



การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* และยีน *MET* ในเด็กไทยที่มี
ภาวะออทิซึมสเปกตรัม

**Association Study of the *RELN* and *MET* Genes in Thai Children
with Autism Spectrum Disorders**

เชษฐตุพล พูลจันทร์

Chettupon Pooljun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน <i>RELN</i> และยีน <i>MET</i> ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมสเปคตรัม
ผู้เขียน	นายเชษฐตุพล พูลจันทร์
สาขาวิชา	ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

ออทิซึมสเปคตรัม เป็นกลุ่มอาการของโรคทางระบบประสาท โดยผู้ป่วยมีพัฒนาการล่าช้าและมีความผิดปกติ 3 ด้านหลัก ได้แก่ พัฒนาการด้านสังคม พัฒนาการด้านการสื่อสาร และภาษา การมีพฤติกรรมและความสนใจซ้ำๆ การศึกษาจีโนมไวด์สแกนหลายการศึกษาพบตำแหน่งยีนบนโครโมโซม 7 แขนข้ายาวความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม การศึกษานี้เลือกศึกษา 2 ยีนที่อยู่บริเวณดังกล่าวคือ ยีน *RELN* ที่ตำแหน่ง 7q22 ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายเซลล์และการพัฒนาของการเชื่อมโยงเซลล์ประสาท และยีน *MET* ที่ตำแหน่ง 7q31.2 เป็นยีนที่สร้างโปรตีนตัวรับไทโรซีนไคนเนสซึ่งจะจับกับ hepatocyte growth factor (HGF) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์ กระบวนการพัฒนาของเซลล์ และกระบวนการซ่อมแซม วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* และยีน *MET* กับเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมสเปคตรัม ศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมจำนวน 188 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 272 ราย ด้วยวิธี fluorescent PCR และศึกษา SNP 14 ตำแหน่งบนยีน *RELN* และยีน *MET* จากฐานข้อมูล SNP สนิปส์ 7 ตำแหน่งบนยีน *RELN* ประกอบด้วย rs2299388 rs607755 rs2072403 rs362691 rs2159676 rs362746 rs736707 และ SNP อีก 7 ตำแหน่งบนยีน *MET* ประกอบด้วย rs1858830 rs38845 rs10243024 rs38859 rs13223756 rs2299439 rs2023748 ศึกษาจีโนไทป์ SNP ด้วยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์และวิธีพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี ทำการศึกษา SNP ทั้งหมดในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม 188 ราย พ่อแม่ 320 คน และกลุ่มควบคุม 250 คน ผู้ป่วยทุกรายได้ผ่านการประเมินภาวะออทิซึมโดยใช้แบบประเมิน DSM-IV และทดสอบระดับสติปัญญา (non-verbal IQ) โดยใช้แบบทดสอบ Stanford-Binet Intelligence Scale: Fifth Edition (SB:V) ศึกษาความสัมพันธ์ของแอลลีลและจีโนไทป์โดยวิธี Population based case control โดยใช้ไคสแควร์ และการถ่ายทอดแอลลีลในครอบครัวด้วยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) ผลการศึกษาพบความถี่แอลลีลและจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.0061$ สำหรับแอลลีล และ $P = 0.0025$ สำหรับจีโนไทป์) การศึกษาความสัมพันธ์

ของสลิปส์บนยีน *RELN* และยีน *MET* ไม่พบความแตกต่างทางสถิติจากการศึกษาแบบ Population based case control และการศึกษาแบบ Family based association ของสลิปส์ทั้ง 14 ตำแหน่ง การทดสอบความสัมพันธ์แฮพลไทป์พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแฮพลไทป์แบบ T-A-G-A ของสลิปส์ rs38859-rs13223756-rs2299439-rs2023748 บนยีน *MET* มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.040$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน *RELN* และยีน *MET* เป็นยีนที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมการเกิดภาวะออทิซึมในเด็กไทย ในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้

Thesis Title Association Study of the *RELN* and *MET* Genes in Thai Children with Autism Spectrum Disorders

Author Mr. Chettupon Pooljun

Major Program Molecular Biology and Bioinformatics

Academic Year 2010

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) are a group of neurodevelopmental disorder with complex genetic etiology. They are characterized by impairments in three domains, reciprocal social interaction, communication deficits and repetitive and restricted patterns of behavior and interests. Several genome-wide scan studies have indicated the presence of an autism susceptibility locus within the long arm of chromosome 7 (7q). Two prominent candidate genes are the *RELN* gene (7q22) which encodes a signaling protein that plays an important role in the migration and in the development of neural connections and the *MET* gene (7q31.2) which encodes the MET receptor tyrosine kinase that is involved in mediating hepatocyte growth factor (HGF) signaling in a number of physiological, developmental, and repair processes. The objective of this study was to investigate associations of the *RELN* and *MET* genes with ASD in Thai children. Genotyping of GGC repeats polymorphisms at 5'UTR of the *RELN* gene was performed in 188 autistic subjects and 272 controls by fluorescent PCR. For the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) study, we selected 14 SNPs in the *RELN* and *MET* genes through the SNP database. Seven of them are located in the *RELN* gene including rs2299388, rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs362746, rs736707, and the other seven are located in the *MET* gene including rs1858830, rs38845, rs10243024, rs38859, rs13223756, rs2299439, rs2023748 which were identified genotyping by Biallelic-ARMS PCR and PCR-RFLP techniques. The SNP study included 188 autistic patients, 320 parents and 250 controls. All patients were given a clinical diagnosis of autism based on the DSM-IV and non verbal-IQ was tested by the Stanford-Binet Intelligence Scale: Fifth Edition (SB:V). Two statistical methods were used in this study; the population based case control study used the Chi-square test and the family based association study used the Transmission Disequilibrium Test

(TDT). Results; Allele frequencies and genotype distributions of GGC \geq 14 repeats showed strong associations between cases and controls by Chi-square test ($P = 0.0061$ for allele, $P = 0.0025$ for genotype). No significant association was found between SNPs of either the *RELN* and *MET* genes in either the population based case control or the family-based association studies using TDT. In addition, haplotype T-A-G-A for markers rs38859, rs13223756, rs2299439 and rs2023748 of the *MET* gene was overtransmitted to the affected offspring ($P = 0.040$). Overall, our findings suggest that the *RELN* and *MET* genes are associated with autism spectrum disorders in Thai children. Further studies will be required to confirm this association.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(15)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(18)
เนื้อเรื่อง	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	23
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	24
วัสดุ	24
วิธีดำเนินการ	27
บทที่ 3 ผลการวิจัย	73
บทที่ 4 บทวิจารณ์	121
บทที่ 5 บทสรุป	143
รายการเอกสารอ้างอิง	144
ภาคผนวก	162
ประวัติผู้เขียน	169

