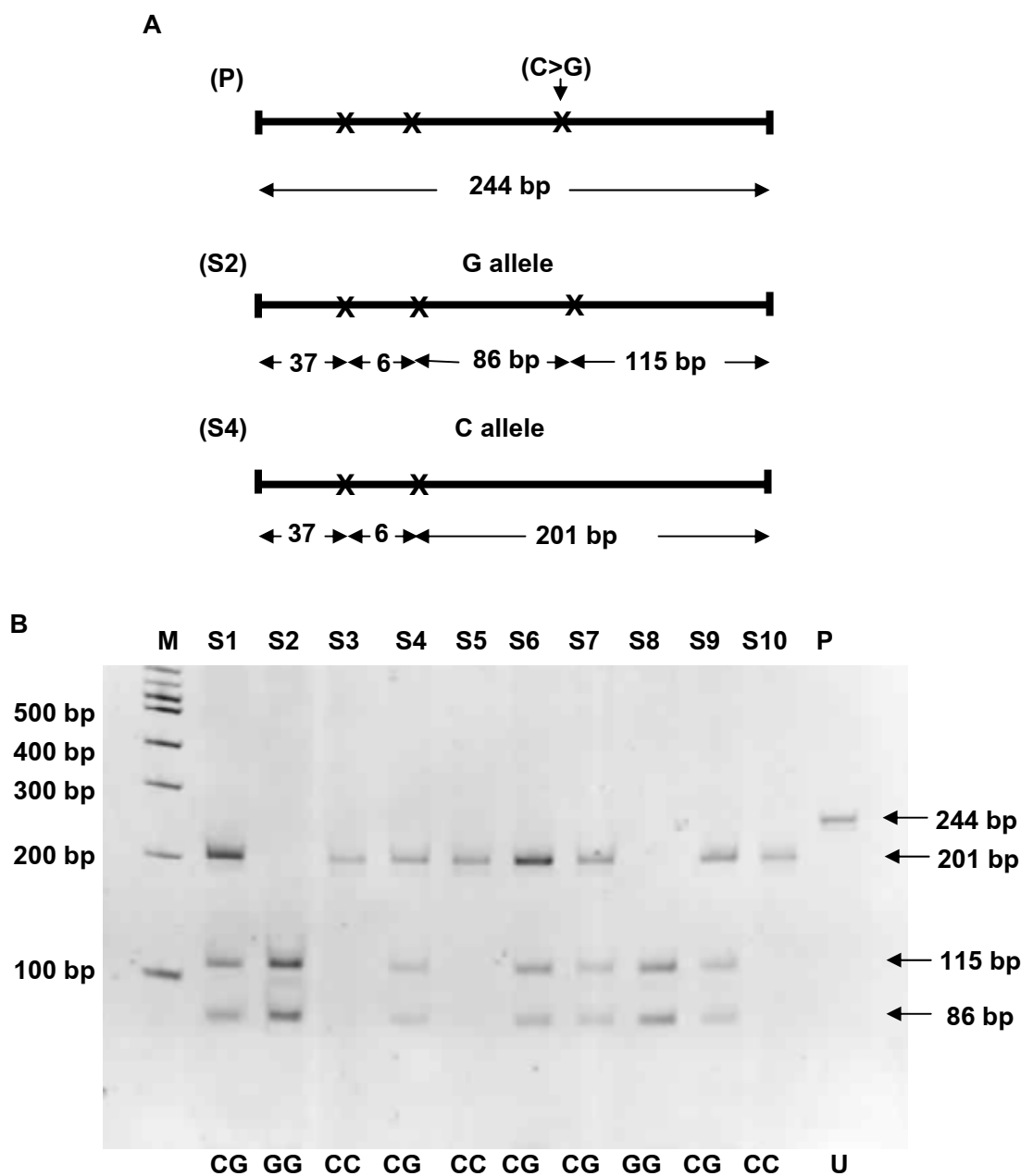
รูป A แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Tsp509I* รูป B แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P เป็นตัวอย่างที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Uncut) แถว S1-S3 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย การอ่านผลจีโนไทป์ คือ แถว S1 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ AG แถว S2 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ AA และแถว S3 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ GG



*หมายเหตุ ไม่เห็นผลพีซีอาร์ขนาด 122 bp ในเจลอะครีลาไมด์

รูปที่ 36. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสไนป์ส์ rs20317

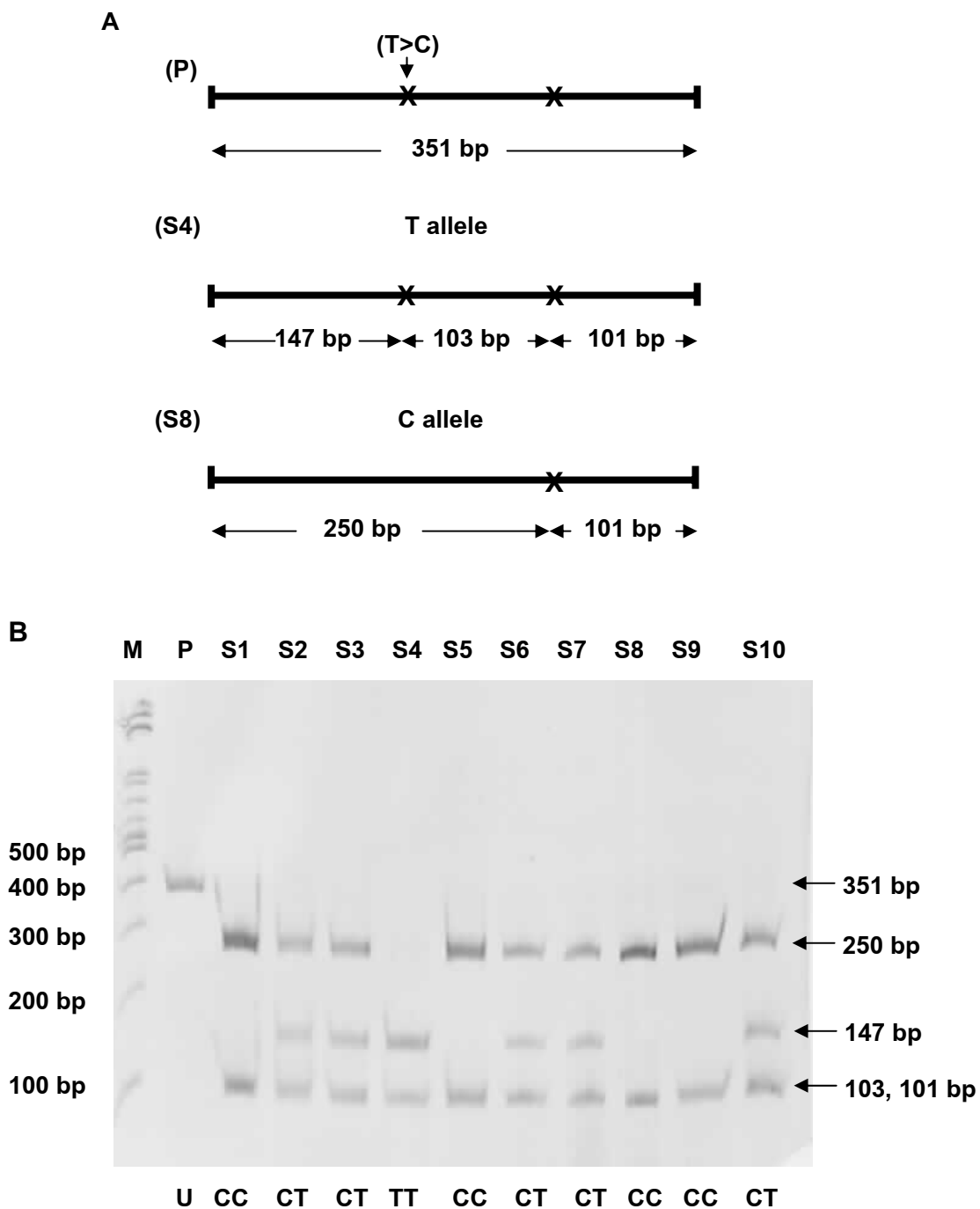
รูป A แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BstU I* รูป B แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P เป็นตัวอย่างที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Uncut) แถว S1-S4 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย การอ่านผลจีโนไทป์ คือ แถว S1 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ GG แถว S2 และ S4 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ CG และแถว S3 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ CC



*หมายเหตุไม่เห็นผลพีซีอาร์ขนาด 36 และ 6 bp ในเจลอะครีลาไมด์

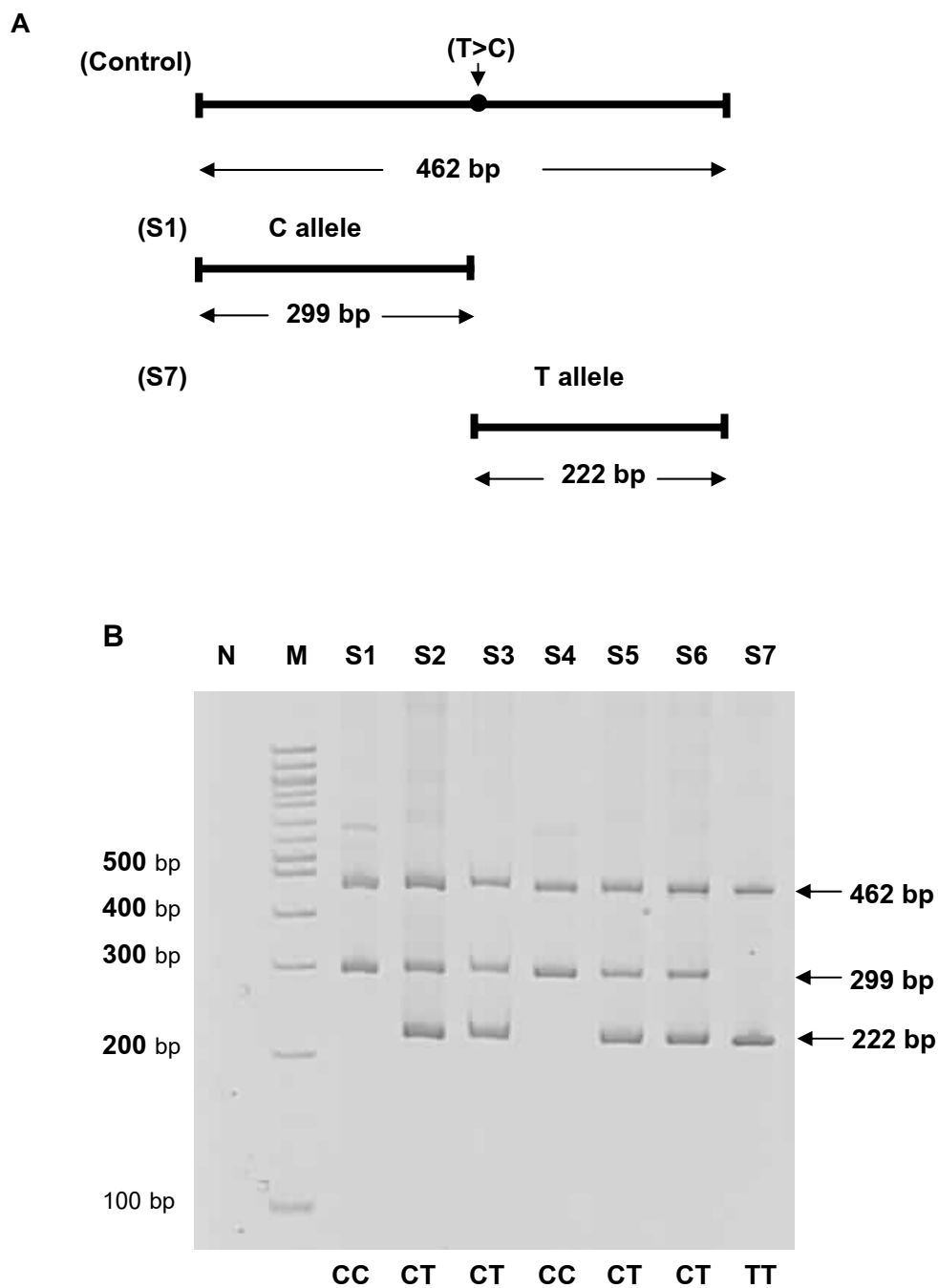
รูปที่ 37. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs3212333

รูป A แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf*I รูป B แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P เป็นตัวอย่างที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Uncut) แถว S1-S10 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย การอ่านผลจีโนไทป์ คือ แถว S1 S4 S6 S7 และ S9 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ CG แถว S2 และ S8 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ GG และ แถว S3 S5 และ S10 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ CC

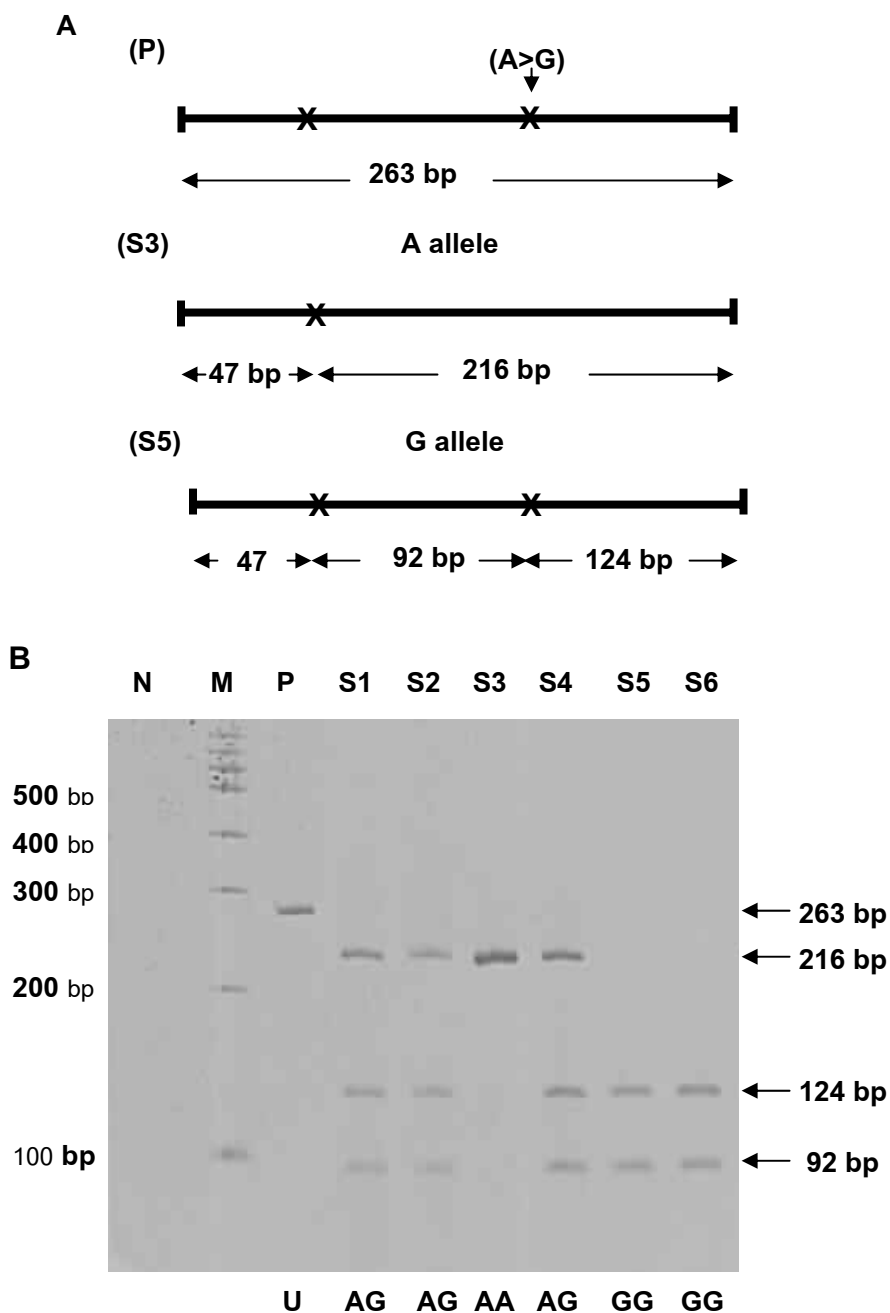


รูปที่ 38. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสไนป์ส์ rs1367959

รูป A แสดงตำแหน่ง X บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Dde* I รูป B แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P เป็นตัวอย่างที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Uncut) แถว S1-S10 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย การอ่านผลจีโนไทป์ คือ แถว S1 S5 S8 และ S9 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ CC แถว S2 S3 S6 S7 และ S10 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ CT และแถว S4 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ TT