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีส่วนส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึม	8
2. แสดงข้อดีข้อเสียของการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับภาวะออทิซึมแบบ Population based case control และ Family-based association	10
3. แสดงรายงานผลการศึกษานำ GGC บริเวณ 5'UTR บนยีน <i>RELN</i> กับภาวะออทิซึม	14
4. แสดงรายงานผลการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR บนยีน <i>RELN</i> กับภาวะออทิซึม	16
5. สรุปการรายงานผลการศึกษานำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i> ที่ไม่พบความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม	17
6. แสดงรายงานการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ของสไนป์บนยีน <i>RELN</i> กับภาวะออทิซึม	18
7. แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน <i>RELN</i> และยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมที่ได้รับการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV	25
8. แสดงกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาตามลักษณะที่ปรากฏ	25
9. แสดงไพรเมอร์ในการศึกษานำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i>	31
10. แสดงองค์ประกอบพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC	32
11. แสดงสภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์	32
12. แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในการศึกษาครั้งนี้	38
13. แสดงส่วนประกอบเจลโพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 สำหรับ 1 เจล	39
14. แสดงตำแหน่งสไนป์ในการศึกษายีน <i>RELN</i> พร้อมเหตุผลในการศึกษา	40
15. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับศึกษาจีโนไทป์ของสไนป์ของยีน <i>RELN</i> โดยไพรเมอร์ทั้งหมดออกแบบโดยการศึกษาครั้งนี้	42
16. แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ rs2299388 บริเวณอินทรอน 2 ของยีน <i>RELN</i>	43
17. แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ rs607755 บริเวณอินทรอน 5 (Splicing junction) ของยีน <i>RELN</i>	44
18. แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ rs2072403 บริเวณเอกซอน 15 ของยีน <i>RELN</i>	45

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
19. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs362691 บริเวณเอกซอน 22 ของยีน <i>RELN</i>	46
20. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs2159676 บริเวณอินทรอน 28 ของยีน <i>RELN</i>	47
21. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs362746 บริเวณเอกซอน 45 ของยีน <i>RELN</i>	48
22. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs736707 บริเวณอินทรอน 59 ของยีน <i>RELN</i>	49
23. แสดงตำแหน่งสนิปส์ในการศึกษายีน <i>MET</i> พร้อมเหตุผลในการศึกษา	50
24. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับศึกษาจีโนมไทป์ ของสนิปส์ของยีน <i>MET</i>	52
25. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs1858830 บริเวณโปรโมเตอร์ ของยีน <i>MET</i>	53
26. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs38845 บริเวณอินทรอน 1 ของยีน <i>MET</i>	54
27. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs10243024 บริเวณอินทรอน 2 ของยีน <i>MET</i>	55
28. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs38859 บริเวณอินทรอน 3 ของยีน <i>MET</i>	56
29. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs13223756 บริเวณเอกซอน 7 ของยีน <i>MET</i>	57
30. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs2299439 บริเวณอินทรอน 15 ของยีน <i>MET</i>	58
31. แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสนิปส์ rs2023748 บริเวณเอกซอน 21 ของยีน <i>MET</i>	59
32. แสดงคำสั่งในการหาค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม PLINK	64
33. แสดงการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติ ตามลักษณะที่ปรากฏ	73

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
34. แสดงการเปรียบเทียบการกระจายตัวของของแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ในตัวอย่าง คนไทยปกติจากภาคกลาง และภาคใต้ด้วยการทดสอบไคสแควร์	77
35. แสดงการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบในกลุ่มผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด (272 คน)	78
36. แสดงการแบ่งการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i> และผลการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรมไคสแควร์	79
37. แสดงการกระจายตัวของจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ที่พบในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (272 คน)	81
38. แสดงผลการเปรียบเทียบความถี่ของจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมด และผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ โปรแกรมไคสแควร์	82
39. แสดงการถ่ายทอดแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม PLINK	83
40. แสดงค่าฮาร์ดดีไวน์เบิร์ก และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตีของสไนป์ส์ที่ศึกษาบนยีน <i>RELN</i>	86
41. แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>RELN</i> ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)	87
42. แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>RELN</i> ในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)	88
43. แสดงความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>RELN</i> ในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)	89
44. แสดงความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>RELN</i> ในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)	90

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
45. แสดงค่าความน่าจะเป็น (<i>P</i> -value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสไนป์สแต่ละตำแหน่งบนยีน <i>RELN</i> ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด เทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model	92
46. แสดงค่าความน่าจะเป็น (<i>P</i> -value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสไนป์สแต่ละตำแหน่งบนยีน <i>RELN</i> ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชายด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model	93
47. แสดงค่า <i>P</i> -value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสไนป์สตำแหน่ง rs2299388 , rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs362746 และ rs736707 บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม PLINK	94
48. แสดงค่า <i>P</i> -value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสไนป์สตำแหน่ง rs2299388, rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs362746 และ rs736707 บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม PLINK	95
49. แสดงความถี่แฮพลูไทป์ของสไนป์สทั้ง 7 ตำแหน่งบนยีน <i>RELN</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมแฮพลูวิท	97
50. แสดงความถี่แฮพลูไทป์ของสไนป์ส rs2072403 และ rs362691 บนยีน <i>RELN</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด	98
51. แสดงความถี่แฮพลูไทป์บนยีน <i>RELN</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย โดยใช้โปรแกรมแฮพลูวิท	99
52. แสดงความถี่แฮพลูไทป์บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลูวิท	100
53. แสดงความถี่แฮพลูไทป์บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย โดยใช้โปรแกรมแฮพลูวิท	101
54. แสดงค่าฮาร์ดีไวน์เบิร์ก และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตีของสไนป์สทุกตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>MET</i>	104
55. แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์สแต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (<i>df</i> =1)	105

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
56. แสดงความถี่แอลลีลของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)	106
57. แสดงความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 ราย) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)	107
58. แสดงความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัมเพศชาย (156 ราย) ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 ราย) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)	108
59. แสดงค่าความน่าจะเป็น (<i>P</i> -value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสลิปส์ แต่ละตำแหน่งบนยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับ กลุ่มควบคุมทั้งหมดด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model	109
60. แสดงค่าความน่าจะเป็น (<i>P</i> -value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสลิปส์ แต่ละตำแหน่งบนยีน <i>MET</i> ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัมเพศชายเทียบกับ กลุ่มควบคุมเพศชายด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model	110
61. แสดงค่า <i>P</i> -value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสลิปส์ตำแหน่ง rs1858830, rs38845, rs10253024, rs38859, rs13223756, rs2299439 และ rs2023748 บนยีน <i>MET</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัมทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม PLINK	111
62. แสดงค่า <i>P</i> -value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสลิปส์ตำแหน่ง rs1858830, rs38845, rs10253024, rs38859, rs13223756, rs2299439 และ rs2023748 บนยีน <i>MET</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัมเพศชายทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม PLINK	112
63. แสดงความถี่แฮพลูไทป์ rs10243024 rs38859-rs13223756-rs2299439- rs2023748บนยีน <i>MET</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมแฮพลูวิท	114
64. แสดงความถี่แฮพลูไทป์ของสลิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งบนยีน <i>MET</i> ในครอบครัวผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลูวิท	117
65. แสดงความถี่แฮพลูไทป์บนยีน <i>MET</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัมโดย ใช้โปรแกรมแฮพลูวิทของสลิปส์ rs38859 rs13222756 rs2299439 และ rs2023748	117

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
66. แสดงสนิปส์แฮโพไลไทป์แบบต่างๆ ที่พบการถ่ายทอดสนิปส์แฮโพไลไทป์จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดบนยีน <i>MET</i>	119
67. เปรียบเทียบการวิเคราะห์ความถี่จำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i> ในการศึกษาของกลุ่มต่างๆ กับกลุ่มประชากรไทย	125
68. เปรียบเทียบผลการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาอื่นๆ	126
69. แสดงการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ตั้งแต่ 14 ซ้ำขึ้นไปจากพ่อแม่มาสู่ผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม จำนวน 18 ราย	128
70. แสดงค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i>	131
71. แสดงผลการสำรวจความชุกของการเกิดภาวะออทิซึมในแต่ละประเทศ	163
72. แสดงการเปรียบเทียบความถี่แอลลีลของสนิปส์บนยีน <i>RELN</i> ในแต่ละเชื้อชาติ	165
73. แสดงการเปรียบเทียบความถี่แอลลีลของสนิปส์บนยีน <i>MET</i> ในแต่ละเชื้อชาติ	166

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. แสดงวิธีการทำงานของยีน <i>RELN</i>	13
2. แสดงวิธีการทำงานของยีน <i>MET</i>	20
3. แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน 500LIZ ที่ใช้ในการศึกษา จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธี Fragment analysis	33
4. แสดงการออกแบบ Primer ของสไนป์ส ในแต่ละตำแหน่งโดยใช้วิธีเทคนิค Biallelic-ARMS PCR	35
5. แสดงตำแหน่งสไนป์สและระยะห่างของสไนป์สแต่ละตำแหน่งบนยีน <i>RELN</i> ที่ใช้ในการศึกษา	41
6. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs2299388	43
7. แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>PvuII</i> ของสไนป์ส rs607755	44
8. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs2072403	45
9. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs362691	46
10. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs2159676	47
11. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs362746	48
12. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs736707	49
13. แสดงตำแหน่งสไนป์สและระยะห่างของสไนป์สแต่ละตำแหน่งบนยีน <i>MET</i> ที่ใช้ในการศึกษา	51
14. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs1858830	53
15. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs38845	54
16. แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hpy188I</i> ของสไนป์ส rs10243024	55
17. แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> ของสไนป์ส rs38859	56
18. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs13223756	57
19. แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MseI</i> ของสไนป์ส rs2299439	58
20. แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลิลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส rs2023748	59
21. แสดงข้อมูล (input) นามสกุล .txt ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PLINK และแฮปโลวิว	62
22. แสดงแผนที่ (map) ที่ระบุถึงตำแหน่งของสไนป์สที่ต้องการศึกษา	63
23. แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK	65
24. แสดงผลการทดสอบค่า Hardy-Weinberg Equilibrium โดยใช้โปรแกรม PLINK	66

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25. แสดงผลการทดสอบค่าโดยใช้คำสั่ง assoc โดยใช้โปรแกรม PLINK	66
26. แสดงผลการทดสอบการวิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT	67
27. แสดงแผนที่ของตำแหน่งสลับบนยีนที่ต้องการศึกษาโดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว	69
28. แสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมแฮพลอวิว เวอร์ชัน 4.1	69
29. แสดงผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรมแฮพลอวิว เวอร์ชัน 4.1	71
30. แสดงผลการทดสอบ Linkage disequilibrium (LD Display) ที่ได้จากโปรแกรมแฮพลอวิว	72
31. แสดงผลการทดสอบ haplotype block ที่ได้จากโปรแกรมแฮพลอวิว	72
32. แสดงผลการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i>	74
33. แสดงผลการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน <i>RELN</i>	75
34. แสดงผลผลลิตเล็กโตรเฟอโรแกรมของจำนวนซ้ำ GGC	76
35. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของสลับ rs2299388 (บนซ้าย) rs607755 (บนขวา) rs2072403 (ล่างซ้าย) และ rs362691 (ล่างขวา)	84
36. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของสลับ rs215676 (บนซ้าย) rs362746 (บนขวา) และ rs736707 (ล่างซ้าย)	85
37. แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน <i>RELN</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	96
38. แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน <i>RELN</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย	98
39. แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม	100
40. แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน <i>RELN</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชาย	101
41. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของสลับ rs1858830 (บนซ้าย) rs38845 (บนขวา) rs10243024 (ล่างซ้าย) และ rs38859 (ล่างขวา)	102
42. แสดงผลเจลอะคริลาไมด์ของสลับ rs13223756 (บนซ้าย) rs2299439 (บนขวา) และ rs2023748 (ล่างซ้าย)	103

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
43. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน <i>MET</i> ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม	115
44. แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน <i>MET</i> ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม	116
45. อิเล็กโทรเฟอโรแกรมบริเวณสไนป์ส์ตำแหน่ง rs362691 บริเวณเอกซอน 22 ของยีน <i>RELN</i>	120
46. แสดงโครงสร้าง hairpin ของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ	132

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

ออทิสซึมเป็นกลุ่มอาการของโรคทางระบบประสาท เกิดจากภาวะความผิดปกติทางสมองที่ทำให้มีความบกพร่องของพัฒนาการใน 3 ด้านหลัก ได้แก่ ภาษาและการสื่อสาร การสร้างสัมพันธภาพระหว่างบุคคล รวมถึงความสนใจและพฤติกรรมที่จำเพาะซ้ำเดิม โดยอาการเหล่านี้มักแสดงก่อนอายุ 3 ขวบ ปัจจุบันยังไม่สามารถระบุสาเหตุที่แน่ชัดของภาวะออทิสซึมได้ แต่จากการศึกษาในฝาแฝดและพี่น้องพบว่าพันธุกรรมน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิสซึมรวมถึงอาจเกิดจากความผิดปกติของยีนหลายยีนและมีปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมร่วมด้วย

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับการเกิดภาวะออทิสซึมที่ผ่านมา พบยีนจำนวนมากอยู่บนโครโมโซมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิสซึม เช่น ยีน *SLC25A12* บนโครโมโซม 2 ยีน *RELN*, *MET*, *EN2*, *CNTNAP2* บนโครโมโซม 7 ยีน *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3* บนโครโมโซม 15 ยีน *COMT* บนโครโมโซม 22 และยีน *FMR1*, *ARX*, *MECP2* บนโครโมโซมเอกซ์ เป็นต้น