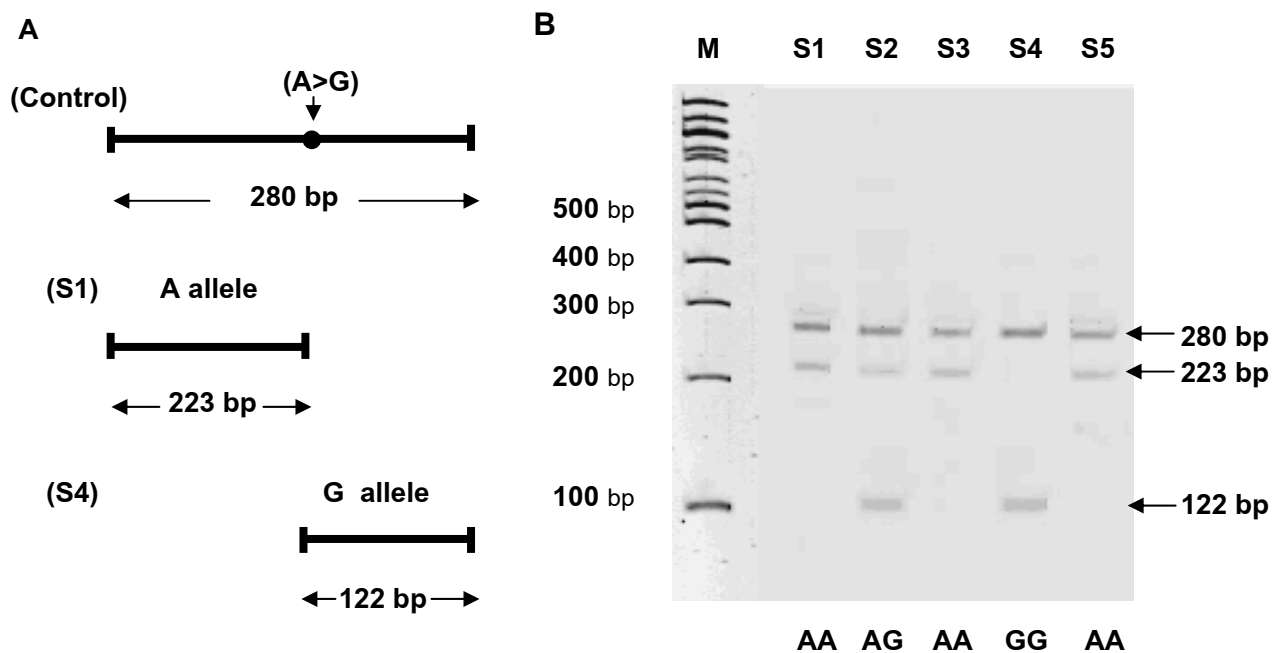
รูปที่ 39. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs4542636 รูป A แสดงผลพีซีอาร์ รูป B แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว S1-S7 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย แถว N (negative control) ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น การอ่านผลจีโนไทป์คือ internal control มีขนาด 462 คู่เบส แถว S1 และ S4 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ CC แถว S2 S3 S5 และ S6 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ CT และแถว S7 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ TT



*หมายเหตุไม่เห็นผลพีซีอาร์ขนาด 47 bp ในเจลอะครีลาไมด์

รูปที่ 40. แสดงผลเจลอะครีลาไมด์โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของสลิปส์ rs4906683

รูป A แสดงตำแหน่ง x บนผลพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I รูป B แสดงผลเจลอะครีลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว P เป็นตัวอย่างที่ยังไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Uncut) แถว S1-S6 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย แถว N ไม่มีดีเอ็นเอตั้งต้น (negative control) การอ่านผลจีโนไทป์ คือ แถว S1 S2 และ S4 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ AG แถว S3 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ AA และแถว S5 และ S6 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ GG



รูปที่ 41. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์โดยวิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2081648
รูป A แสดงผลพีซีอาร์ รูป B แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ แถว M เป็นเครื่องหมาย 100 คู่เบส แถว S1-S5 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย การอ่านผลจีโนไทป์ คือ internal control มีขนาด 280 คู่เบส แถว S1 S3 และ S5 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ AA แถว S2 มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ AG และแถว S4 มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสแบบ GG

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Population base case control

การศึกษาความสมดุลของประชากร (Hardy-Weinberge equilibrium) ในกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาแบบ Population base case control กลุ่มควบคุมที่นำมาใช้ในการศึกษา ต้องตรวจสอบการกระจายความถี่ของจีโนไทป์ให้เป็นไปตามทฤษฎีสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) คือ ในประชากรใดๆ ต้องมีความถี่ของจีโนไทป์คงที่ในทุกรุ่น ถ้าความถี่ของจีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมใดที่มีค่า $P < 0.05$ เราจะไม่นำกลุ่มควบคุมนั้นมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากพบความถี่ของจีโนไทป์แบบใดแบบหนึ่งมากเกินไป ส่งผลให้พบผลบวกปลอมจากกลุ่มควบคุมข้างต้นได้ โดยกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีผลจีโนไทป์ครบทุกรายคิดเป็นร้อยละ 100 ($N = 251$) จากการศึกษาการกระจายความถี่ของจีโนไทป์ตามทฤษฎีสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม PLINK พบกลุ่มควบคุมที่นำมาศึกษาสลิปส์ทุกตำแหน่งเป็นไปตามทฤษฎีสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก โดยค่า P -value ของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (P_{HWD}) ของสลิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 มีค่าเท่ากับ 0.8838, 0.3801, 0.6614, 0.2187, 1.000, 0.2084 และ 0.1977 ตามลำดับ และค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (HET) คือ โอกาสที่จะพบอัลลีลแบบเฮเทอโรไซกัสในสลิปส์แต่ละตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 0.4200, 0.4278, 0.4352, 0.4800, 0.4118, 0.4032 และ 0.4902 ตามลำดับ ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23. แสดงค่าฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีของสลิปส์ทุกตำแหน่ง (rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648) บน ยีน GABRB3 ในกลุ่มควบคุม (251)

สลิปส์	จีโนไทป์	จำนวน(ราย)	ร้อยละ	P_HWD	HET
rs4906902	AA	119	49	0.8838 HWE สมดุล	0.4200
	AG	107	40		
	GG	25	11		
rs20317	GG	121	48	0.3801 HWE สมดุล	0.4278
	CG	102	41		
	CC	28	11		
rs3212333	CC	119	47	0.6614 HWE สมดุล	0.4352
	CG	105	42		
	GG	27	11		
rs1367959	CC	97	39	0.2187 HWE สมดุล	0.4800
	CT	126	50		
	TT	28	11		
rs4542636	CC	126	50	1.000 HWE สมดุล	0.4118
	CT	104	41		
	TT	21	9		
rs4906683	GG	126	50	0.2084 HWE สมดุล	0.4032
	AG	110	44		
	AA	15	6		
rs2081648	GG	76	30	0.1977 HWE สมดุล	0.4902
	AG	134	57		
	AA	41	13		

โดยสลิปส์แต่ละตำแหน่งศึกษาในกลุ่มควบคุมจำนวน 251 ราย

P_HWD: ค่า P ของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg *P*-value)

HET: ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity)

การศึกษาความถี่อัลลีลของสไนป์สแต่ละตำแหน่งบนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม เทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์หาความถี่ของอัลลีลในกลุ่มผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุม พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสไนป์ส rs4542636 ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P = 0.004018$; $df = 1$) เมื่อพิจารณาความถี่ของอัลลีลของสไนป์สตำแหน่งดังกล่าว พบความถี่ของอัลลีล C (major allele) ในกลุ่มผู้ป่วยมากถึงร้อยละ 80 ขณะที่พบความถี่ของอัลลีล C ในกลุ่มควบคุมร้อยละ 71 และไม่พบความสัมพันธ์ข้างต้นของสไนป์สตำแหน่งอื่นๆ จากการศึกษาพบความถี่ของอัลลีล A (major allele) ของสไนป์ส rs4906902 ในกลุ่มผู้ป่วยร้อยละ 65 และกลุ่มควบคุมร้อยละ 69 พบความถี่ของอัลลีล G (major allele) ของสไนป์ส rs20317 ร้อยละ 67 ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมพบร้อยละ 69 ของสไนป์ส rs3212333 พบความถี่ของอัลลีล C (major allele) ในกลุ่มผู้ป่วยร้อยละ 65 และกลุ่มควบคุมร้อยละ 68 สไนป์ส rs1367959 พบความถี่ของอัลลีล C (major allele) ร้อยละ 65 ในกลุ่มผู้ป่วยและในกลุ่มควบคุมร้อยละ 64 สไนป์ส rs4906683 พบความถี่ของอัลลีล G (major allele) ในกลุ่มผู้ป่วยร้อยละ 76 และกลุ่มควบคุมร้อยละ 72 และพบความถี่ของอัลลีล G (major allele) ของสไนป์ส rs2081648 ในผู้ป่วยร้อยละ 63 และกลุ่มควบคุมร้อยละ 57 จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าความถี่ของอัลลีลที่พบในสองกลุ่มประชากรมีค่าใกล้เคียงกันมาก ยกเว้นความถี่ของอัลลีลของสไนป์ส rs4542636 ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24. ความถี่อัลลีลของสโนิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม PLINK ที่มีค่า degree of freedom เท่ากับ 1

สโนิปส์	อัลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi-square	P-value
		จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่		
rs4906902	A	187	0.649	345	0.687	1.198	0.2737 (NS)
	G	101	0.351	157	0.313		
rs20317	G	194	0.674	344	0.685	0.1143	0.7353 (NS)
	C	94	0.326	158	0.315		
rs3212333	C	188	0.653	343	0.683	0.772	0.3796 (NS)
	G	100	0.347	159	0.317		
rs1367959	C	188	0.653	320	0.637	0.1873	0.6652 (NS)
	T	100	0.347	182	0.363		
rs4542636	C	231	0.802	356	0.709	8.276	0.004018 ***
	T	57	0.198	146	0.291		
rs4906683	G	220	0.764	362	0.721	1.726	0.1889 (NS)
	A	68	0.236	140	0.279		
rs2081648	G	181	0.628	286	0.570	2.614	0.106 (NS)
	A	107	0.372	216	0.430		

โดยสโนิปส์แต่ละตำแหน่งศึกษาจากผู้ป่วยทั้งหมด 144 ราย และกลุ่มควบคุม 251 ราย

อธิบายสัญลักษณ์

*** = Significance

NS = Non Significance

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสโนิปส์ rs4542636 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของสโนิปส์ตำแหน่งอื่นๆ

การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์หาความถี่ของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วย เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (จำนวน 144 ราย) ผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม (จำนวน 121 ราย) และผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (จำนวน 121 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (จำนวน 251 ราย) โดยกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีผลจีโนไทป์ครบทุกรายคิดเป็นร้อยละ 100 ($N = 144$) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs20317 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.04087$; $df = 2$) และกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.03549$; $df = 2$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการพิจารณาความถี่ของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม พบความถี่ของจีโนไทป์แบบ CG มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความถี่ของจีโนไทป์แบบอื่น ๆ ในกลุ่มควบคุมพบความถี่ของจีโนไทป์แบบ GG มากที่สุด และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs3212333 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.028$; $df = 2$) และกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.04175$; $df = 2$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบความถี่ของจีโนไทป์แบบ CG ในผู้ป่วยออทิซึมมากที่สุด ส่วนในกลุ่มควบคุมพบความถี่ของจีโนไทป์แบบ CC มากที่สุด และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs4542636 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.01347$; $df = 2$) และกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.03217$; $df = 2$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อพิจารณาความถี่ของจีโนไทป์ในผู้ป่วยออทิซึม และกลุ่มควบคุม พบความถี่ของจีโนไทป์แบบ CC มากที่สุดเช่นกัน แต่มีความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์แบบ CC ในทั้งสองกลุ่ม คือ พบความถี่ของจีโนไทป์แบบ CC ในผู้ป่วยออทิซึมเท่ากับ 0.65 และกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.50 (ดังแสดงในตารางที่ 25, 26 และ 27)

ตารางที่ 25. ความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน GABRB3 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม PLINK ที่มีค่า degree of freedom เท่ากับ 2

สไนป์ส	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi-square	P-value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
rs4906902	AA	56	0.39	119	0.47	3.357	0.1866 (NS)
	AG	75	0.52	107	0.43		
	GG	13	0.09	25	0.10		
rs20317	GG	59	0.41	121	0.48	6.394	0.04087 ***
	CG	76	0.53	102	0.41		
	CC	9	0.06	28	0.11		
rs3212333	CC	54	0.38	119	0.47	7.151	0.0280 ***
	CG	80	0.55	105	0.42		
	GG	10	0.07	27	0.11		
rs1367959	CC	59	0.41	97	0.39	0.2178	0.8968 (NS)
	CT	70	0.49	126	0.50		
	TT	15	0.10	28	0.11		
rs4542636	CC	94	0.65	126	0.50	8.615	0.01347 ***
	CT	43	0.30	104	0.41		
	TT	7	0.05	21	0.09		
rs4906683	GG	83	0.58	126	0.50	2.043	0.3600 (NS)
	AG	54	0.37	110	0.44		
	AA	7	0.05	15	0.06		
rs2081648	GG	54	0.38	76	0.30	2.855	0.2400 (NS)
	AG	73	0.51	134	0.53		
	AA	17	0.11	41	0.17		

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส rs20317, rs3212333 และ rs4542636 บนยีน GABRB3 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และไม่พบความสัมพันธ์ของสไนป์สตำแหน่งอื่นๆ

ตารางที่ 26. ความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออกทีซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม PLINK ที่มีค่า degree of freedom เท่ากับ 2

สลิปส์	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi-square	P-value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
rs4906902	AA	46	0.38	119	0.49	4.045	0.1323 (NS)
	AG	65	0.54	107	0.40		
	GG	10	0.08	25	0.11		
rs20317	GG	49	0.40	121	0.48	6.677	0.03549 ***
	CG	65	0.54	102	0.41		
	CC	7	0.06	28	0.11		
rs2312333	CC	46	0.38	119	0.47	6.352	0.04175 ***
	CG	67	0.53	105	0.42		
	GG	8	0.09	27	0.11		
rs1367959	CC	46	0.38	97	0.39	0.02159	0.9893 (NS)
	CT	61	0.50	126	0.50		
	TT	14	0.12	28	0.11		
rs4542636	CC	78	0.64	126	0.51	6.874	0.03217 ***
	CT	37	0.31	104	0.40		
	TT	6	0.05	21	0.09		
rs4906683	GG	71	0.59	126	0.50	2.356	0.3079 (NS)
	AG	44	0.36	110	0.44		
	AA	6	0.05	15	0.06		
rs2081648	GG	40	0.33	76	0.30	1.064	0.5875 (NS)
	AG	66	0.55	134	0.53		
	AA	15	0.12	41	0.17		

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs20317, rs3212333 และ rs4542636 บนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออกทีซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม และไม่พบความสัมพันธ์ของสลิปส์ตำแหน่งอื่นๆ

ตารางที่ 27. ความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม PLINK ที่มีค่า degree of freedom เท่ากับ 2

สลิปส์	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		Chi-square	P-value
		จำนวน (ราย)	ความถี่	จำนวน (ราย)	ความถี่		
rs4906902	AA	46	0.38	119	0.47	3.559	0.1687 (NS)
	AG	64	0.53	107	0.43		
	GG	11	0.09	25	0.10		
rs20317	GG	50	0.41	121	0.48	4.058	0.1315 (NS)
	CG	62	0.51	102	0.41		
	CC	9	0.08	28	0.11		
rs2312333	CC	47	0.39	119	0.47	4.796	0.09089 (NS)
	CG	65	0.54	105	0.42		
	GG	9	0.07	27	0.11		
rs1367959	CC	50	0.41	97	0.39	0.2984	0.8614 (NS)
	CT	59	0.49	126	0.51		
	TT	12	0.10	28	0.10		
rs4542636	CC	75	0.63	126	0.50	4.6200	0.09927 (NS)
	CT	39	0.32	104	0.41		
	TT	7	0.05	21	0.09		
rs4906683	GG	66	0.55	126	0.50	0.6357	0.7277 (NS)
	AG	48	0.39	110	0.44		
	AA	7	0.06	15	0.06		
rs2081648	GG	41	0.34	76	0.30	0.857	0.6515 (NS)
	AG	64	0.53	134	0.53		
	AA	16	0.13	41	0.17		

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสลิปส์ทุกตำแหน่งบนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *GABRB3* ในกลุ่มผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ genetic model แบบต่าง ๆ

จากการศึกษาความถี่ของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยที่แบ่งตามลักษณะทางฟีโนไทป์เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ genetic model แบบต่าง ๆ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์ rs4542636 เมื่อทำการวิเคราะห์ผลแบบ Additive model ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.004903$; $df = 1$) ผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.01173$; $df = 1$) และผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 ($P = 0.04108$; $df = 1$) เทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลแบบ dominant model พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.003875$; $df = 1$) ผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.009989$; $df = 1$) และผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 ($P = 0.033240$; $df = 1$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์ผลแบบ recessive model (ดังแสดงในตารางที่ 32) และไม่พบความสัมพันธ์ข้างต้นของสลิปส์ตำแหน่งอื่นๆ ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในตารางที่ 28, 29, 30, 31, 33 และ 34)

ตารางที่ 28. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สนิปส์ rs4906902 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.2627 (NS)	0.1014 (NS)	0.7624 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมดเพศ (121)	0.2812 (NS)	0.08825 (NS)	0.6002 (NS)
ผู้ป่วยที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.2354 (NS)	0.08825 (NS)	0.7906 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณ ค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ

additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG และ ½ ของ GA เปรียบเทียบกับ AA และ ½ ของ GA

dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA เปรียบเทียบกับ GG, AG

recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ AA, AG

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสนิปส์ rs4906902 ในผู้ป่วยออทิซึมทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม

ตารางที่ 29. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สหิปส์ rs20317 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.7305 (NS)	0.1651 (NS)	0.1120 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมด (121)	0.7440 (NS)	0.1625 (NS)	0.1024 (NS)
ผู้ป่วยที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.6624 (NS)	0.2125 (NS)	0.2649 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ

additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง CC และ ½ ของ CG เปรียบเทียบกับ GG และ ½ ของ CG

dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ CC, CG

recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง CC เปรียบเทียบกับ GG, CG

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสหิปส์ rs20317 ในผู้ป่วยออทิซึมทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 30. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่โนไทป์ในรูปแบบ model ของ สนิปส์ rs3212333 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.3645 (NS)	0.05659 (NS)	0.2142 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมด (121)	0.4622 (NS)	0.08825 (NS)	0.2038 (NS)
ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.4651 (NS)	0.1201 (NS)	0.3131 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณ ค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ

additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG และ ½ ของ CG เปรียบเทียบกับ CC และ ½ ของ CG

dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง CC เปรียบเทียบกับ GG, CG

recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ CC, CG

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสนิปส์ rs3212333 ในผู้ป่วยออทิซึมทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม

ตารางที่ 31. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สหิปส์ rs1367959 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.6517 (NS)	0.6489 (NS)	0.8206 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมด (121)	0.8848 (NS)	0.9070 (NS)	0.9057 (NS)
ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.5853 (NS)	0.6208 (NS)	0.7182 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณ ค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง TT และ ½ ของ CT เปรียบเทียบกับ CC และ ½ ของ CT dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง CC เปรียบเทียบกับ TT, CT recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง TT เปรียบเทียบกับ CC, CT

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ในสหิปส์ rs1367959 ในผู้ป่วยออทิซึม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 32. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สหิปส์ rs4542636 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.004903 ***	0.003875 ***	0.1966 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมด (121)	0.011730 ***	0.009989 ***	0.2405 (NS)
ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.04108 ***	0.033240 ***	0.3793 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณ ค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ

additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง TT และ ½ ของ CT เปรียบเทียบกับ CC และ ½ ของ CT

dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง CC เปรียบเทียบกับ TT, CT

recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง TT เปรียบเทียบกับ CC, CT

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่ของจีโนไทป์ในสหิปส์ rs4542636 ในผู้ป่วยออทิซึมทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ผลแบบ additive model และ dominant model ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในการวิเคราะห์แบบ recessive model

ตารางที่ 33. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สหิปส์ rs4906683 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.1739 (NS)	0.1544 (NS)	0.6424 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมด (121)	0.1550 (NS)	0.1255 (NS)	0.6908 (NS)
ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.4985 (NS)	0.4322 (NS)	0.9417 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณ ค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ

additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA และ ½ ของ AG เปรียบเทียบกับ GG และ ½ ของ AG

dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ AA, AG

recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA เปรียบเทียบกับ GG, AG

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่ของจีโนไทป์ในสหิปส์ rs4906683 ในผู้ป่วย ออทิซึมทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 34. ค่า *P*-value จากการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในรูปแบบ model ของ สหิปส์ rs2081648 บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรม PLINK (df = 1)

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	<i>P</i> -value		
	additive model	dominant model	recessive model
ผู้ป่วยทั้งหมด (144)	0.09208 (NS)	0.1422 (NS)	0.2228 (NS)
ผู้ป่วยชายทั้งหมด (121)	0.35870 (NS)	0.5879 (NS)	0.3212 (NS)
ผู้ป่วยทั้งหมดที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (121)	0.36160 (NS)	0.4831 (NS)	0.4359 (NS)

*หมายเหตุ การวิเคราะห์ในรูปแบบ model โดยใช้โปรแกรม PLINK โปรแกรมทำการคำนวณ ค่า minor allele (G) และ major allele (A) เพื่อใช้ในการคำนวณ คือ

additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA และ ½ ของ AG เปรียบเทียบกับ GG และ ½ ของ AG

dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง GG เปรียบเทียบกับ AA, AG

recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง AA เปรียบเทียบกับ GG, AG

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ในสหิปส์ rs2081648 ในผู้ป่วยออทิซึม ทุกกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Family based association โดยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม

การประมวลผลจีโนมไทป์ในตัวอย่างครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม พบครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีผลจีโนมไทป์ครบทุกรายคิดเป็นร้อยละ 100 (N = 363 ประกอบด้วยพ่อ แม่ ลูก คิดเป็น 121 ครอบครัว) จากการวิเคราะห์การถ่ายทอดอัลลีลในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม โดยโปรแกรม PLINK ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการถ่ายทอดอัลลีลบนสไนป์สทุกตำแหน่งในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม (ดังแสดงในตารางที่ 35)

ตารางที่ 35. ค่า *P*-value ของการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ส rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 บนยีน *GABRB3* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม PLINK

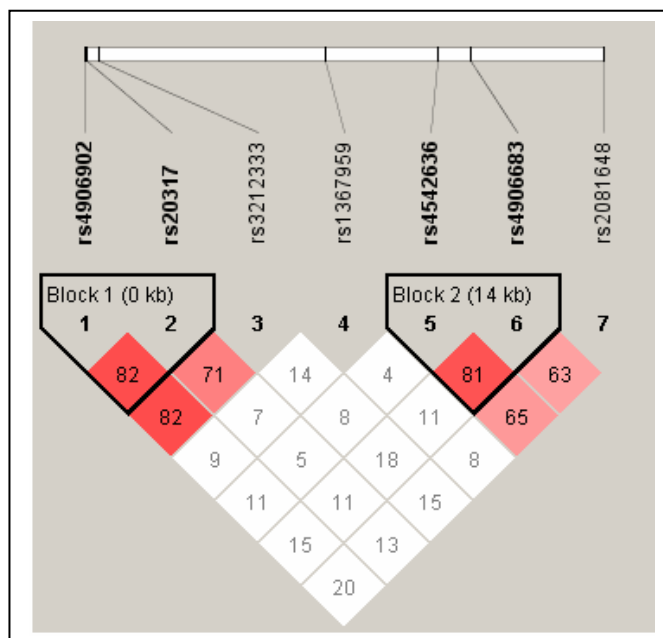
สไนป์ส	อัลลีล	ถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (จำนวนอัลลีล)	Chi square	<i>P</i> -value
rs4906902	G:A	62:51	1.0710	0.3008 (NS)
rs20317	C:G	62:63	0.0080	0.9287 (NS)
rs2312333	G:C	60:56	0.1379	0.7103 (NS)
rs1367959	T:C	61:57	0.1356	0.7127 (NS)
rs4542636	T:C	43:49	0.3913	0.5316 (NS)
rs4906683	A:G	53:60	0.4336	0.5102 (NS)
rs2081648	A:G	63:73	0.7353	0.3912 (NS)

*คำอธิบาย ถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (62:51) คือ ถ่ายทอดอัลลีล G แต่ไม่ถ่ายทอดอัลลีล A เท่ากับ 62 และถ่ายทอดอัลลีล A แต่ไม่ถ่ายทอดอัลลีล G เท่ากับ 51

ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการถ่ายทอดอัลลีลในสไนป์สทุกตำแหน่งในครอบครัวผู้ป่วยทั้งหมด ($P > 0.05$)

การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) ของสไนป์บนยีน **GABRB3**

การวิเคราะห์หา Linkage disequilibrium (LD) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลที่อยู่คนละตำแหน่งบนโครโมโซมเดียวกัน ซึ่งมีโอกาสที่จะถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นหนึ่งด้วยกัน ปรากฏการณ์ที่พบสไนป์หลายตำแหน่งถูกถ่ายทอดไปด้วยกันในกลุ่มประชากรบ่อยกว่าการที่พบโดยบังเอิญ เรียกกลุ่มสไนป์เหล่านี้ว่ามี Linkage disequilibrium ต่อกัน ดังนั้น การศึกษาแอสโพลไทป์จึงมีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับการเกิดโรค มากกว่าการศึกษาสไนป์แค่ตำแหน่งเดียว การศึกษาครั้งนี้สนใจศึกษาการถ่ายทอดสไนป์แอสโพลไทป์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม โดยใช้โปรแกรม Haploview จากการศึกษาพบแอสโพลไทป์บล็อก 2 ตำแหน่ง คือ แอสโพลไทป์บล็อกที่หนึ่งประกอบด้วยสไนป์ rs4906902 และ rs20317 มีความยาวประมาณ 831 เบส และแอสโพลไทป์บล็อกที่สองประกอบด้วยสไนป์ rs4542636 และ rs4906683 มีความยาวประมาณ 16 กิโลเบส ดังรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 42 และตารางที่ 36 จากการศึกษาพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดแอสโพลไทป์แบบ AC ของสไนป์ rs4906902 และ rs20317 จากพ่อหรือแม่มาสู่ลูกที่เป็นโรค เมื่อเปรียบเทียบกับความถี่ของแอสโพลไทป์แบบอื่นๆ เนื่องจากพบความถี่ของแอสโพลไทป์ข้างต้นในผู้ป่วยออทิซึมน้อย ดังนั้นความสัมพันธ์ที่พบข้างต้นอาจเกิดขึ้นได้โดยบังเอิญ



รูปที่ 42. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD) บนยีน **GABRB3** ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม Haploview การถ่ายทอดไปด้วยกันพิจารณาจากค่า $D' \geq 0.8$

ตารางที่ 36. ความถี่ของแฮพโลไทป์บนยีน *GABRB3* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม Haploview v4.0

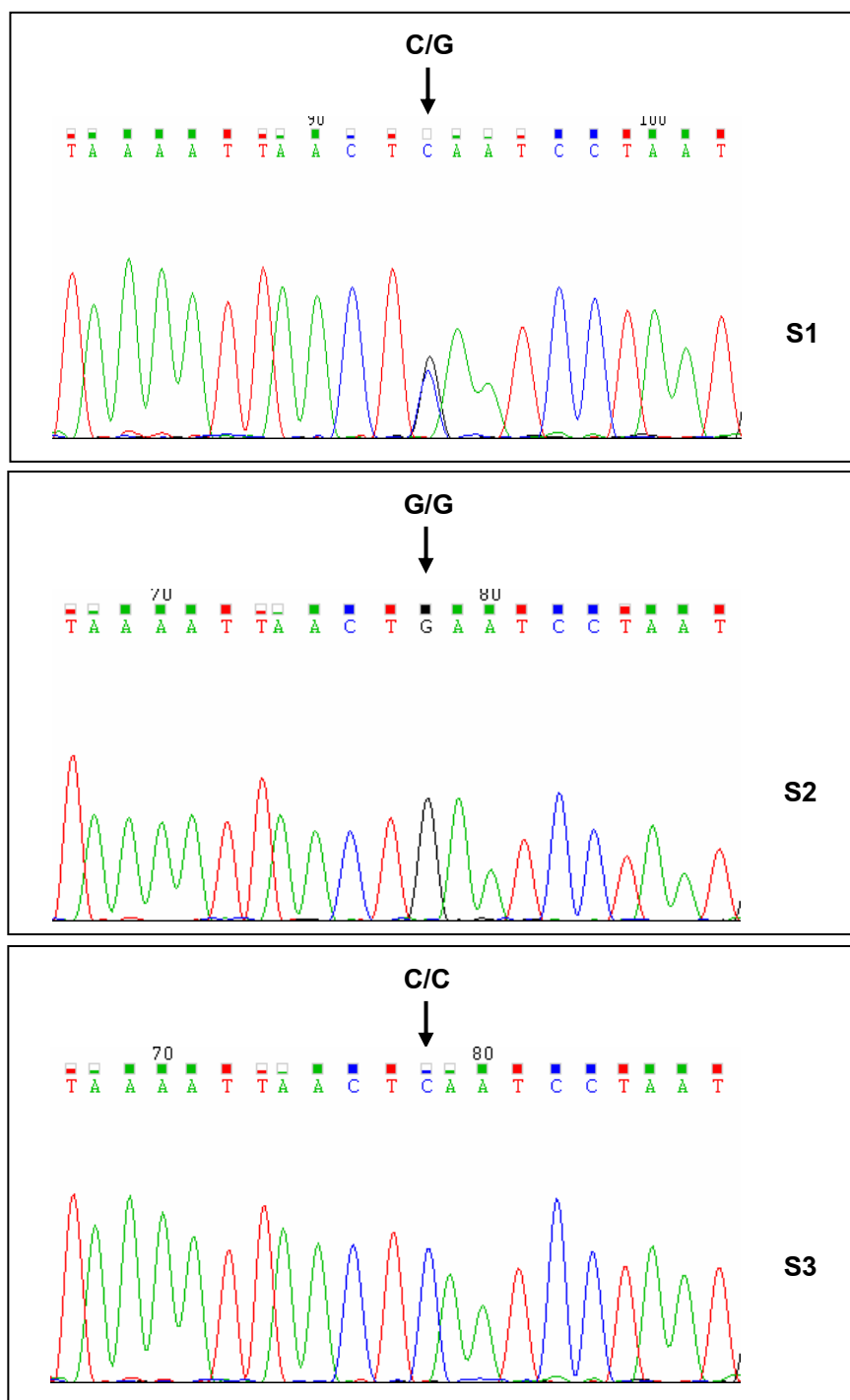
บล็อก	แฮพโลไทป์	ความถี่	ความถี่ของการถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด	Chi-Square	P-value
1 (902-317)	AG	0.621	59.9:60.0	0	0.9952
	GC	0.295	58.9:49.0	0.914	0.3389
	GG	0.046	12.1:11.0	0.049	0.8244
	AC	0.038	4.1:15.0	6.263	0.0123 ***
2 (636-683)	CG	0.700	59.4:51.4	0.577	0.4474
	TA	0.189	37.4:42.4	0.313	0.5759
	CA	0.081	18.6:20.6	0.102	0.7491
	TG	0.030	6.6:7.6	0.071	0.7901

1. โดยสนิปส์แฮพโลไทป์แต่ละตำแหน่งศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยทั้งหมด 144 ครอบครัว
2. การจัดเรียงของสนิปส์ในแฮพโลไทป์ 902-317 คือ สนิปส์ rs4906902-rs20317 และ 636-683 คือ สนิปส์ rs4542636-rs4906683