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับภาวะออทิสซึมด้วยวิธีจีโนมไวด์สแกนพบยีนบนโครโมโซม 7 แขนข้างยาวหลายยีนที่เป็น candidate regions ของภาวะออทิสซึม (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. 1998) เช่น ยีน *RELN* บริเวณ 7q22 ที่พบจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำ บริเวณ 5'UTR มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิสซึมโดยจำนวนซ้ำ *GGC* ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การสร้างโปรตีน *RELN* ในสมองลดลง ส่งผลให้โครงสร้างของสมองมีการเรียงตัวที่ผิดปกติ ยีน *MET* บริเวณ 7q31 พบสโนปส์ตำแหน่ง rs1858830 (G>C) บริเวณโปรโมเตอร์มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิสซึม โดยพบจีโนไทป์แบบ C/C ของสโนปส์ดังกล่าวส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน *MET* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์แบบ C/G และ G/G และการศึกษาก่อนหน้านี้หลายการศึกษาพบว่ายีนทั้งสองมีความสัมพันธ์กับภาวะออทิสซึมในผู้ป่วยออทิสซึมชาวอิตาลี ชาวอเมริกัน ชาวจีน และชาวญี่ปุ่น แต่ยังไม่มียางานการศึกษาในคนไทย

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* และยีน *MET* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิสซึมสเปคตรัม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์และสโนปส์ที่กระจายทั่วทั้งยีนในกลุ่มผู้ป่วยเด็กไทยที่มีภาวะออทิสซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลโตแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่มีภาวะออทิสซึมสเปคตรัม

การตรวจเอกสาร

ออทิซึม

ออทิซึม เป็นคำทับศัพท์ภาษาอังกฤษของ Autism โดยมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคำว่า Auto หรือ Self แปลว่า ตัวเอง

ออทิซึมมีการบันทึกเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2454 (ค.ศ. 1911) โดยยูเจน บลูเลอร์ (Eugen Bleuler) จิตแพทย์ชาวสวิสเซอร์แลนด์ โดยสังเกตว่ามีคนกลุ่มหนึ่งชอบแยกตัวออกไปจากสังคมของคนรอบข้าง ไม่ชอบการใช้ชีวิตอยู่ร่วมกับคนอื่น ๆ ในสังคม ต่อมาในปี พ.ศ. 2486 (ค.ศ. 1943) นายแพทย์ลีโอ แคนเนอร์ (Leo Kanner) จิตแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยจอห์นฮอปกินส์ ศึกษาพฤติกรรมผู้ป่วยเด็ก 11 คน ที่มีพฤติกรรมแปลกๆ เช่น พูดเลียนเสียง พูดซ้ำ สื่อสารไม่เข้าใจ ทำอะไรซ้ำๆ ไม่ชอบเปลี่ยนแปลง ไม่สนใจคนอื่น และติดตามพฤติกรรมดังกล่าวของเด็กกลุ่มนี้เป็นเวลา 5 ปี พบว่าเด็กเหล่านี้ต่างจากเด็กปัญญาอ่อนทั่วไป จึงเรียกเด็กที่มีอาการเช่นนี้ว่าออทิซึม

ออทิซึม (Online Mendelian in Man, OMIM 209850) เป็นกลุ่มอาการของโรคทางระบบประสาทที่พบมากในเด็ก โดยผู้ป่วยมีความผิดปกติใน 3 ด้านหลัก คือ

1. พัฒนาการด้านสังคม โดยผู้ป่วยมีความบกพร่องเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ทางสังคม เช่น เล่นกับเพื่อนไม่เป็น ไม่สนใจทำงานร่วมกับผู้อื่น ไม่แสดงออกทางสีหน้า ไม่ยอมสบตา ไม่เข้าใจพฤติกรรมหรือการกระทำของผู้อื่น เป็นต้น
2. พัฒนาการด้านการสื่อสารและภาษา โดยผู้ป่วยมีความบกพร่องด้านการสื่อสารไม่ว่าจะเป็นการสื่อสารด้วยภาษาหรือไม่ใช้ภาษา เช่น ไม่สามารถสื่อความหมายได้เลย พูดได้แต่สนทนาโต้ตอบกับผู้อื่นไม่ได้ พูดเลียนแบบ ทวนคำพูด พูดซ้ำๆ ในเรื่องที่สนใจ ระดับเสียงพูดผิดปกติ เป็นต้น
3. มีพฤติกรรมและความสนใจจำเพาะซ้ำๆ โดยผู้ป่วยมีความบกพร่องทางอารมณ์และพฤติกรรม เช่น ทำพฤติกรรมซ้ำๆ เช่น การสะบัดมือ หมุนข้อเท้า โยกศีรษะ ผู้ป่วยมักยึดติดไม่ยอมรับการเปลี่ยนแปลง มีการแสดงออกทางอารมณ์ไม่สมกับวัย หัวเราะหรือร้องไห้โดยไม่มีเหตุผล ก้าวร้าว เป็นต้น

อาการดังกล่าวเหล่านี้มักแสดงออกก่อนอายุ 3 ปี ส่วนกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติไม่ครบเกณฑ์วินิจฉัยของออทิซึมทั้ง 3 ด้านหลัก และมีการแสดงอาการเมื่ออายุมากกว่า 3 ปีขึ้นไป จะเรียกผู้ป่วยในกลุ่มนี้ว่า Pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDD-NOS) ปัจจุบันเรียกกลุ่มอาการออทิซึมที่มีการแสดงออกของอาการที่รุนแรงแตกต่างกันนี้ว่า Autism Spectrum Disorders (ASD)

กลุ่มอาการออทิซึมสเปกตรัม (นิชรา เรื่องดารกานนท์ 2551; จุฑามาส วิโรจน์นันต์ 2549)

กลุ่มอาการออทิซึมสเปกตรัม เป็นชื่อที่ใช้เรียกรวมกลุ่มอาการทางระบบประสาทซึ่งรวมความผิดปกติที่มีลักษณะเฉพาะ 3 ประเภท คือ

1. Autistic disorder or autism

Autism or Autistic Disorder โดยกระทรวงศึกษาธิการของสหรัฐอเมริกา (U.S. Department of Education) ให้ความหมายของออทิซึมว่า หมายถึงความผิดปกติที่มีผลต่อการสื่อสารทั้งทางวาจา (verbal) และไม่ใช้วาจา (nonverbal) การปฏิสัมพันธ์กับสังคม และมักจะพบก่อนอายุ 3 ขวบ อาการอื่นที่เกิดร่วมและพบบ่อยคือ การมีพฤติกรรมซ้ำๆ และการเคลื่อนไหวมีลักษณะเฉพาะ (stereotyped movements) เป็นต้น