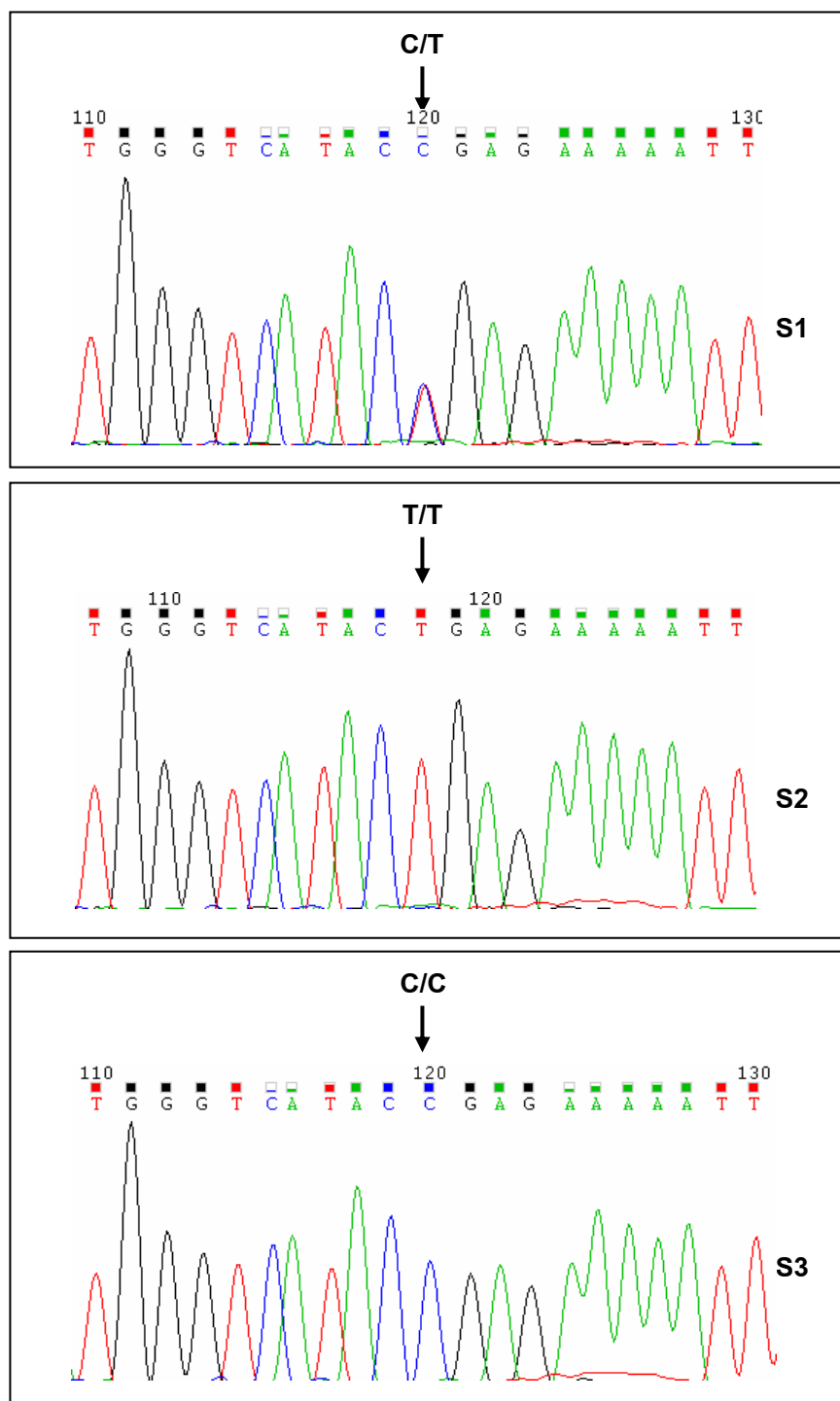
พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดแฮพโลไทป์แบบ AC ของสนิปส์ตำแหน่ง rs4906902 และ rs20317 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม ($P = 0.0123$)

การยืนยันผลการศึกษานิวไทป์ของสนิปส์แต่ละตำแหน่ง

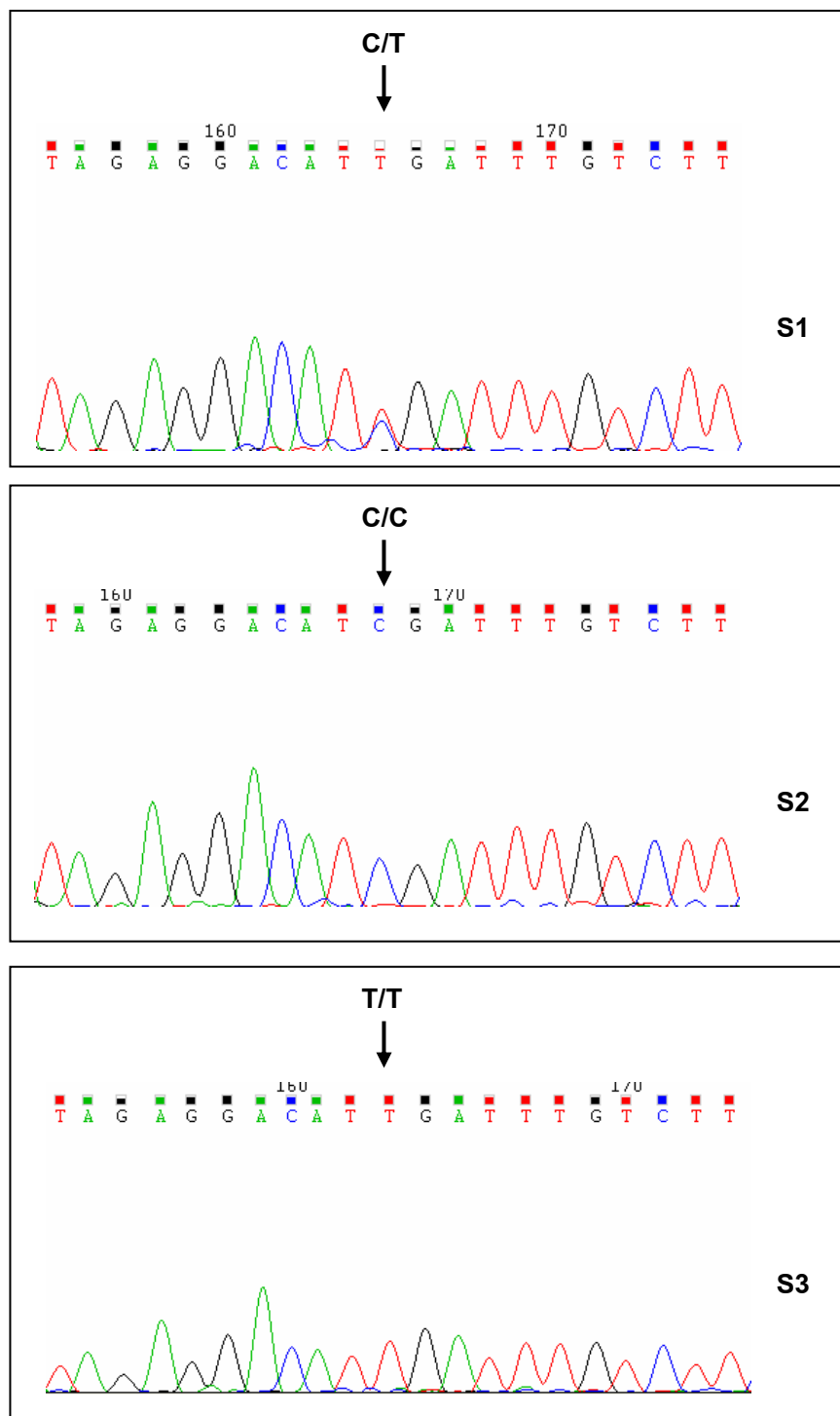
การศึกษานิวไทป์ของสนิปส์แต่ละตำแหน่งใช้วิธีไบอัลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ หรือวิธีพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี เพื่อยืนยันถึงความถูกต้องในการอ่านผลจึงทำการทดสอบซ้ำด้วยวิธีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยเลือกตัวอย่างผู้ป่วยหรือกลุ่มควบคุมที่มีผลจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส และโฮโมไซกัสทั้งสองแบบ มาทำการศึกษาซ้ำพบผลการศึกษานิวไทป์ตรงกับผลการทดสอบลำดับดีเอ็นเอของสนิปส์ทุกตำแหน่ง (ดังแสดงในรูปที่ 43-45) นอกจากนี้ทำการเปรียบเทียบผลการศึกษานิปส์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม nucleotide blast; blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบผลถูกต้องตรงกันตาม Accession No. NT_026446



รูปที่ 43. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริเวณสหนิปส์ rs3212333 ตัวอย่าง S1 เป็นตัวอย่างผู้ป่วยออกซิซึมที่มีอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ C/G และตัวอย่าง S2 และ S3 เป็นตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีลเป็นโฮโมไซกัสแบบ G/G และ C/C ตามลำดับ



รูปที่ 44. อิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริเวณสลิปส์ rs1367959 ตัวอย่าง S1 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย ออทิซึมที่มีอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ C/T และตัวอย่าง S2 และ S3 เป็นตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีลเป็นโฮโมไซกัสแบบ T/T และ C/C ตามลำดับ



รูปที่ 45. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมบริเวณสลิปส์ rs4542636 ตัวอย่าง S1 เป็นตัวอย่างผู้ป่วย ออทิซึมที่มีอัลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ C/T และตัวอย่าง S2 และ S3 เป็นตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีลเป็นโฮโมไซกัสแบบ C/C และ T/T ตามลำดับ

บทที่ 4 บทวิจารณ์

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม

จากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมจำนวน 128 ราย พบการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง cDNA 430 จากเบสกวานีนเป็นเบสไทมีน (c.430G>T) และส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่ง 144 จากอะลานีนเป็นเซอรีน (p.A144S) ในผู้ป่วยออทิซึม 1 ราย (TM34-3) ประวัติของผู้ป่วย คือ ผู้ป่วยเป็นลูกคนเดียว ประวัติการตั้งครรภ์ของแม่ปกติ คลอดด้วยการผ่าตัดคลอดเพราะขนาดทารกไม่เหมาะสมกับเชิงกราน น้ำหนักแรกคลอด 3,380 กรัม แรกคลอดปกติดี คว้าได้ตอนอายุ 4 เดือน นั่งได้ อายุ 6 เดือน ยืนได้อายุ 1 ปี เดินได้อายุ 2 ปี 8 เดือน พูดคำแรกอายุ 3 ปี 3 เดือน ผู้ป่วยไม่มีลักษณะใบหน้าผิดปกติ ไม่เคยชัก แพทย์วินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมจาก DSM-IV และมีภาวะปัญญาอ่อนระดับน้อย (IQ = 64) จากการตรวจสอบระดับสติปัญญาโดยไม่ใช้ภาษา (non verbal IQ test, Binet-V) นอกจากนี้ผู้ป่วยมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติทั้งขนาดเส้นรอบศีรษะ น้ำหนัก และส่วนสูง (< 3 percentile)

เนื่องจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T ไม่มีรายงานมาก่อน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการผ่าเหล่าใหม่ (mutation) หรือเป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้น้อย (rare polymorphism) จึงศึกษาการถ่ายทอดนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง c.430G>T ในครอบครัวผู้ป่วย พบนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง c.430 ในแม่เป็นแบบ heterozygous (มีจีโนไทป์แบบ G/T) แสดงว่าผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอด c.430G>T มาจากแม่ ส่วนญาติคนอื่นๆ ปฏิเสธการตรวจ จึงไม่สามารถตรวจการถ่ายทอดนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งข้างต้นว่าได้รับมาจากตาหรือยาย และน้องสาวของแม่มีนิวคลีโอไทด์แบบ c.430G>T ในตำแหน่งนี้หรือไม่ (ดังแสดงในรูปที่ 33) การศึกษาการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์แบบ c.430G>T ในคนปกติจำนวน 500 อัลลีล โดยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (ดังแสดงในรูปที่ 34) ไม่พบการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ c. 430G>T นี้ในคนปกติ

การจำลองการ Alignments โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนไป (p.A144S) ซึ่งอยู่ในตำแหน่งแรกบน polyalanine tract ที่ 2 ของโปรตีน ARX ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายสปีชีส์ พบกรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวตรงกันในสัตว์ชั้นสูงทุกสปีชีส์ (สุนัข, rat, mouse) แต่ใน zebrafish, Xenopus และ fly orthologs ไม่มี polyalanine tract ตรงกับมนุษย์ (Gecz et al., 2006; Gronskov et al.,

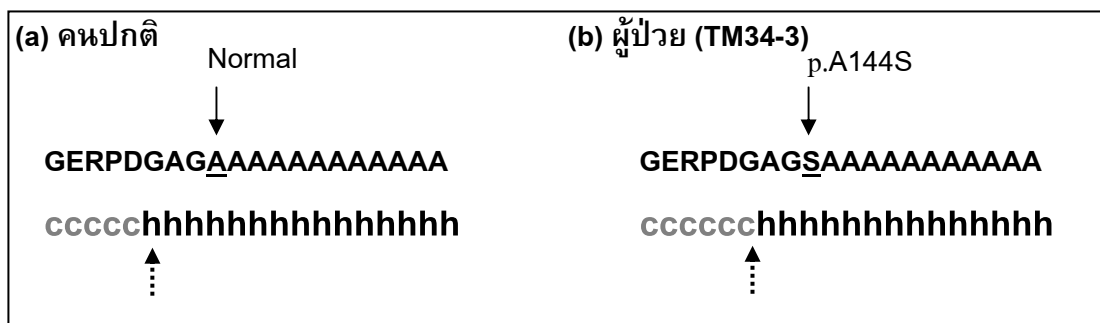
2004) (ดังแสดงในรูปที่ 46) แสดงว่า polyalanine tract ในตำแหน่งข้างต้นเป็นกรดอะมิโนอนุรักษ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงน่าจะมีความสำคัญต่อหน้าที่ของโปรตีน

Polyalanine tract 2	
H. sapiens (Normal)	ERPDGAGAAAAAAAAAAAAAWD
C. familiaris	ERQDSAGAVAAAAAAAAAWDTL
M. musculus	ERQDSAGAVAAAAAAAAAWDTLK
R. Norvegicus	ERPDGAGAAVPAAAAAAAAAWD

↑

รูปที่ 46. แสดงการเปรียบเทียบกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่ง 144 (ลูกศรชี้) ของ Polyalanine tract ที่ 2 ของโปรตีน ARX ใน คน สุนัข หนู (rat และ mouse)

การจำลองโครงสร้างตติยภูมิ (3-Dimension protein) ของโปรตีน ARX ที่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนอะลานีนเป็นเซอรีน (p.A144S) โดยใช้โปรแกรม ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>) เนื่องจากโปรแกรมไม่สามารถจำลองโครงสร้างโปรตีนในตำแหน่งดังกล่าวได้ จึงไม่เห็นความแตกต่างของโครงสร้างโปรตีนที่พบ p.A144S ข้างต้น ต่อมาจึงศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ (2-Dimension Protein) ของโปรตีน ARX โดยโปรแกรม GOR IV secondary structure prediction method (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi/bin/npsa_automat.plpage=/NPSA/npsa_seccons.html) พบโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ARX ที่พบ p.A144S ในผู้ป่วยแตกต่างจากคนปกติ (ดังแสดงในรูปที่ 47) คือ โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนในคนปกติมีโครงสร้างแบบ Helix ตั้งแต่กรดอะมิโนไกลซีน (Gly) (ในตำแหน่ง 141; ลูกศรประ) แต่โปรตีนของผู้ป่วย (TM34-3) มีโครงสร้างแบบ Helix ในตำแหน่งกรดอะมิโนอะลานีน (Ala) ซึ่งอยู่ถัดไปอีกหนึ่งตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่าโปรตีน ARX ของผู้ป่วยมีโครงสร้างแบบ Helix สั้นลงหนึ่งตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำหน้าที่ของโปรตีน ARX ที่พบ p.A144S ข้างต้น



รูปที่ 47. แสดงแบบจำลองโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ARX (รูปแสดงโครงสร้างกรดอะมิโนเพียงบางส่วน) (a) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ARX ในคนปกติ (b) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ARX ในผู้ป่วย (TM34-3) พบลำดับกรดอะมิโนของคนปกติมีโครงสร้างแบบ Helix ตั้งแต่กรดอะมิโนไกลซีน (Gly) ในตำแหน่ง 141 (ลูกศรประ) แต่กรดอะมิโนของผู้ป่วย (TM34-3) มีโครงสร้างแบบ Helix ในตำแหน่งกรดอะมิโนอะลานีน (Ala) ซึ่งอยู่ถัดไปอีกหนึ่งตำแหน่ง (142) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน ARX ของผู้ป่วย มีโครงสร้างแบบ Helix ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ

* หมายเหตุ อักษร c แทนโครงสร้างแบบ Coil และอักษร h แทนโครงสร้างแบบ Helix

มีรายงานการศึกษาการทำงานของโปรตีน ARX โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนจากอะลานีนเป็นเซอรีนในตำแหน่ง polyalanine tract ที่ 4 ของโปรตีน ARX ซึ่งเป็นตำแหน่งกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserve amino acid) พบการทำงานของโปรตีน ARX ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (transcription repression) ลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการทำงานของโปรตีน ARX ปกติ และพบว่าทำให้ polyalanine tract ที่ 1 และ 2 ขาดหายไป (deletion) ไม่มีผลต่อหน้าที่ของโปรตีน ARX (McKenzie et al., 2007) เป็นที่ทราบกันว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากอะลานีนเป็นเซอรีนอาจส่งผลให้เกิดตำแหน่ง Phosphorylation ขึ้นใหม่ในตำแหน่งเซอรีน (Ilyas et al., 1997) จึงจำลองตำแหน่ง Phosphorylation ของโปรตีน ARX ที่พบ p.A144S โดยใช้โปรแกรม PredPhospho (<http://pred.ngri.re.kr/PredPhospho.htm>) ไม่พบตำแหน่งที่เกิดกระบวนการ Phosphorylation ขึ้น บนโปรตีน ARX ที่พบ p.A144S (ดังแสดงในรูปที่ 48)

(a) คนปกติ	Normal	
	↓	
Query	GAG <u>A</u> AAAAAA AAAAAWDTLK ISQAPQVSIS	170
Phospho_site		P P PP 170
(b) ผู้ป่วย (TM34-3)	p.A144S	
	↓	
Query	GAG <u>S</u> AAAAAA AAAAAWDTLK ISQAPQVSIS	170
Phospho_site		P P PP 170

รูปที่ 48. แสดงแบบจำลองการเกิด Phosphorylation ในโปรตีน ARX บริเวณ polyalanine tract 2 รูป (a) และ (b) แสดงตำแหน่งที่เกิดกระบวนการ Phosphorylation ของโปรตีน ARX ในคนปกติ และในผู้ป่วย (TM34-3) ตามลำดับ ซึ่งไม่พบตำแหน่งที่เกิด Phosphorylation ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 144 แม้จะมีการมีการเปลี่ยนจากกรดอะลานีนเป็นเซอรีน (p.A144S)

การศึกษาพบการกลายพันธุ์แบบ c.428_451 dup เป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยออทิซึมที่มีภาวะปัญญาอ่อนร่วมด้วย (Stromme et al., 2002; Nawara et al., 2006) แต่มีรายงานไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน ARX ในผู้ป่วยออทิซึมชายจำนวน 226 ราย (Chaste et al., 2006) ส่วนในประเทศไทยมีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน ARX ในผู้ป่วยที่มีพัฒนาการช้าจำนวน 251 ราย พบการกลายพันธุ์แบบ c.428_451 dup ในเอกซอน 2 ของยีน ARX ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย (common mutation) ในผู้ป่วย 2 ราย (Rujirabanjerd et al., 2007) เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีน ARX ส่งผลต่อการเกิดโรคหรือความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน บางกรณีการผ่าเหล่าแบบเดียวกันอาจส่งผลต่ออาการของโรคต่างกัน (Gezc et al., 2006) แสดงว่าการเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาอาจส่งผลต่อการพบการกลายพันธุ์แบบต่างๆ บนยีน ARX จากข้อมูลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงนี้สรุปได้ดังตารางที่ 37 ผลการศึกษายังไม่สามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ c.430G>T (p.A144S) เป็นการผ่าเหล่าใหม่หรือเป็นความแปรผันหลากหลายที่พบได้น้อย จึงต้องมีผลการศึกษาการทำงานของโปรตีน ARX ที่พบ p.A144S ข้างต้นเสียก่อน และอาจศึกษากระบวนการเกิด Phosphorylation ในโปรตีน ARX เพื่อหาข้อสรุปการศึกษาที่ชัดเจนมากขึ้น

ตารางที่ 37. แสดงผลการศึกษา ยีน *ARX* ที่พบ c.430G>T (p.A144S) ในผู้ป่วย (TM34-3)

การศึกษา	Variant ที่พบ c.430G>T (p.A144S)
1. การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน	เปลี่ยนกรดอะมิโนอะลานีนเป็นเซอรีนในตำแหน่ง 144 (p.A144S)
2. ตำแหน่งกรดอะมิโนอนุรักษ์ในลำดับขั้นสูง	ใช่
3. ศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว	แม่เป็นแบบ heterozygous (มีจีโนไทป์ในแม่เป็น G/T) และถ่ายทอด c.430G>T มาสู่ลูก
4. การศึกษาในกลุ่มประชากรทั่วไป	ไม่พบ c.430G>T ในคนปกติจำนวน 500 อัลลีล

การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัด คือ ไม่ได้ตรวจกรองการกลายพันธุ์ที่พบได้น้อยในตำแหน่งโปรโมเตอร์ และเอกซอน 1, 3, 4, 5 ของยีน *ARX* แต่อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์บริเวณเอกซอน 2 ของยีน *ARX* พบได้น้อยในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ดังนั้น ยีน *ARX* จึงไม่ใช่ยีนอันดับต้นๆ ในการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม

การเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรม

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาสลิปส์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง โดยสลิปส์ 3 ตำแหน่งแรก คือ rs4906902, rs4906901 และ rs20317 อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *GABRB3* เลือกตามการศึกษาของ Urak และคณะ (2006) ที่ศึกษาสลิปส์จำนวน 14 ตำแหน่ง กระจายบนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยโรค Childhood absence epilepsy (CAE) จำนวน 50 ครอบครัว ที่มีลูกเป็นโรคเพียงหนึ่งคน พบสลิปส์แฮพโลไทป์บางแบบของสลิปส์ทั้งสามตำแหน่งข้างต้นมีผลลดกลไกการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ในเซลล์ เนื่องจากอินทรอน 3 ของยีน *GABRB3* มีขนาดใหญ่ และพบความสัมพันธ์ระหว่างสลิปส์ตำแหน่งนี้กับภาวะออทิซึม ดังนั้นในการศึกษาจึงเลือกศึกษาสลิปส์ให้กระจายในอินทรอน 3 จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ สลิปส์ตำแหน่งที่ 4 rs3212333 อยู่ตอนต้นบนอินทรอน 3 เลือกตามการศึกษาของ Curran และคณะ (2006) ที่ศึกษาสลิปส์บนยีน *GABRB3* ในครอบครัวที่มีลูกเป็นโรคเพียงหนึ่งคนจำนวน 123 ครอบครัว และครอบครัวที่มีลูกเป็นโรคตั้งแต่สองคนขึ้นไปจำนวน 25 ครอบครัว ผลการศึกษาพบสลิปส์ตำแหน่งข้างต้นมีค่า P -value เข้าใกล้ 0.05 ($P = 0.088$) สลิปส์ตำแหน่งที่ 5 คือ rs1367959 อยู่กลางอินทรอน 3 เลือกตามการศึกษาของ Curran เช่นกัน สลิปส์ตำแหน่งที่ 6 คือ rs4542636 อยู่บนปลายอินทรอน 3 เลือกตามการศึกษาของ McCauley และคณะ (2004) ที่ศึกษาสลิปส์บนยีน *GABRB3*, *GABRA5* และ *GABRG3* ในผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 123 ครอบครัว ที่มีลูกเป็นโรคตั้งแต่สองคนขึ้นไป พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสลิปส์ตำแหน่งนี้กับภาวะออทิซึม ($P = 0.03$) สลิปส์ตำแหน่งที่ 7 คือ rs4906683 อยู่ในอินทรอน 4 เลือกตามการศึกษาของ Curran ซึ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสลิปส์ตำแหน่งนี้กับภาวะออทิซึม ($P = 0.01$) สลิปส์ตำแหน่งสุดท้าย (ตำแหน่งที่ 8) คือ rs2081648 อยู่ในอินทรอน 8 เลือกตามการศึกษาของ Kim และคณะ (2006) ที่ศึกษาสลิปส์จำนวน 4 ตำแหน่งบนยีน *GABRB3* ใน 104 ครอบครัวชาวเกาหลีที่มีลูกเป็นโรคเพียงหนึ่งคน พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสลิปส์ตำแหน่งนี้เท่านั้นกับภาวะออทิซึม ($P = 0.027$) โดยสลิปส์ทั้งหมดที่เลือกศึกษาคาดว่าครอบคลุมทั่วทั้งยีน *GABRB3* จากการศึกษาสลิปส์ rs4906901 (A/C) จำนวน 100 อัลลีล พบสลิปส์ตำแหน่งนี้ไม่มี ความแปรผันหลากหลาย (Non-polymorphic) ในคนไทย คือ พบเฉพาะอัลลีล A เท่านั้น (ไม่พบอัลลีล G) จึงไม่ทำการศึกษาสลิปส์ตำแหน่งนี้ต่อไป ดังนั้นจำนวนสลิปส์ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดจึงเหลือแค่ 7 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 8

วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ (Association study)

ในการศึกษาคั้งนี้เลือกวิธีการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ 2 แบบ คือ Population base case control และ Family based association ซึ่งสองวิธีข้างต้นมีประโยชน์ในการศึกษาโรคหรือภาวะที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น โรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากยีนหลายยีน ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม หรือทั้งสองปัจจัยร่วมกัน

การศึกษาแบบ Population base case control เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับโรค โดยเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีล หรือความถี่ของจีโนไทป์ในประชากรที่เป็นโรคเทียบกับประชากรปกติ หากความถี่ของอัลลีลหรือจีโนไทป์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนยีนตำแหน่งนั้นๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 อาจบ่งชี้ว่าตำแหน่งของเครื่องหมายทางพันธุกรรมนี้ใกล้เคียงกับตำแหน่งของยีนที่อาจก่อโรค ซึ่งการศึกษาข้างต้นจำเป็นต้องใช้กลุ่มควบคุมที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย เช่น กลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ศึกษาเป็นคนภาคกลาง ในการศึกษาจึงเลือกกลุ่มควบคุมส่วนใหญ่เป็นคนภาคกลางเช่นกัน ส่วนอายุของกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาที่แตกต่างกับกลุ่มผู้ป่วยไม่มีผลต่อการทดสอบ เนื่องจากอายุไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ แต่ถ้าการศึกษาเลือกกลุ่มควบคุมกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรม เชื้อชาติ เพศที่แตกต่างกันมาก ผลการศึกษาที่ได้อาจพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเกิดจากผลบวกปลอมได้ (false positive)

การศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว Family based association โดยใช้วิธี Transmission Linkage Disequilibrium Test (TDT) วิธีการนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่มีการถ่ายทอดรวมไปกับยีนที่อาจก่อให้เกิดโรค โดยการศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายพันธุกรรมในครอบครัวที่เป็นโรคเทียบกับค่าความคาดหวัง เนื่องจากวิธีการนี้ไม่ใช้กลุ่มควบคุม จึงช่วยลดปัญหาการพบผลบวกปลอมได้ รวมทั้งผลการศึกษาสามารถบอกว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนยีนที่เลือกศึกษานั้น มีความสัมพันธ์และถ่ายทอดไปกับยีนที่ก่อโรคด้วย

การกระจายความถี่ของอัลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่ง

การศึกษาคั้งนี้ พิจารณาความแตกต่างของความถี่อัลลีลของสไนป์ส์ทุกตำแหน่ง โดยศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มประชากรเอเชียด้วยกัน (จีนและญี่ปุ่น) และกลุ่มเชื้อชาติที่แตกต่างกัน (ยุโรปและแอฟริกา) ดังแสดงในตารางที่ 38 และ 39 จากการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีลในคนไทยกับคนจีน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสไนป์ส์ทุกตำแหน่ง ($P > 0.05$) อาจจะเนื่องจากคนไทยมีบรรพบุรุษส่วนหนึ่งที่อพยพมาจากประเทศจีนจึงมีเชื้อสาย

ใกล้เคียงกัน แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีลระหว่างคนไทยกับคนญี่ปุ่นของสไนป์ส์ rs1367959 จากการศึกษาความถี่อัลลีลในคนไทย พบค่า MAF(T) เท่ากับ 0.347 แตกต่างจากการรายงานที่พบในคนญี่ปุ่น MAF(T) เท่ากับ 0.216 และสไนป์ส์ rs2081648 พบความถี่อัลลีลในคนไทยมีค่า MAF(A) เท่ากับ 0.372 แตกต่างจากการรายงานที่พบในคนญี่ปุ่น MAF(A) เท่ากับ 0.260 อาจเป็นเพราะกลุ่มที่ใช้ในการศึกษามีเชื้อชาติแตกต่างกัน และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสไนป์ส์ตำแหน่งอื่นๆ ส่วนการเปรียบเทียบความถี่ของอัลลีลในคนไทยกับคนยุโรป และคนแอฟริกา ส่วนมากมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสไนป์ส์เกือบทุกตำแหน่ง เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นคนละเชื้อชาติ และอาจมีปัจจัยในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาร่วมด้วย

ตารางที่ 38. ความถี่อัลลีลของสไนป์สในแต่ละเชื้อชาติ

กลุ่มประชากร	rs4906902		rs4906901*		rs20317		rs3212333		rs1367959		rs4542636		rs4906683		rs2081648	
	A	G	A	C	G	C	C	G	C	T	C	T	G	A	G	A
คนไทย (2008) การศึกษาครั้งนี้	0.649	0.351	1.000	0.000	0.674	0.326	0.653	0.347	0.653	0.347	0.802	0.198	0.764	0.236	0.628	0.372
คนจีน	0.689	0.311	-	-	-	-	-	-	0.733	0.267	0.789	0.211	0.786	0.214	0.690	0.310
คนญี่ปุ่น	0.656	0.344	-	-	-	-	-	-	0.784	0.216	0.844	0.156	0.830	0.170	0.740	0.260
คนยุโรป	0.724	0.276	-	-	-	-	0.835	0.165	0.692	0.308	0.579	0.421	0.567	0.433	0.825	0.175
คนแอฟริกา (Sub-Saharan)	1.000	0.000	-	-	-	-	-	-	1.000	0.000	0.814	0.186	-	-	-	-

- ข้อมูลความถี่ของสไนป์สในคนจีน คนญี่ปุ่น คนยุโรป และคนแอฟริกา (Sub-Saharan) อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI

- สไนป์ส rs4906901 และ rs20317 ไม่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI

* จากการศึกษาสไนป์ส rs4906901 ในคนไทย จำนวน 100 อัลลีล ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม พบเฉพาะอัลลีล A เท่านั้น

ตารางที่ 39. การเปรียบเทียบความถี่อัลลีลแต่ละเชื้อชาติ ระหว่างคนไทย (2008) คนจีน คนญี่ปุ่น คนยุโรป และคนแอฟริกา ของสไนป์ส์ rs4906902, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648

ประชากร	rs4906902		rs3212333		rs1367959		rs4542636		rs4906683		rs2081648	
	Chi square	P-value	Chi square	P-value	Chi square	P-value	Chi square	P-value	Chi square	P-value	Chi square	P-value
คนไทย (2008) เปรียบเทียบกับคนจีน	0.7098	0.3995	-	-	3.51998	0.06063	1.6966	0.19273	0.15219	0.69653	1.6830	0.19452
คนไทย (2008) เปรียบเทียบกับคนญี่ปุ่น	0.0007	0.9789	-	-	10.603	0.00112 ***	1.47041	0.22528	2.5513	0.11020	6.28898	0.01215 ***
คนไทย (2008) เปรียบเทียบกับคนยุโรป	2.7404	0.0978	24.841	0.00001 ***	0.8276	0.36296	20.0368	0.00000 ***	16.7849	0.00004 ***	26.3376	0.0000 ***
คนไทย (2008) เปรียบเทียบกับคนแอฟริกา	116.767	0.0000 ***	-	-	121.917	0.0000 ***	0.12945	0.71905	-	-	-	-

* แสดงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์บนยีน *GABRB3* ในผู้ป่วยออทิซึม

สไนป์ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 7 ตำแหน่ง คือ rs4906902 และ rs20317 บริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ สไนป์ rs3212333, rs1367959 และ rs4542636 ในอินทรอน 3 สไนป์ rs4906683 ในอินทรอน 4 และสไนป์ rs2081648 ในอินทรอน 8 ของยีน *GABRB3* จากการศึกษาพบกลุ่มควบคุมมีความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ทุกตำแหน่งเป็นตามทฤษฎีสมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($P\text{-value} > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 23 เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพว่าไม่มีประชากรที่มีความถี่ของจีโนไทป์แตกต่างกันมากจนทำให้ไม่เข้าสู่ภาวะสมดุลได้ การศึกษาแบ่งผู้ป่วยออทิซึมออกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามลักษณะทางคลินิก ได้แก่ ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดจำนวน 144 ราย ผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมจำนวน 121 ราย และผู้ป่วยที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 (แบ่งตามระดับสติปัญญาแบบไม่ใช้ภาษา) จำนวน 121 ราย กลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 251 ราย และครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดจำนวน 121 ครอบครัว เพื่อให้ทราบถึงลักษณะทางฟีโนไทป์ที่อาจสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมได้ชัดเจนมากขึ้น ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับผู้ป่วยออทิซึม ใช้ 2 วิธีในการ คือ Population base case control และ Family based association โดยใช้วิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT)