ผู้ป่วยออทิซึมส่วนใหญ่มักมีสติปัญญาอยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าปกติหรือภาวะปัญญาอ่อน จากการทดสอบระดับสติปัญญาโดยไม่ใช้ภาษา (non verbal IQ) พบว่าผู้ป่วยออทิซึมประมาณร้อยละ 70 มีภาวะปัญญาอ่อน มีระดับเชาว์ปัญญาต่ำกว่า 70 (IQ < 70) จะมีความผิดปกติของพัฒนาการเกี่ยวกับการเรียนรู้ที่ไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสังคม รวมถึงโรคเกี่ยวกับระบบประสาทอื่นๆ (Simonoff et al., 1996) ส่วนอีกประมาณร้อยละ 30 ของผู้ป่วยออทิซึมจะมีระดับเชาว์ปัญญาปกติจนถึงระดับสูง (high-functioning autism : HFA) (Fombonne, 2002, 2003) เช่น มีความสามารถในการจำวันสำคัญในประวัติศาสตร์ได้ บางคนมีความสามารถเป็นเลิศทางดนตรี การวาดภาพ แก์ใจหทัยคณิตศาสตร์ยากๆ ได้ เป็นต้น

2. Pervasive Development Disorder-Not Otherwise Specified (PDD-NOS)

เป็นความผิดปกติในการสื่อสาร การเข้าสังคม และการสนใจเฉพาะบางสิ่งบางอย่าง ซึ่งอาจไม่ครบทั้ง 3 ด้านหลัก มีอาการไม่รุนแรงเท่าผู้ป่วยออทิซึม และมักตรวจพบอาการหลังอายุ 3 ขวบ

3. Asperger's Syndrome เป็นความผิดปกติเกี่ยวกับการเข้าสังคม ดร.ฮานส์ แอสเพอร์เกอร์ (Dr.Han Asperger) เป็นบุคคลคนแรกที่อธิบายกลุ่มอาการดังกล่าวว่าเป็นอาการอย่างหนึ่งในกลุ่มผู้ที่มีปัญหาในการเข้าสังคม มีพฤติกรรมและความสนใจผิดปกติ คือจะจำกัดตัวเอง ไม่ยุ่งกับใคร เข้าใจหนังสือตามตัวหนังสือ จึงมีความยากในการสร้างความคิดรวบยอด (form concept) หรือจัดหมวดหมู่ของความคิดรวบยอด การแปลความท่าทางต่างๆ การเข้าใจเรื่องที่คนอื่นพูดหรือเล่นด้วย ตลอดจนจนมีความลำบากหรือความสามารถในการเข้าใจความรู้สึก หรือความคิดของผู้อื่น

เกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิสซึม (นิชรา เรื่องดารกานนท์ 2551)

การวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยออทิสซึม ได้มีการรวบรวมเกณฑ์การวินิจฉัยโรคนี้อย่างเป็นระบบในปี พ.ศ. 2534 (ค.ศ. 1991) เกิดเป็นเครื่องมือเรียกแบบสัมภาษณ์เพื่อการวินิจฉัยออทิสซึม (Autism Diagnostic Interview) ต่อมาสมาคมจิตแพทย์ชาวอเมริกันได้พัฒนาเกณฑ์การวินิจฉัยทางคลินิกในกลุ่มอาการตรวจโรคทางจิตเวช (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, fourth edition, DSM-IV) ในประเทศไทยแพทย์ส่วนใหญ่ใช้เกณฑ์การวินิจฉัยอิงตาม DSM-IV ซึ่งมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก โดยเฉพาะเมื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยความผิดปกติในลักษณะของกลุ่มอาการที่มีความหลากหลายและระดับความรุนแรงแตกต่างกัน

การวินิจฉัยกลุ่มอาการออทิสซึมในปัจจุบันยังคงใช้เกณฑ์การวินิจฉัยลักษณะทางคลินิกเป็นหลัก นั่นคือ อาศัยข้อมูลจากประวัติที่ได้จากพ่อแม่หรือผู้เลี้ยงดู การตรวจร่างกายเด็กซึ่งมักรวมถึงการสังเกตพฤติกรรมและประเมินพัฒนาการร่วมด้วย

ในปัจจุบันมีเครื่องมือที่สามารถคัดแยกเด็กได้เมื่ออายุ 2 ขวบ เช่น Autism Diagnostic Observation Scale (ADOS) และ Screening Test for Autism in Two Year Olds (STAT) โดยใช้ร่วมกับแบบประเมินพัฒนาการและรายงานของพ่อแม่ แบบตรวจสอบรายการสำหรับเด็กทารก (Checklist for Autism in Toddler : CHAT และ Childhood Autism Rating Scale : CARS) เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ร่วมกันเพื่อวินิจฉัยเด็กที่มีภาวะออทิสซึมได้

อุบัติการณ์การเกิดภาวะออทิสซึม

ในปี พ.ศ. 2546 (ค.ศ. 2003) Fombonne ได้รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลการสำรวจความชุกของการเกิดภาวะออทิสซึมทั่วโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2509 (ค.ศ. 1966) พบว่า มีความชุกของภาวะออทิสซึมเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่กลางปี พ.ศ. 2523 (ค.ศ. 1980) จาก 3-5 คน เพิ่มเป็น 7-10 คน ต่อประชากร 10,000 คน และพบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงในอัตราส่วน 4 : 1 คน (Fombonne, 2002) โดยการเพิ่มขึ้นของภาวะออทิสซึมอาจเนื่องมาจาก เกณฑ์การวินิจฉัยมีเนื้อหาครอบคลุมอาการของโรคมมากขึ้น มีความแม่นยำและรวดเร็ว มีการให้ความรู้ที่แพร่หลายมากขึ้น รวมถึงมีผู้สนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับออทิสซึมตีพิมพ์กว่า 1,000 รายงานในปี พ.ศ. 2550 (ค.ศ. 2007) และเพิ่มเป็น 1,300 รายงานในปี พ.ศ. 2551 (ค.ศ. 2008) (Hughes, 2008; 2009) สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานความชุกของออทิสซึมอยู่ที่ประมาณ 10 คน ต่อประชากร 10,000 คน (Poolsuppasit et al., 2005) โดยใช้อ้างอิงตามเกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV และผลการสำรวจความชุกแต่ละประเทศ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 71 ภาคผนวก ก