จากการศึกษาแบบ Population base case control โดยใช้สไนป์ 7 ตำแหน่งในยีน *GABRB3* เปรียบเทียบความถี่อัลลีล หรือความถี่จีโนไทป์ และการศึกษาโดยใช้โมเดลแบบต่างๆ เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่อัลลีลในสไนป์ rs4542636 (C/T) ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.004018$; $df = 1$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในตารางที่ 24) โดยพบค่า minor allele frequency (MAF) ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม MAF(T) เท่ากับ 0.198 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่พบค่า MAF(T) เท่ากับ 0.291 และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของ สไนป์ ตำแหน่งนี้ในผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.01347$; $df = 2$) และกลุ่มผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.03217$; $df = 2$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในตารางที่ 25 และ 26) โดยพบความถี่จีโนไทป์แบบ CC ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมเท่ากับ 0.65 และในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.50 เมื่อพิจารณาความถี่จีโนไทป์โดยใช้โมเดลทางสถิติแบบต่างๆ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยทำการวิเคราะห์ผลแบบ dominant model (ความถี่จีโนไทป์แบบ major homozygous เทียบกับผลรวมของความถี่จีโนไทป์แบบ heterozygous และ minor homozygous) ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.003875$; $df = 1$) ผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.009989$; $df = 1$) และผู้ป่วยออทิซึมที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 ($P = 0.033240$; $df = 1$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลแบบ additive model (ผลรวมของความถี่จีโนไทป์แบบ major homozygous และ

ครึ่งหนึ่งของ heterozygous เทียบกับผลรวมของความถี่จีโนไทป์แบบ minor homozygous และครึ่งหนึ่งของ heterozygous) ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.004903$; $df = 1$) ผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.011730$; $df = 1$) และผู้ป่วยออทิซึมที่มี non-verbal IQ น้อยกว่า 80 ($P = 0.04108$; $df = 1$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์แบบ recessive model (ดังแสดงในตารางที่ 32)

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ในสไนปส์ rs20317 (C/G) ในผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.04087$; $df = 2$) และผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.03549$; $df = 2$) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในตารางที่ 25 และ 26) โดยพบความถี่จีโนไทป์แบบ CG ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมมากที่สุด ส่วนในกลุ่มควบคุมพบความถี่จีโนไทป์แบบ GG มากที่สุด ไม่พบความสัมพันธ์เมื่อทำการวิเคราะห์ความถี่อัลลีล และการใช้โมเดลแบบต่างๆ แสดงว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ของสไนปส์ rs20317 บนยีน *GABRB3* ที่พบข้างต้น อาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญ และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสไนปส์ rs3212333 (C/G) ในผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ($P = 0.028$; $df = 2$) และผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม ($P = 0.04175$; $df = 2$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในตารางที่ 25 และ 26) โดยพบความถี่จีโนไทป์แบบ CG ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมมากที่สุด ในกลุ่มควบคุมพบความถี่จีโนไทป์แบบ CC มากที่สุด และไม่พบความสัมพันธ์ข้างต้นเมื่อวิเคราะห์ความถี่อัลลีล หรือการใช้โมเดลแบบต่างๆ เนื่องจากพบเฉพาะความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความสัมพันธ์เมื่อทำการวิเคราะห์ผลแบบอื่นๆ แสดงว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่จีโนไทป์ของสไนปส์ rs3212333 บนยีน *GABRB3* ที่พบข้างต้น อาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญเช่นกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างสไนปส์บนยีน *GABRB3* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม

จากการศึกษาข้างต้น พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่อัลลีล และความถี่จีโนไทป์ของสไนปส์ rs4542636 (C/T) ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อศึกษาสไนปส์ตำแหน่งดังกล่าวในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 121 ครอบครัว ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนปส์ตำแหน่งนี้ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม โดยพบการถ่ายทอดอัลลีล C และอัลลีล T จากพ่อหรือแม่มาสู่ลูกที่เป็นโรคในอัตราส่วนใกล้เคียงกัน เนื่องจากการศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมใช้วิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) ซึ่งวิธีการนี้เลือกศึกษาเฉพาะพ่อหรือแม่ที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous เท่านั้น (ส่วนพ่อหรือแม่ที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous ไม่สามารถนำมาคำนวณหาความสัมพันธ์ได้ เพราะไม่ทราบว่ายีนอัลลีลไหนถ่ายทอดไปให้ลูก) จึงทำให้จำนวนครอบครัวที่นำมาใช้ในการศึกษาลดลง ส่งผลให้อาจไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในครอบครัว

ออทิซึมคนไทย แต่การศึกษาของ McCauley และคณะ (2004) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่งนี้ใน 123 ครอบครัวของผู้ป่วยออทิซึม ($P = 0.03$) โดยพบการถ่ายทอดอัลลีล C (อ่านสไนป์ส์จากเส้น forward จาก 5' ไป 3') จากพ่อหรือแม่ไปสู่ลูกที่มีภาวะออทิซึมมากกว่าการถ่ายทอดอัลลีล T ผลการศึกษาข้างต้นที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของเชื้อชาติ และลักษณะของครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ การศึกษาของ McCauley ใช้ครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่มีลูกเป็นโรคตั้งแต่สองคนขึ้นไป (multiplex families) แต่การศึกษานี้ใช้ครอบครัวออทิซึมที่มีลูกเป็นโรคเพียงคนเดียว (Simplex families) การศึกษาในอนาคตควรเพิ่มจำนวนครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมเพื่อเพิ่ม Power ในการคำนวณมากขึ้น เนื่องจากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์ rs4542636 ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสไนป์ส์ rs4542636 บนยีน *GABRB3* สัมพันธ์กับเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม

การศึกษานี้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์ rs20317 (C/G) และ rs3212333 (C/G) ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อศึกษา สไนป์ส์ตำแหน่งดังกล่าวในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ส์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม เพราะพบการถ่ายทอดอัลลีลทั้งสองแบบจากพ่อหรือแม่มาสู่ลูกที่เป็นโรคในอัตราส่วนใกล้เคียงกัน ลักษณะนี้คล้ายกับการศึกษาของ Curran และคณะ (2006)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์ส์บนยีน *GABRB3* กับครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมในชาวเอเชียมีไม่มากนัก แต่มีการศึกษาพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ส์ rs2081648 ในครอบครัวออทิซึมชาวเกาหลีที่มีลูกผู้ป่วยเป็นโรคเพียงหนึ่งคนจำนวน 104 ครอบครัว ($P = 0.027$) (Kim et al., 2006) แตกต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของสไนป์ส์ rs2081648 (G/A) ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม กล่าวคือไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่อัลลีล หรือความถี่จีโนไทป์ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้จากการศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่งนี้ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมคนไทย ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่งนี้จากพ่อหรือแม่ไปสู่ลูกที่เป็นโรค เนื่องจากไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษาสไนป์ส์ rs2081648 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมคนไทย แต่พบความสัมพันธ์นี้ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมชาวเกาหลี แม้ว่ากลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจะมีเชื้อชาติเอเชียเช่นกัน และจำนวนครอบครัวใกล้เคียงกัน แสดงว่าการเลือกกลุ่มตัวอย่างมีผลต่อการศึกษา เนื่องจากการเกิดภาวะออทิซึมมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกับสิ่งแวดล้อม และมียีนหลายตำแหน่งสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม เช่น ยีน *RELN* (Skaar et al., 2005) ยีน *MET* (Campbell et al., 2006) เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างสไนป์สแฮพโพลไทป์บนยีน *GABRB3* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม

การวิเคราะห์สไนป์สแฮพโพลไทป์ มีความน่าเชื่อถือมากกว่าการวิเคราะห์สไนป์สเพียงตำแหน่งเดียว ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาสไนป์สแฮพโพลไทป์ที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันบนยีน *GABRB3* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม จากการศึกษาพบแฮพโพลไทป์บล็อก 2 ตำแหน่ง บล็อกแรกพบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *GABRB3* ประกอบด้วยสไนป์ส rs4906902 และ rs20317 และบล็อกที่สองอยู่ในอินทรอน 3 ถึงอินทรอน 4 ของ ประกอบด้วยสไนป์ส rs4542636 และ rs4906683 ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 42) จากการศึกษาพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดแฮพโพลไทป์บล็อกแบบ AC ของสไนป์สตำแหน่ง rs4906902 และ rs20317 ตามลำดับ (บริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *GABRB3*) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม ($P = 0.0123$) เนื่องจากพบการถ่ายทอดแฮพโพลไทป์แบบ AC จากพ่อหรือแม่ไปสู่ลูก 5 ราย ซึ่งน้อยมาก แฮพโพลไทป์ข้างต้นอาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญ และต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ดีขึ้น

จากการศึกษาของ Urak และคณะ (2006) พบแฮพโพลไทป์แบบ CTG ของสไนป์ส rs4906902, rs4906901 และ rs20317 ตามลำดับ บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *GABRB3* มีผลลดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ในเซลล์ที่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรค Childhood absence epilepsy โดยพบอัลลีล C ของสไนป์ส rs4906902 (C/T) ทำให้โปรโมเตอร์สูญเสียความสามารถในการจับกับ transcription activator (N-Oct-3) ซึ่งทำหน้าที่จำเพาะในระบบประสาท (Urak et al., 2006) จึงทำการเปรียบเทียบสไนป์สแฮพโพลไทป์ดังกล่าวกับการศึกษาครั้งนี้ จากผลการศึกษาพบสไนป์ส rs4906901 ซึ่งอยู่ตรงกลางระหว่างสไนป์ส rs4906902 และ rs20317 มีผลการศึกษาเป็น Non-polymorphic (พบเฉพาะอัลลีล A) จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลการศึกษาทั้งสองกลุ่มได้ การศึกษาสไนป์ส rs4906902 ซึ่งอ่านผลอัลลีลเป็น C/T บนสาย reverse ตามการศึกษาของ Urak และคณะ (2006) ตรงกับการศึกษาครั้งนี้ซึ่งอ่านผลอัลลีลเป็น G/A บนสาย forward จากการศึกษาสไนป์ส rs4906902 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมคนไทยพบการถ่ายทอดอัลลีล G จำนวน 62 ครั้ง จากพ่อหรือแม่ไปสู่ลูกมากกว่าการถ่ายทอดอัลลีล A ที่พบจำนวน 51 ครั้ง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์สตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าผู้ป่วยออทิซึมส่วนมากมีอัลลีล G ในสไนป์ส rs4906902 ซึ่งอาจสอดคล้องกับการศึกษาข้างต้น (Urak et al., 2006) ในอนาคตอาจเพิ่มจำนวนครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมเพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ดังกล่าวให้มีความน่าเชื่อถือทางสถิติมากขึ้น

บทที่ 5

บทสรุป

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน *ARX* ในผู้ป่วยชายที่ได้รับ การวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมจำนวน 128 ราย พบการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์จากกวานีนเป็นไทมีนใน cDNA ตำแหน่ง 430 (c.430G>T) และส่งผลให้เปลี่ยนกรดอะมิโนจากอะลานีนเป็นเซอรินใน ตำแหน่ง 144 (p.A144S) ในผู้ป่วยออทิซึม 1 ราย (TM34-3) ผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอด c.430G>T มาจากแม่ที่ปกติ แต่ไม่พบ c.430G>T นี้ในคนปกติจำนวน 500 อัลลีล เนื่องจากการ เปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ c.430G>T ยังไม่มีการรายงานมาก่อน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นการผ่า เหล่าใหม่หรือเป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบบ่อย จนกว่าจะมีการตรวจการ ทำงานของโปรตีน *ARX* ที่พบ p.A144S ข้างต้นเสียก่อน แต่อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าการ ผ่าเหล่าบริเวณเอกซอน 2 ของยีน *ARX* พบได้น้อยในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึม

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *GABRB3* กับผู้ป่วยออทิซึม โดยใช้สไนป์ 7 ตำแหน่ง ครอบคลุมทั่วทั้งยีน *GABRB3* ตั้งแต่ตำแหน่งโปรโมเตอร์จนถึงอินทรอน 8 ประกอบด้วยสไนป์ rs4906902, rs20317, rs3212333, rs1367959, rs4542636, rs4906683 และ rs2081648 เป็นระยะทางประมาณ 220 กิโลเบส พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ ความถี่อัลลีล และความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ rs4542636 ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุม และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ rs20317 และ rs3212333 ในผู้ป่วยออทิซึมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน แต่จากการศึกษาการ ถ่ายทอดในครอบครัวไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติในการถ่ายทอดอัลลีลของสไนป์ทุก ตำแหน่งในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่ายีน *GABRB3* สัมพันธ์กับเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึม แต่ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยและครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่มากขึ้น เพื่อให้ได้ความน่า เชื่อทางสถิติที่ดีขึ้น

รายการเอกสารอ้างอิง

- วสันต์ จันทราทิตย์, ชลภัทร สุขเกษม และสุรัคเมธ มหาศิริมงคล. 2551. วิเคราะห์เจาะลึกจีโนมมนุษย์ด้วยชีวสารสนเทศ Use of Bioinformatics for Extensive Genome Analysis. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท กราฟิคฮัท จำกัด: กรุงเทพฯ.
- Abrahams, B. S. and Geschwind, D. H. 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 9(5): 341-355.
- Aldred, S., Moore, K. M., Fitzgerald, M. and Waring, R. H. 2003. Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *J Autism Dev Disord.* 33(1): 93-97.
- Ashley-Koch, A. E., Mei, H., Jaworski, J., Ma, D. Q., Ritchie, M. D., Menold, M. M., Delong, G. R., Abramson, R. K., Wright, H. H., Hussman, J. P., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., Martin, E. R. and Pericak-Vance, M. A. 2006. An analysis paradigm for investigating multi-locus effects in complex disease: examination of three GABA receptor subunit genes on 15q11-q13 as risk factors for autistic disorder. *Ann Hum Genet.* 70(Pt 3): 281-292.
- Auranen, M., Nieminen, T., Majuri, S., Vanhala, R., Peltonen, L. and Jarvela, I. 2000. Analysis of autism susceptibility gene loci on chromosomes 1p, 4p, 6q, 7q, 13q, 15q, 16p, 17q, 19q and 22q in Finnish multiplex families. *Mol Psychiatry.* 5(3): 320-322.
- Barrett, S., Beck, J. C., Bernier, R., Bisson, E., Braun, T. A., Casavant, T. L., Childress, D., Folstein, S. E., Garcia, M., Gardiner, M. B., Gilman, S., Haines, J. L., Hopkins, K., Landa, R., Meyer, N. H., Mullane, J. A., Nishimura, D. Y., Palmer, P., Piven, J., Purdy, J., Santangelo, S. L., Searby, C., Sheffield, V., Singleton, J., Slager, S. and et al. 1999. An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism. *Am J Med Genet.* 88(6): 609-615.
- Bass, MP., Menold, MM., Wolpert, CM., Donnelly, SL., Ravan, SA., Hauser, ER., Maddox, LO., Vance, JM., Abramson, RK., Wright, HH., Gilbert, JR., Cuccaro, ML., DeLong, GR. and Pericak-Vance, M. 2000. studies in autistic disorder and chromosome 15. *Neurogenetics.* 2(4): 219-226.
- Battaglia, A. 2005. The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev.* 27(5): 365-369.

- Blatt, G. J., Fitzgerald, C. M., Guptill, J. T., Booker, A. B., Kemper, T. L. and Bauman, M. L. 2001. Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study. *J Autism Dev Disord.* 31(6): 537-543.
- Buxbaum, JD., Silverman, JM., Smith, CJ., Greenberg, DA., Kilifarski, M., Reichert, J., EH Cook, Jr., Fang, Y., Song, C-Y. and Vitale, R. 2002. Association between a *GABRB3* polymorphism and autism. *Mol Psychiatry.* 7(3): 311-316.
- 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 U S A.* 103(45): 16834-16839.
- Chaste, P., Nygren, G., Anckarsater, H., Rastam, M., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C. and Betancur, C. 2007. Screening of the ARX Gene in Patients with Autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144B(2): 228-230.
- Collins, A. L., Ma, D., Whitehead, P. L., Martin, E. R., Wright, H. H., Abramson, R. K., Hussman, J. P., Haines, J. L., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R. and Pericak-Vance, M. A. 2006. Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. *Neurogenetics.* 7(3): 167-174.
- Cook, E. H., Jr., Lindgren, V., Leventhal, B. L., Courchesne, R., Lincoln, A., Shulman, C., Lord, C. and Courchesne, E. 1997. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet.* 60(4): 928-934.
- Curran S, P. J., Neale, B M., Dworzynski, K., Li, T., Murphy, D. and Bolton, PF. 2006. An asociation analysis of candidate genes on chromosome 15 q11-13 and autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 11(8): 709-713.
- De Souza Gestinari-Duarte, R., Santos-Reboucas, C. B. and Pimentel, M. M. 2006. Mutational screening of ARX gene in Brazilian males with mental retardation of unknown etiology. *J Hum Genet.* 51(8): 737-740.
- Dhossche, D., Applegate, H., Abraham, A., Maertens, P., Bland, L., Bencsath, A. and Martinez, J. 2002. Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism. *Med Sci Monit.* 8(8): 1-6.
- Di Cristo, G. 2007. Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clin Genet.* 72(1): 1-8.