สาเหตุการเกิดภาวะออทิซึม

แม้ผู้ป่วยออทิซึมจะมีความผิดปกติของพัฒนาการทางสมองหรือระบบประสาท แต่สาเหตุของการเกิดภาวะออทิซึมยังไม่ทราบแน่ชัด (จุฑามาส วิโรจน์อนันต์ 2549) แต่มีหลักฐานว่าพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึม ได้แก่ การศึกษาภาวะออทิซึมในฝาแฝดร่วมไข่ที่มียีนร่วมกันร้อยละ 100 พบว่ามีภาวะออทิซึมทั้งคู่ได้บ่อยร้อยละ 60-91 แต่ผลการศึกษาในคู่แฝดต่างไข่ พบว่าทั้งคู่มีโอกาสเป็นออทิซึมเพียงร้อยละ 0-10 เท่านั้น (Bailey et al., 1995; Folstein and Rutter, 1997; Steffenburg, 1989) และการศึกษาอัตราการเกิดออทิซึมซ้ำในพื้นที่ของผู้ป่วยออทิซึม (recurrence rate) พบอัตราการเกิดซ้ำในพื้นที่ประมาณร้อยละ 2-8 สูงกว่าในประชากรทั่วไปประมาณ 50-100 เท่า (Rapin, 1997; Muhle et al., 2004) ซึ่งเป็นหลักฐานหนึ่งที่สนับสนุนว่าออทิซึมเป็นภาวะที่มีปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมด้วย (Bailey et al., 1998; Cook, 2001; Freitag, 2007; Le Couteur et al., 1996)

ปัจจุบันสาเหตุการเกิดภาวะออทิซึมทราบเพียงร้อยละ 10 ซึ่งเกิดจาก

1. ความผิดปกติของโครโมโซม โดยพบความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยออทิซึมประมาณร้อยละ 1.7-9.0 จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค GTG-banding (Gillberg, 1998; Reddy, 2005; Wassink et al., 2001) เช่น พบการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม (deletion) ตำแหน่ง 2q37 (Ghaziuddin and Burmeister, 1999; Wolff et al., 2002) การกลับทิศของชิ้นส่วนโครโมโซม 7 (Inversion) (Ashley-Koch et al., 1999) การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมระหว่างกัน (Translocation) (Vincent et al., 2005) การเกินหรือขาดหายไปของโครโมโซม 16 ตำแหน่ง p11.2 (Behjati et al., 2008; Kumar et al., 2008) พบความผิดปกติของโครโมโซม 15 บริเวณแขนข้างยาว (15q11-13) ในผู้ป่วยออทิซึมที่ได้รับการถ่ายทอดโครโมโซม 15 ทั้งสองแท่งจากพ่อหรือแม่เท่านั้น (uniparental disomy : UPD) ส่งผลให้เด็กมีอาการของโรค Prader-will syndrome/ Angelman syndrome (Borgatti et al., 2001; Dykens et al., 2004) ในผู้ป่วยออทิซึมพบการเพิ่มขึ้นของโครโมโซม 15q (duplication) ประมาณร้อยละ 1-2 (Abrahams and Geschwind, 2008; Freitag, 2007) และพบเด็กกลุ่มอาการดาวน์ซินโดรม (Down syndrome) มีอาการของออทิซึมร้อยละ 7 (Kent et al., 1999)

2. ความผิดปกติของสมอง เกิดจากมารดาที่มีการติดเชื้อขณะตั้งครรภ์ ระหว่างการคลอดหรือภายหลังคลอด เช่น มารดาที่เป็นโรคหัดเยอรมันระหว่างการตั้งครรภ์ เด็กขาดออกซิเจนระหว่างคลอด การเจ็บป่วยของเด็กภายหลังคลอด เช่น โรคสมองอักเสบ หัด ไอกรน ที่มีภาวะแทรกซ้อนก็อาจเป็นสาเหตุทำให้พัฒนาการของสมองผิดปกติได้ (จุฑามาส วิโรจน์อนันต์ 2549)

3. ความผิดปกติของยีนเดี่ยว เช่น

กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (fragile X syndrome) ซึ่งมีที่มาจากจุดแตกหักปรากฏที่ปลายโครโมโซมเอกซ์จากการตรวจโครโมโซม (Cytogenetic analysis) เรียกว่า FRAXA (Fragile site, X chromosome, A site) อยู่บนตำแหน่ง Xq27.3 (Jin and Warren, 2000) โดยพบความชุกในผู้ชาย 1:4,000-6,000 และผู้หญิง 1:8,000 (Youings et al., 2000) ผู้ป่วยจะมีพฤติกรรมหลายอย่างเข้าได้กับภาวะออทิซึม เช่น ชนอยู่ไม่นิ่ง เรียนรู้ได้ยาก และมีปัญหาด้านภาษา เป็นต้น (Hatton et al., 2006; Oostra and Willemsen, 2001; Rogers et al., 2001) สาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (ร้อยละ 99) เนื่องมาจากการเพิ่มของจำนวนซ้ำของไตรนิวคลีโอไทด์ (CGG) ที่ตำแหน่ง 5' UTR ของเอกซอนแรกในยีน *FMR1* มากเกินปกติ (มากกว่า 200 ซ้ำ) ซึ่งพบในผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้กับออทิซึมร้อยละ 3-10 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าลักษณะอาการของโรคมีความคล้ายคลึงกัน (Limprasert, 2008) การเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ CGG > 200 ส่งผลให้การสร้างโปรตีน FMRP (fragile X mental retardation 1 protein) ผิดปกติ (Verkerk et al., 1991) ดังนั้นเด็กที่มีภาวะออทิซึมจึงควรได้รับการตรวจหาความผิดปกติของยีน *FMR1* เพื่อหาสาเหตุของการเกิดภาวะออทิซึม (Cornish et al., 2005; Goodlin-Jones et al., 2004; Reddy, 2005)

กลุ่มอาการเรตต์ (Rett syndrome) เป็นภาวะที่มีพัฒนาการผิดปกติซึ่งเกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทที่พบในเด็กผู้หญิง มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ของยีน *MECP2* ซึ่งมีการถ่ายทอดแบบยีนเด่นบนโครโมโซมเอกซ์ (X-linked dominant) โดยผู้ป่วยกลุ่มอาการเรตต์จะมีพัฒนาการปกติจนอายุประมาณ 6-18 เดือน หลังจากนั้นผู้ป่วยจะมีพัฒนาการด้านต่างๆ ช้าลงและจะมีพัฒนาการคงที่ ผู้ป่วยมีขนาดศีรษะเล็ก มีการหมุนมือซ้ำๆ สูญเสียความสามารถในการพูด มีลักษณะอาการชัก และอาการของออทิซึมร่วมด้วย มีรายงานพบว่าร้อยละ 1 ของผู้ป่วยออทิซึมมีความผิดปกติของยีน *MECP2* (Carney et al., 2003; Lam et al., 2000; Lobo-Menendez et al., 2003; Vourc'h et al., 2001)

กลุ่มอาการทูเบอร์ัส สเคลอโรซิส (tuberous sclerosis complex : TSC) ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม โรคนี้จะมีอาการแสดงออกได้หลายอย่าง เช่น มีก้อนหรือปานบริเวณลำตัว ใบหน้า อวัยวะภายใน เช่น ที่ปอด หัวใจ ที่สมอง (ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการชัก) รวมถึงความผิดปกติในทางพฤติกรรม เช่น อาการคล้ายออทิซึม พบว่าร้อยละ 25 ของผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวมีภาวะออทิซึมและมีเพียงร้อยละ 1.1-1.3 ของผู้ป่วยออทิซึมที่มีอาการของ TSC (Baker et al., 1998; Gillberg and Ahlsen, 1994; Smalley et al., 1992)

สาเหตุอื่นของการเกิดภาวะออทิซึมที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม เช่น การรับประทานยาทาลิโดมายด์ กรดวาลโพรอิก การดื่มแอลกอฮอล์หรือการติดเชื้อไวรัสขณะที่มารดาตั้งครรภ์ ซึ่งสาเหตุเหล่านี้พบได้น้อยในกลุ่มออทิซึมแต่มีพฤติกรรมหลายอย่างเข้าได้กับ

ภาวะออทิซึม (phenocopies) (นิชรา เรื่องดารกานนท์ 2551; Fombonne, 2003; Williams et al., 2001)

ส่วนร้อยละ 90 ของการเกิดภาวะออทิซึมยังไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) จากการรวบรวมรายงานเกี่ยวกับออทิซึมพบว่ามียีนกว่า 103 ยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะออทิซึม และมีความผิดปกติของยีนหรือโครโมโซมกว่า 44 ตำแหน่งที่ส่งผลให้ผู้ป่วยมีพฤติกรรมเข้าข่ายกลุ่มอาการออทิซึม (Betancur, 2010)

การศึกษาทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลสำหรับผู้ป่วยออทิซึมที่ไม่ทราบสาเหตุ นิยมใช้วิธีการวิเคราะห์การถ่ายทอดในครอบครัว (Linkage analysis) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (association study) การวิเคราะห์การถ่ายทอดในพี่น้องที่เป็นออทิซึมในครอบครัวมีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ก่อให้เกิดโรค โดยศึกษาแนวโน้มของแอลลีลที่ใกล้เคียงกันมีการถ่ายทอดไปด้วยกัน เช่น การศึกษาทั้งจีโนมโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่หนาแน่นครอบคลุมทุกโครโมโซมหรือศึกษาเฉพาะตำแหน่งที่สนใจ (Dawn Teare and Barrett, 2005)

การศึกษาทางพันธุกรรมที่อาจมีส่วนส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึม โดยการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมด้วยวิธีต่างๆ เช่น การศึกษา linkage การศึกษาความสัมพันธ์ (association) การศึกษาแอลลีลที่มีร่วมกัน (allele sharing) การศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว (transmission disequilibrium) การวิเคราะห์โดยใช้สไนป์ส การศึกษาความหลากหลายของยีนบริเวณที่แปลรหัสโปรตีน และการศึกษาการกลายพันธุ์ พบว่ามียีนหลายยีนบนหลายโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึม เช่น 2q31-33, 3q25-27, 6q14, 7q22, 7q31, 7q35 13q21, 15q11-13, 16p13, 17q11, 17q31 และ 19p13 เป็นต้น ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 (A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998; Barrett et al., 1999; Risch et al., 1999; Auranen et al., 2000; Duvall et al., 2007; Wassink et al., 2004; Veenstra-VanderWeele and Cook, 2004; Muhle et al., 2004) และพบหลักฐานอ้างอิงของออทิซึมกับโครโมโซมเอกซ์ในตำแหน่ง Xp และ Xq (Philippe et al., 1999; Shao et al., 2002; Vincent et al., 2005; Yonan et al., 2003)

ตารางที่ 1 แสดงการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีส่วนส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึม (ดัดแปลงจาก Miles, J. H. and Mccathren, R. B. 2005 ใน Gene Review: <http://www.genetests.org>)

ชื่อยีน	ตำแหน่งบนโครโมโซม	หน้าที่ยีนหรือโปรตีน	เอกสารอ้างอิง
<i>SLC25A12</i>	2q24	Mitochondrial aspartate/glutamate carrier	Ramoz et al., 2004
<i>C4B</i>	6p21	Complement component	Odell et al., 2005
<i>GLO1</i>	6p21	Zinc metalloenzyme scavenges oxoaldehydes	Junaid et al., 2004
<i>GRIK2</i>	6q21	Glutamate receptor 6 involved in neural development	Jamain et al., 2002; Shuang et al., 2004
<i>HOXA1</i>	7p15-p14.2	Homeobox gene involved in hindbrain development	Conciatori et al., 2004; Ingram et al., 2000
<i>RELN</i>	7q22	Signaling protein involved in neuron migration	Persico et al., 2001; Zhang et al., 2002
<i>MET</i>	7q31	MET receptor tyrosine kinase has a role in the metastasis of variety of cancers, in mediating hepatocyte growth factor (HGF)	Campbell et al., 2007; Campbell et al., 2008; Campbell et al., 2006; Jackson et al., 2009; Sousa et al., 2009
<i>WNT2</i>	7q31	Signaling proteins involved in embryonic patterning, cell proliferation and cell determination	Wassink et al., 2001
<i>FOXP2</i>	7q31	Transcription factor involved in embryogenesis and neural functioning	Gong et al., 2004; Li et al., 2005; Wassink et al., 2002
<i>UBE2H</i>	7q32	Ubiquitin-dependent proteolytic system enzyme	Vourc'h et al., 2003
<i>CNTNAP2</i>	7q35	Gene encode a member of the neurexin family which functions in the vertebrate nervous system as cell adhesion molecules and receptor	Alarcon et al., 2008; Arking et al., 2008; Bakkaloglu et al., 2008

ตารางที่ 1 แสดงการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีส่วนส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึม (ต่อ)

ชื่อยีน	ตำแหน่งบนโครโมโซม	หน้าที่ยีนหรือโปรตีน	เอกสารอ้างอิง
<i>EN2</i>	7q36.2	Homeobox gene involved in midbrain and cerebellum development	Gharani et al., 2004
<i>PTEN</i>	10q23.31	Tumor suppressor	Butler et al., 2005
<i>HRAS</i>	11p15.5	Oncogene GTPase involved in cell division, differentiation and apoptosis	Herault et al., 1995
<i>AVPR1A</i>	12q14-q15	Arginine vasopressin receptor involved in social behavior	Kim et al., 2002
<i>UBE3A</i>	15q11-q13	Angelman syndrome causative gene encodes ubiquitin protein ligase	Jiang et al., 2004; Nurmi et al., 2001
<i>GABRB3, GABRA5, GABRG3</i>	15q11.2-q12	GABA receptor subunits	Buxbaum et al., 2002; McCauley et al., 2004; Nurmi et al., 2001
<i>SLC6A4</i>	17q11.1-q12	Serotonin transporter	Conroy et al., 2004; McCauley et al., 2004; Yirmiya et al., 2001
<i>NF1</i>	17q11.2	Ras protein regulation	Marui et al., 2004
<i>HOXB1</i>	17q21-q22	Homeobox gene involved in hindbrain development	Ingram et al., 2000
<i>APOE2</i>	19q13.2	Lipoprotein receptor involved in neuronal migration and lipid transport	Persico et al., 2004
<i>NLGN4X</i>	Xp22.33	Neural synapse formation	Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004
<i>NLGN3</i>	Xq13.1	Neural synapse formation	Jamain et al., 2003