- Dick, D. M., Edenberg, H. J., Xuei, X., Goate, A., Kuperman, S., Schuckit, M., Crowe, R., Smith, T. L., Porjesz, B., Begleiter, H. and Foroud, T. 2004. Association of GABRG3 with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 28(1): 4-9.
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D. and Thuras, P. D. 2009. GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J Autism Dev Disord.* 39(2): 223-230.
- Feucht, M., Fuchs, K., Pichlbauer, E., Hornik, K., Scharfetter, J., Goessler, R., Fureder, T., Cvetkovic, N., Sieghart, W., Kasper, S. and Aschauer, H. 1999. Possible association between childhood absence epilepsy and the gene encoding GABRB3. *Biol Psychiatry.* 46(7): 997-1002.
- Fombonne, E. 2003. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J Autism Dev Disord.* 33(4): 365-382.
- Fombonne, E. 2005. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry.* 66 Suppl 10: 3-8.
- Freitag, C. M. 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry.* 12(1): 2-22.
- Gécz, J., Cloosterman, D. and Partington, M. 2006. ARX: a gene for all seasons. *Curr Opin Genet Dev.* 16(3): 308-316.
- Glatt, K., Glatt, H. and Lalande, M. 1997. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics.* 41(1): 63-69.
- Grønskov, K., Hjalgrim, H., Nielsen, IM. and Brøndum-Nielsen, K. 2004. Screening of the ARX gene in 682 retarded males. *Eur J Hum Genet.* 12(9): 701-705.
- Guerrini, R., Moro, F., Kato, M., Barkovich, A. J., Shiihara, T., McShane, M. A., Hurst, J., Loi, M., Tohyama, J., Norci, V., Hayasaka, K., Kang, U. J., Das, S. and Dobyns, W. B. 2007. Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus. *Neurology.* 69(5): 427-433.
- Hashemi, E., Sahbaie, P., Davies, M. F., Clark, J. D. and DeLorey, T. M. 2007. Gabrb3 gene deficient mice exhibit increased risk assessment behavior, hypotonia and expansion of the plexus of locus coeruleus dendrites. *Brain Res.* 1129(1): 191-199.
- Hempelmann, A., Cobilanschi, J., Heils, A., Muhle, H., Stephani, U., Weber, Y., Lerche, H. and Sander, T. 2007. Lack of evidence of an allelic association of a functional

- GABRB3 exon 1a promoter polymorphism with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* 74(1): 28-32.
- Hogart, A., Nagarajan, R. P., Patzel, K. A., Yasui, D. H. and LaSalle, J. M. 2007. 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet.* 16(6): 691-703.
- Hussman, JP. 2001. Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. *J Autism Dev Disord.* 31(2): 247-248.
- Ilyas, M., Tomlinson, I. P., Rowan, A., Pignatelli, M. and Bodmer, W. F. 1997. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(19): 10330-10334.
- Inoue, H., Kayano, S., Aoki, Y., Kure, S., Yamada, A., Hata, A., Matsubara, Y. and Suzuki, Y. 2008. Association of the GABRB3 gene with nonsyndromic oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 45(3): 261-266.
- Jacob, T. C., Moss, S. J. and Jurd, R. 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci.* 9(5): 331-343.
- John Wiley & Sons, I. H. A., Cobilanschi, J., Heils, A., Muhle, H., Stephani, U., Weber, Y., Lerche, H. and Sander, T. 2007. Lack of evidence of an allelic association of a functional GABRB3 exon 1a promoter polymorphism with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* 74(1): 28-32.
- Kato, M., Das, S., Petras, K., Kitamura, K., Morohashi, K., Abuelo, D. N., Barr, M., Bonneau, D., Brady, A. F., Carpenter, N. J., Ciperio, K. L., Frisone, F., Fukuda, T., Guerrini, R., Iida, E., Itoh, M., Lewanda, A. F., Nanba, Y., Oka, A., Proud, V. K., Saugier-Verber, P., Schelley, S. L., Selicorni, A., Shaner, R., Silengo, M., Stewart, F., Sugiyama, N., Toyama, J., Toutain, A., Vargas, A. L., Yanazawa, M., Zackai, E. H. and Dobyns, W. B. 2004. Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 23(2): 147-159.
- Kim, S. A., Kim, J. H., Park, M., Cho, I. H. and Yoo, H. J. 2006. Association of GABRB3 polymorphisms with autism spectrum disorders in Korean trios. *Neuropsychobiology.* 54(3): 160-165.
- Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., Matsuo, M., Kamijo, S.,

- Kasahara, M., Yoshioka, H., Ogata, T., Fukuda, T., Kondo, I., Kato, M., Dobyns, W. B., Yokoyama, M. and Morohashi, K. 2002. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet.* 32(3): 359-369.
- Koochek, M., Harvard, C., Hildebrand, MJ., Van Allen, M., Wingert, H., Mickelson, E., Holden, JJ., Rajcan-Separovic, E. and Lewis, ME. 2006. 15q duplication associated with autism in a multiplex family with a familial cryptic translocation t(14;15)(q11.2;q13.3) detected using array-CGH. *Clinical genetics.* 69(2): 124-134.
- Laurie, DJ., Wisden, W. and Seeburg, PH. 1992. The Distribution of Thirteen GABA_A Receptor Subunit mRNAs in the Rat Brain. III. Embryonic and Postnatal Development. *J Neurosci.* 12(11): 4151-4172.
- Lavoute, C., Weiss, M. and Rostain, J. C. 2008. Alterations in nigral NMDA and GABA_A receptor control of the striatal dopamine level after repetitive exposures to nitrogen narcosis. *Exp Neurol.* 212(1): 63-70.
- Licinio, J. and I, I. A. 2002. Progress in the genetics of autism. *Mol Psychiatry.* 7(3): 229.
- Lord, C., Cook, E. H., Leventhal, B. L. and Amaral, D. G. 2000. Autism spectrum disorders. *Neuron.* 28(2): 355-363.
- Lu, J. J., Zhang, Y. H., Pan, H., Chen, Y. C., Liu, X. Y., Jiang, Y. W., Bao, X. H., Shen, Y., Wu, H. S., Xu, K. M. and Wu, X. R. 2004. Case-control study and transmission/disequilibrium tests of the genes encoding GABRA5 and GABRB3 in a Chinese population affected by childhood absence epilepsy. *Chin Med J (Engl).* 117(10): 1497-1501.
- Ma, DQ., Whitehead, PL., Menold, MM., Martin, ER., Ashley-Koch, AE., Mei, H., Ritchie, MD., DeLong, Abramson, RK., Wright, HH., Cuccaro, ML., Hussman, JP., Gilbert, JR. and Pericak-Vance, MA. 2005. Identification of Significant Association and Gene-Gene Interaction of GABA Receptor Subunit Genes in Autism. *Am J Hum Genet.* 77(3): 377-388.
- Maddox, L. O., Menold, M. M., Bass, M. P., Rogala, A. R., Pericak-Vance, M. A., Vance, J. M. and Gilbert, J. R. 1999. Autistic disorder and chromosome 15q11-q13: construction and analysis of a BAC/PAC contig. *Genomics.* 62(3): 325-331.
- Maestrini E, L. C., Marlow, A., Matthews, N., Wallace, S., Bailey, A., Cook, EH., Weeks, DE. and Monaco, AP. 1999. Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-

- aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Am J Med Genet.* 88(5): 492-496.
- Martin, E. R., Menold, M. M., Wolpert, C. M., Bass, M. P., Donnelly, S. L., Ravan, S. A., Zimmerman, A., Gilbert, J. R., Vance, J. M., Maddox, L. O., Wright, H. H., Abramson, R. K., DeLong, G. R., Cuccaro, M. L. and Pericak-Vance, M. A. 2000. Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. *Am J Med Genet.* 96(1): 43-48.
- Massat, I., Souery, D., Del-Favero, J., Oruc, L., Noethen, M. M., Blackwood, D., Thomson, M., Muir, W., Papadimitriou, G. N., Dikeos, D. G., Kaneva, R., Serretti, A., Lilli, R., Smeraldi, E., Jakovljevic, M., Folnegovic, V., Rietschel, M., Milanova, V., Valente, F., Van Broeckhoven, C. and Mendlewicz, J. 2002. Excess of allele1 for alpha3 subunit GABA receptor gene (GABRA3) in bipolar patients: a multicentric association study. *Mol Psychiatry.* 7(2): 201-207.
- McCauley, J. L., Olson, L. M., Delahanty, R., Amin, T., Nurmi, E. L., Organ, E. L., Jacobs, M. M., Folstein, S. E., Haines, J. L. and Sutcliffe, J. S. 2004. A linkage disequilibrium map of the 1-Mb 15q12 GABA(A) receptor subunit cluster and association to autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 131B(1): 51-59.
- McKenzie, O., Ponte, I., Mangelsdorf, M., Finnis, M., Colasante, G., Shoubridge, C., Stifani, S., Gecz, J. and Broccoli, V. 2007. Aristaless-related homeobox gene, the gene responsible for West syndrome and related disorders, is a Groucho/transducin-like enhancer of split dependent transcriptional repressor. *Neuroscience.* 146(1): 236-247.
- Menold, M. M., Shao, Y., Wolpert, C. M., Donnelly, S. L., Raiford, K. L., Martin, E. R., Ravan, S. A., Abramson, R. K., Wright, H. H., DeLong, G. R., Cuccaro, M. L., Pericak-Vance, M. A. and Gilbert, J. R. 2001. Association analysis of chromosome 15 gabaa receptor subunit genes in autistic disorder. *J Neurogenet.* 15(3-4): 245-259.
- Nawara, M., Szczaluba, K., Poirier, K., Chrzanowska, K., Pilch, J., Bal, J., Chelly, J. and Mazurczak, T. 2006. The ARX mutations: a frequent cause of X-linked mental retardation. *Am J Med Genet A.* 140(7): 727-732.
- Nurmi, E. L., Dowd, M., Tadevosyan-Leyfer, O., Haines, J. L., Folstein, S. E. and Sutcliffe, J. S. 2003. Exploratory subsetting of autism families based on savant

- skills improves evidence of genetic linkage to 15q11-q13. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 42(7): 856-863.
- Ohira, R., Zhang, Y. H., Guo, W., Dipple, K., Shih, S. L., Doerr, J., Huang, B. L., Fu, L. J., Abu-Khalil, A., Geschwind, D. and McCabe, E. R. 2002. Human ARX gene: genomic characterization and expression. *Mol Genet Metab.* 77(1-2): 179-188.
- Otani, K., Ujike, H., Tanaka, Y., Morita, Y., Katsu, T., Nomura, A., Uchida, N., Hamamura, T., Fujiwara, Y. and Kuroda, S. 2005. The GABA type A receptor alpha5 subunit gene is associated with bipolar I disorder. *Neurosci Lett.* 381(1-2): 108-113.
- Papadimitriou, G. N., Dikeos, D. G., Karadima, G., Avramopoulos, D., Daskalopoulou, E. G. and Stefanis, C. N. 2001. GABA-A receptor beta3 and alpha5 subunit gene cluster on chromosome 15q11-q13 and bipolar disorder: a genetic association study. *Am J Med Genet.* 105(4): 317-320.
- Philippe, A., Martinez, M., Guilloud-Bataille, M., Gillberg, C., Rastam, M., Sponheim, E., Coleman, M., Zappella, M., Aschauer, H., Van Maldergem, L., Penet, C., Feingold, J., Brice, A. and Leboyer, M. 1999. Genome-wide scan for autism susceptibility genes. *Hum Mol Genet.* 8(7): 805-812.
- Poolsuppasit, S., Panyayong, B., Liknapichitkul, D., Serisathien, P. and Chutha, W. 2005. Holistic Care for Thai Autism. *Journal of Mental Health of Thailand.* 13 (1): 23-29.
- Qian, H. and Dowling, J. 1994. Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina. *J Neurosci.* 14(7): 4299-4307.
- Rujirabanjerd, S., Tongsippunyoo, K., Sripo, T. and Limprasert, P. 2007. Mutation screening of the Aristaless-related homeobox (ARX) gene in Thai pediatric patients with delayed development: first report from Thailand. *Eur J Med Genet.* 50(5): 346-354.
- Russo, L., Mariotti, P., Sangiorgi, E., Giordano, T., Ricci, I., Lupi, F., Chiera, R., Guzzetta, F., Neri, G. and Gurrieri, F. 2005. A new susceptibility locus for migraine with aura in the 15q11-q13 genomic region containing three GABA-A receptor genes. *Am J Hum Genet.* 76(2): 327-333.
- Salmon, B., Hallmayer, J., Rogers, T., Kalaydjieva, L., Petersen, P. B., Nicholas, P., Pingree, C., McMahon, W., Spiker, D., Lotspeich, L., Kraemer, H., McCague, P., Dimiceli, S., Nouri, N., Pitts, T., Yang, J., Hinds, D., Myers, R. M. and Risch, N.

1999. Absence of linkage and linkage disequilibrium to chromosome 15q11-q13 markers in 139 multiplex families with autism. *Am J Med Genet.* 88(5): 551-556.
- Sander, T., Peters, C., Kammer, G., Samochowiec, J., Zirra, M., Mischke, D., Ziegler, A., Kaupmann, K., Bettler, B., Epplen, J. T. and Riess, O. 1999. Association analysis of exonic variants of the gene encoding the GABAB receptor and idiopathic generalized epilepsy. *Am J Med Genet.* 88(4): 305-310.
- Shao, Y., Cuccaro, M. L., Hauser, E. R., Raiford, K. L., Menold, M. M., Wolpert, C. M., Ravan, S. A., Elston, L., Decena, K., Donnelly, S. L., Abramson, R. K., Wright, H. H., DeLong, G. R., Gilbert, J. R. and Pericak-Vance, M. A. 2003. Fine mapping of autistic disorder to chromosome 15q11-q13 by use of phenotypic subtypes. *Am J Hum Genet.* 72(3): 539-548.
- Sherr, E. H. 2003. The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes. *Curr Opin Pediatr.* 15(6): 567-571.
- Simeone, TA., Donevan, SD. and Rho, JM. 2003. Molecular biology and ontogeny of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol.* 19(5): 39-48.
- 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(6): 563-571.
- Steiger, JL. and Russek, SJ. 2004. GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *J Pharmacol Ther.* 101(3): 259-281.
- Stromme, P., Mangelsdorf, M. E., Scheffer, I. E. and Gecz, J. 2002. Infantile spasms, dystonia, and other X-linked phenotypes caused by mutations in *Aristaless* related homeobox gene, ARX. *Brain Dev.* 24(5): 266-268.
- Szczaluba, K., Nawara, M., Poirier, K., Pilch, J., Gajdulewicz, M., Spodar, K., Chelly, J., Bal, J. and Mazurczak, T. 2006. Genotype-phenotype associations for ARX gene duplication in X-linked mental retardation. *Neurology.* 67(11): 2073-2075.
- Tanaka, M., Olsen, R. W., Medina, M. T., Schwartz, E., Alonso, M. E., Duron, R. M., Castro-Ortega, R., Martinez-Juarez, I. E., Pascual-Castroviejo, I., Machado-

- Salas, J., Silva, R., Bailey, J. N., Bai, D., Ochoa, A., Jara-Prado, A., Pineda, G., Macdonald, R. L. and Delgado-Escueta, A. V. 2008. Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet.* 82(6): 1249-1261.
- Tochigi, M., Kato, C., Koishi, S., Kawakubo, Y., Yamamoto, K., Matsumoto, H., Hashimoto, O., Kim, SY., Watanabe, K., Kano, Y., Nanba, E., Kato, N. and Sasaki, T. 2007. No evidence for significant association between GABA receptor genes in chromosome 15q11-q13 and autism in a Japanese Population. *J Hum Genet.* 52(12): 985-989.
- Turner, G., Partington, M., Kerr, B., Mangelsdorf, M. and Gecz, J. 2002. Variable expression of mental retardation, autism, seizures, and dystonic hand movements in two families with an identical ARX gene mutation. *Am J Med Genet.* 112(4): 405-411.
- Urak, L., Feucht, M., Fathi, N., Hornik, K. and Fuchs, K. 2006. A GABRB3 promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. *Hum Mol Genet.* 15(16): 2533-2541.
- Wagstaff, J., Knoll, J. H., Fleming, J., Kirkness, E. F., Martin-Gallardo, A., Greenberg, F., Graham, J. M., Jr., Menninger, J., Ward, D., Venter, J. C. and et al. 1991. Localization of the gene encoding the GABAA receptor beta 3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *Am J Hum Genet.* 49(2): 330-337.
- Wallerstein, R., Sugalski, R., Cohn, L., Jawetz, R. and Friez, M. 2008. Expansion of the ARX spectrum. *Clin Neurol Neurosurg.* 110(6): 631-634.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 40. แสดงการกลายพันธุ์ของยีน *ARX* ในผู้ป่วย X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia (XLAG) and ACC-AG, agenesis of corpus callosum with abnormal genitalia

เอก ซอน	การผ่าเหล่า	ลักษณะทาง คลินิก	ลักษณะของการผ่า เหล่า	จำนวนผู้ป่วย (ราย)
1	IVS1+2 T>C	XLAG	Splice	1
	EX1_2 del	XLAG	Deletion	1
2	c.232 G>T	XLAG	Nonsense	2
	c.335_368 del	XLAG	Deletion	1
	c.392_452 del	XLAG	Deletion	1
	c.420_451 del	XLAG	Deletion	1
	c.617 del C	XLAG-HTD	Deletion	1
	c.619_647 del	XLAG	Deletion	1
	c.790 del C	XLAG	Deletion	2
	c.994 C>T	XLAG	Missense	1
	c.995 G>C	XLAG	Missense	1
	c.995 G>A	XLAG	Missense	1
	c.996_1001 del	XLAG	Deletion	1
	c.1028 T>A	XLAG	Missense	1
	c.1058 C>G	XLAG	Missense	1
	EX2_5del	XLAG	Deletion	1
3	IVS3+1 G>C	XLAG	Splice	1
	c.1117 C>T	HYD-AG	Nonsense	1
	c.1105 G>T	HYD-AG	Nonsense	1
	c.1187_1199 insC	XLAG	Insertion	1
	c.1372 delG	XLAG	Deletion	2
	c.1419_1420 insAC	ACC-XLAG	Insertion	1
5	c.1561 G>A	XLAG-LCH	Missense	1
รวม	-	-	-	26

ตารางที่ 41. ยีนที่คาดว่าสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม รวบรวมจากการศึกษาความสัมพันธ์ การถ่ายทอดไปด้วยกัน (transmission disequilibrium) (คัดลอกจาก (Abrahams and Geschwind, 2008) Abrahams BSGeschwind DH

ตำแหน่งยีน	ชื่อยีน	การศึกษาความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม
12q14–12q15	<i>AVPR1A</i>	A positional candidate for ASD and important in rodent social behavior. Interacts with OXTR. Association with affection status ($P = 0.004$) and a quantitative trait Vineland Subscale Score ($P = 0.007$)
7q35	<i>CNTNAP2</i>	A positional candidate gene with observed mutations. mRNA distribution markedly different in human versus rodent species. Association with affection status ($P = 2 \times 10^{-5}$) and a quantitative trait age at first word ($P = 0.05$)
1q42	<i>DISC1</i>	A key gene in psychiatric disorders and functionally linked to neuroligin signalling. Associated with ASD in a Finnish isolate by family-based association ($P = 0.0007$) and a case–control analysis ($P = 9 \times 10^{-5}$)
7q36	<i>EN2</i>	A positional candidate that is linked to cerebellar abnormalities in mutant mice. SNP and haplotype-based associations to affection in multiple cohorts ($P = 5 \times 10^{-6}$, 0.001 and 0.04)
15q11–15q12	<i>GABRB3</i>	A positional candidate; dysregulated in Rett syndrome, Angelman syndrome and autism brain25. Association with autism in multiple cohorts ($P = 0.0014$ and 0.0011)
6q21	<i>GRIK2</i>	A positional candidate that is linked to neuroligin signalling by PSD95. A rare homozygous mutation in an Iranian pedigree results in non-syndromic mental retardation. Association with autism in Caucasian ($P = 0.0002$) and Chinese populations ($P = 0.01$)
17q21	<i>ITGB3</i>	Positional candidate involved in regulation of serotonin. Evidence for functional interaction with <i>SLC6A4</i> . Association with whole-blood serotonin levels in multiple populations ($P = 0.01$ and 0.0055) and autism ($P = 0.00076$)

ตารางที่ 41. (ต่อ)

ตำแหน่งยีน	ชื่อยีน	การศึกษาความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม
7q31	<i>MET</i>	Positional candidate and reduced expression in brains of cases versus controls. Association between promoter variant and affection status in two large family-based cohorts ($P = 0.0005$ and 0.001) and a case-control analysis ($P = 0.001$). A function difference was observed between the two alleles of the associated variant
3p25	<i>OXTR</i>	Important in rodent social behaviour, reduced in blood of cases versus controls and interacts with <i>AVPR1A</i> . Association with affection status ($P = 0.0094$ and 5×10^{-5}) and a quantitative trait intelligence quotient ($P = 0.0002$)
7q22	<i>RELN</i>	Positional candidate and identification of rare variants among cases. Expression levels are reduced in brains of cases versus controls. Association with affection status by case-control analyses ($P = 0.001$) and family-based analyses ($P = 0.001$ and 0.002)
2q24	<i>SLC25A12</i>	A positional candidate that is related to neurite outgrowth and is upregulated in the prefrontal cortex of autistic subjects. Association between affection status and both single SNPs ($P = 0.0094$ and 0.02) and haplotypes ($P = 5 \times 10^{-5}$ and 0.03)
17q11	<i>SLC6A4</i>	A positional candidate that is involved in the regulation of serotonin. Variation in <i>SLC6A4</i> is linked to grey matter volume in the cortex. Evidence for functional interaction with <i>ITGB3</i> . Some clinical benefit is seen with <i>SLC6A4</i> inhibitors. Association between promoter variant and both affection status ($P = 0.007$ and 0.007) and cortical grey matter volume ($P = 0.004$). Rare variants transmitted to cases at greater than expected frequency

ตารางที่ 42. แสดงตำแหน่ง SNPs ที่มีการศึกษาบนยีน *GABRB3*

SNPs	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (NT_026446)	อัลลีล	ตำแหน่ง SNPs	ความถี่ ของอัลลีล		อ้างอิง
				คนจีน	คนญี่ปุ่น	
rs4273008	24571401	A/C	-1437	-	-	Urak et al., 2006
rs3606068	24571125	-/G		-	-	
rs4243768	24571054	C/T	-1090	-	-	Urak et al., 2006
rs4906902	24570861	A/G	-897	A:0.69 G:0.31	A:0.65 G:0.35	Urak et al., 2006
rs9672674	24570756	A/T		-	-	
rs8179184	24570695	C/T	-731	C:0.81 T:0.19	C:0.70 T:0.30	Urak et al., 2006
rs8179185	24570637	A/G		-	-	
rs35623625	24570521	-/C		-	-	
rs7171660	24570505	A/G	-541	-	-	Urak et al., 2006
rs4363842	24570498	A/G	-534	-	-	Urak et al., 2006
rs4906901	24570133	A/C	-169	-	-	Urak et al., 2006
rs20317	24570030	C/G	-66	-	-	Urak et al., 2006
rs25409	24569934	C/T	+31 Exon1a	A:1.00 T:0.00	A:1.00 T:0.00	Urak et al., 2006
rs20318	24569890	C/T	+75 Exon1a	-	-	Urak et al., 2006 Ashley-Koch et al., 2007
rs25407 (AUTISM)	24569025	C/G	Intron1	-	-	G:0.92 C:0.08 (NORTH-AMERICA)
rs25408 (AUTISM)	24568630	C/T	+1135 Intron3	-	-	Urak 2006 C:0.835 T:0.165 (NORTH-AMERICA)
rs8179186	24568629	C/T	Intron3	-	-	
rs4906690	24567973	G/T	Intron3	-	-	
rs6576609	24567854	C/T	Intron3	-	-	

ตารางที่ 42. (ต่อ)

สโพลล์	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (NT_026446)	อัลลีล	ตำแหน่งสโพลล์	ความถี่ ของอัลลีล		อ้างอิง
				คนจีน	คนญี่ปุ่น	
rs3917081 (AUTISM)	24566224	-/GTT /TGT	Intron3	-	-	-:0.05 GTT:0.95 (NORTH-AMERICA)
rs10642847	24566223	-/AAC	Intron3	-	-	
rs3212332 (AUTISM)	24565046	A/T	+5491 Intron3	A:0.00 T:1.00	A:0.00 T:1.00	Urak et al., 2006
rs35806648	24564994	-/G	Intron3	-	-	
rs3212333 (AUTISM)	24564474	C/G	Intron3	-	-	C:0.84 G:0.16 (NORTH-AMERICA)
rs3917082 (AUTISM)	24564259	-/T	Intron3	-	-	T:0.87 -:0.13 (NORTH-AMERICA)
rs3212334	24563936	G/T	Intron3	G:0.30 T:0.70	G:0.35 T:0.65	
rs35318489	24563809	-/C	Intron3	-	-	
rs12437535	24563761	C/T	Intron3	C:0.70 T:0.30	C:0.65 T:0.35	
rs8042939	24563664	A/G	Intron3	-	-	
rs4453447	24554565	C/G	Intron3	C:0.30 G:0.70	C:0.35 G:0.65	Curran et al., 2006
rs8024864	24548198	A/G	Intron3	A:0.70 G:0.30	A:0.71 G:0.29	
rs2059574	24548136	A/C	Intron3	A:0.48 C:0.52	A:0.31 C:0.69	Ashley-Koch et al., 2007; Ma et al., 2005
rs12898904	24548074	C/T	Intron3	C:0.83 T:0.17		
rs970408	24540078	C/T	Intron3	C:0.63 T:0.37	C:0.72 T:0.28	Curran et al., 2006

ตารางที่ 42. (ต่อ)

สโพลล์	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (NT_026446)	อัลลีล	ตำแหน่งสโพลล์	ความถี่ ของอัลลีล		อ้างอิง
				ความถี่	ความถี่คู่	
rs10519566	24526963	A/G	Intron3	A:0.83 G:0.17	A:0.94 G:0.06	Curran et al., 2006
rs12592816	24516890	C/G	Intron3	C:0.65 G:0.35	C:0.70 G:0.30	
rs981778	24508333	A/G	Intron3	A:0.24 G:0.76	A:0.20 G:0.80	
rs1863464	24489581	A/G	Intron3	A:0.03 G:0.97	A:0.08 G:0.92	
rs754661	24485370	A/G	Intron3	A:0.32 G:0.68	A:0.27 G:0.73	Curran et al., 2006
rs878960	24480029	A/G	Intron3	A:0.43 G:0.57	A:0.39 G:0.61	Curran et al., 2006
rs982361	24473470	A/G	Intron3	A:0.31 G:0.69	A:0.36 G:0.64	
rs890317	24473294	A/C	Intron3	A:0.6 C:0.4	A:0.57 C:0.43	Ashley-Koch et al., 2007; Ma et al., 2005; Kim et al., 2006
rs1367959	24468251	C/T	Intron3	C:0.73 T:0.27	C:0.78 T:0.22	Curran et al., 2006
rs2194958	24458502	C/T	Intron3	C:0.03 T:0.97	C:0.04 T:0.96	Curran et al., 2006
rs754185	24438972	A/G	Intron3	A:0.07 G:0.93	A:0.04 G:0.96	Ashley-Koch et al., 2007; Ma et al., 2005
rs754186	24438907	C/T	Intron3	C:0.94 T:0.06	C:0.95 T:0.05	

ตารางที่ 42. (ต่อ)

สโพล์	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (NT_026446)	อัลลีล	ตำแหน่งสโพล์	ความถี่ ของอัลลีล		อ้างอิง
				ความถี่	ความถี่คู่	
rs768899	24428917	C/T	Intron3	C:0.84 T:0.16	C:0.82 T:0.18	Curran et al., 2006
rs4542636	24419024	C/T	Intron3	C:0.79 T:0.21	C:0.84 T:0.16	
rs2315906	24418666	C/T	Intron 3	C:0.21 T:0.79	C:0.16 T:0.84	
rs1897356	24416628	C/T	Intron3	C:0.06 T:0.94	C:0.03 T:0.97	Curran et al., 2006
rs1426220	24406825	A/G	Intron 4	A:0.73 G:0.27	A:0.81 G:0.19	
rs4906683	24405714	C/G	Intron 4	C:0.21 G:0.79	C:0.17 G:0.83	Curran et al., 2006
rs1834533	24397677	C/T	Intron 4	C:0.26 T:0.74	C:0.20 T:0.80	
rs8037653	24395693	G/T	Intron 4	G:0.00 T:1.00	G:0.00 T:1.00	Curran et al., 2006
rs7166689	24385005	A/C		A:0.27 C:0.73	A:0.20 C:0.80	
rs8024564	24384306	A/G		A:0.23 G:0.77	A:0.17 G:0.83	
rs12912641	24395335	C/T		C:0.82 T:0.18	C:0.90 T:0.10	
rs10519563	24374497	C/T		C:0.82 T:0.18	C:0.92 T:0.08	Curran et al., 2006
rs11636988	24373907	A/G	Intron 6	A:0.83 G:0.14	A:0.89 G:0.11	

ตารางที่ 42. (ต่อ)

สโพลล์	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (NT_026446)	อัลลีล	ตำแหน่งสโพลล์	ความถี่ ของอัลลีล		อ้างอิง
				คนจีน	คนญี่ปุ่น	
rs1426217	24372218	A/G	Intron6	A:0.13 G:0.87	A:0.09 G:0.91	Ashley-Koch et al., 2007 ; Ma et al., 2005 ; Kim et al., 2006
rs8042482	24371348	C/T	Intron6	C:0.89 T:0.11	C:0.89 T:0.11	
rs4906679	24365866	C/T	Intron6	C:0.26 T:0.74	C:0.2 T:0.8	
rs7173108	24364412	A/G	Intron6	A:0.08 G:0.92	A:0.06 G:0.94	
rs7167688	24364230	C/T	Intron6	C:0.79 T:0.21	C:0.82 T:0.18	
rs981347	24362223	C/T	Intron7	C:0.92 T:0.08	C:0.94 T:0.06	
rs8042132	24362109	C/T	Intron7	C:0.00 T:1.00	C:0.00 T:1.00	
rs1432007	24361782	A/G	Intron8	A:0.76 G:0.24	A:0.80 G:0.20	Curran et al., 2006
rs1036132	24352894	A/C	Intron8			Curran et al., 2006
rs2081648	24349292	A/G	Intron8	A:0.31 G:0.69	A:0.26 G:0.74	Ashley-Koch et al., 2007; Ma et al., 2005 ; Kim et al., 2006
rs2928697	24348595	C/T		C:0.92 T:0.08	C:0.94 T:0.06	
rs2928696	24348557	C/T		C:0.66 T:0.34	C:0.74 T:0.26	

ที่มา: NCBI database, dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>)

ภาคผนวก ข

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		
25% Ammonium persulfate (1 ml)		
APS	0.25	g
Deionized distilled water	1	ml
6% polyacrylamide gel solution (10 ml)		
10XTBE	1	ml
40% acrylamide	1.5	ml
Sterile water up to 10 ml		

6% Polyacrylamide gel (10 ml)		
6% Acrylamide solution	10	ml
TEMED	20	μl
25% APS	20	μl
Mix well		
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		
1X TBE (1,000 ml)		
10X TBE	100	ml
Deionized distilled water up to 1,000 ml		
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		
Loading dye (for denature gel electrophoresis)		
Formamide	9.5	ml
0.5 M EDTA, pH 8.0	400	μl
Bromophenol Blue	0.005	g
Xylene cyanol FF	0.005	g
Deionized distilled water	100	μl
Mix well, store at -20 °C		
Elution buffer (40 ml)		
10 mM Ammonium acetate	2.5	ml
Sodium Acetate (3M, pH5.2)	136	μl
0.5 mM EDTA, pH8.2	80	μl
Deionized distilled water up to 40 ml		

TE buffer (1,000 ml)

1M Tris-HCL, pH 8.0	10	ml
---------------------	----	----

0.5 mM EDTA, pH 8.0	2	ml
---------------------	---	----

Deionized distilled water up to 1,000 ml

1M Tris-HCl, pH 8.0 (1,000 ml)

Tris (FW 121.4 g/mol)	121.14	g
-----------------------	--------	---

Deionized distilled water up to 1,000 ml

pH to 8.0 using NaOH

10 mM Ammonium acetate (50 ml)

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	38.54	g
-----------------------------	-------	---

Deionized distilled water up to 50 ml

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวกอบกุล ทองสิพพัญญู	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4910220015	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Kobkul Tongsippanyoo, Nichara Ruangdaraganon, Tippawan Hansakunachai, Rawiwan
Roongpraiwan, Tasawat Somboontham, Worathai Maisrihaw, Thanya Sripo and
Pornprot Limprasert. 2009. Common mutations screening of the ARX gene in male
patients with autism spectrum disorders. 4th BUU Grad. Research Conference, March
13, 2009, Burapha University, Chon Buri, Thailand.