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับการเกิดโรคใช้หลักการของเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค (disease-risk variant) ที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันเพื่อหา ยีนที่มีความน่าจะเป็นที่ก่อให้เกิดโรค (susceptibility gene) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในประชากรทั่วไป (population-based) เป็นการทดสอบว่าพบเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะในคนที่เป็โรคบ่อยกว่าในประชากรปกติ แต่หากการเลือกกลุ่มประชากรที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและแฝงอยู่ในประชากรที่ศึกษาโดยไม่ทราบมาก่อน (population stratification) อาจทำให้ผลการทดสอบมี power ลดลง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในครอบครัว (family-based) เป็นวิธีการที่ไม่มีข้อผิดพลาดจากการเลือกกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์แอลลีลของพ่อและแม่ที่ถ่ายทอดให้ลูกที่เป็นโรค (transmitted) เปรียบเทียบกับแอลลีลที่ไม่ได้ถ่ายทอดเป็นกลุ่มควบคุม (not transmitted) ซึ่งใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ และมีการใช้วิธีนี้อย่างแพร่หลายในการศึกษาโรคที่มีความซับซ้อน เช่น เบาหวาน มะเร็งเต้านม และอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Cordell and Clayton 2005) แต่วิธีการนี้จะลด power ของการทดสอบเนื่องจากพ่อแม่ต้องมีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส เพราะพ่อแม่ที่เป็นโฮโมไซกัสไม่สามารถบอกการถ่ายทอดแอลลีลได้ ข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธีที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับภาวะออทิซึมแสดงในตารางที่ 2 (กนิษฐา ภัทรกุล และคณะ 2546)

ตารางที่ 2 แสดงข้อดีข้อเสียของการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับภาวะออทิซึมแบบ Population based case control และ Family based association

วิธีการศึกษา	ข้อดี	ข้อเสีย
Population based case control	<ol style="list-style-type: none"> 1. เก็บตัวอย่างได้ง่าย 2. เป็นวิธีที่ใช้ในการค้นหายีนที่เป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดโรค 	<ol style="list-style-type: none"> 1. ถ้าพบความสัมพันธ์ก็ไม่สามารถบอกได้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมนั้นเป็นสาเหตุโดยตรงต่อการเกิดโรค 2. อาจพบผลบวกปลอมได้จากการเลือกกลุ่มตัวอย่าง และขนาดของกลุ่มตัวอย่างเล็กเกินไป
Family based association	<ol style="list-style-type: none"> 1. เป็นวิธีที่ดีในการค้นหายีนหลักในการเกิดโรค 2. ลดปัญหาผลบวกปลอมจากการเลือกกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา 	เก็บตัวอย่างให้ครบทั้งครอบครัวได้ยากและใช้เวลานาน

จากการศึกษาด้วยวิธีจีโนมไวด์สแกน พบว่ามียีนบนโครโมโซม 7 หลายยีน มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม (IMGSAC, 1998; Philippe et al., 1999) เช่น ยีน *HOXA1* (7p14.2-p15) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของสมอง (hindbrain development) (Conciatori et al., 2004; Ingram et al., 2000) ยีน *RELN* (7q22) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณประสาทในการเคลื่อนย้ายเซลล์ประสาทและการกำหนดตำแหน่งของเซลล์ประสาทให้ถูกต้อง (Persico et al., 2001; Zhang et al., 2002) ยีน *MET* (7q31.2) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่กรดอะมิโนไทโรซีน ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ รวมทั้งการเกิดเนื้องอก เป็นต้น ยีน *WNT2* (7q31) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของเอ็มบริโอ และการเจริญเติบโตของเซลล์ ยีน *FOXP2* (7q32) เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเอ็มบริโอและการทำหน้าที่ของเซลล์ประสาท ยีน *EN2* (7q36.2) เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของระบบประสาท *CNTNAP2* (7q35) เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนในกลุ่ม Neurexin ซึ่งทำหน้าที่ในการทำงานของระบบประสาท มีรายงานพบการกลายพันธุ์ของยีน *CNTNAP2* แบบการขาดหายไป (deletion) ของ 2 แอลลีล (homozygote) บริเวณแอกซอน 22 ส่งผลให้เกิดการหยุดการถอดรหัสของยีน (stop codon) ส่งผลให้การสร้างโปรตีนลดลง ผู้ป่วยมีอาการชัก พุดซ้า พัฒนาการล่าช้า และมีอาการของออทิซึมบางอย่าง (Strauss et al., 2006) Alracon และคณะ (2008) ศึกษาในเด็กออทิซึม พบ SNP ตำแหน่ง rs270102 (C/T) มีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับภาวะออทิซึมในเด็กผู้ชาย (Alarcon et al., 2008) การศึกษาแบบ linkage ของ Arking และคณะ (2008) พบโครโมโซม 7 บริเวณ 7q35 มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมจากการศึกษาด้วยวิธี TDT โดยพบ SNP rs7794745 (A/T) บนยีน *CNTNAP2* มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม โดยผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดแอลลีล T จากพ่อแม่สูงกว่าแอลลีล A อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าผู้ป่วยที่มีแอลลีล T ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่มากกว่าพ่อ และพบในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายมากกว่าเพศหญิง (Arking et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของโครโมโซม 7 บริเวณยีนดังกล่าวในเด็กผู้ชาย [46,XY,inv(7)(q11.22;q35)] ส่งผลให้ยีน *CNTNAP2* มีการแสดงออกที่ลดลง (Bakkaloglu et al., 2008)

จากข้อมูลในตารางที่ 1 และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซม 7 กับภาวะออทิซึม (A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium 1998) พบว่าโครโมโซม 7 แขนข้างยาวมียีนหลายยีนที่น่าจะเป็น candidate regions ของภาวะออทิซึม ดังนั้นยีนบนโครโมโซม 7 แขนข้างยาวจึงเป็นยีนที่น่าสนใจในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับภาวะออทิซึมสเปคตรัมในเด็กไทย โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษา ยีน *RELN* และยีน *MET* ที่อยู่บนโครโมโซม 7 แขนข้างยาวว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมหรือไม่ และยีนดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาในคนไทย จึงเป็นที่มาในการศึกษายีนดังกล่าวนี้

ยีน *RELLIN (RELN)*

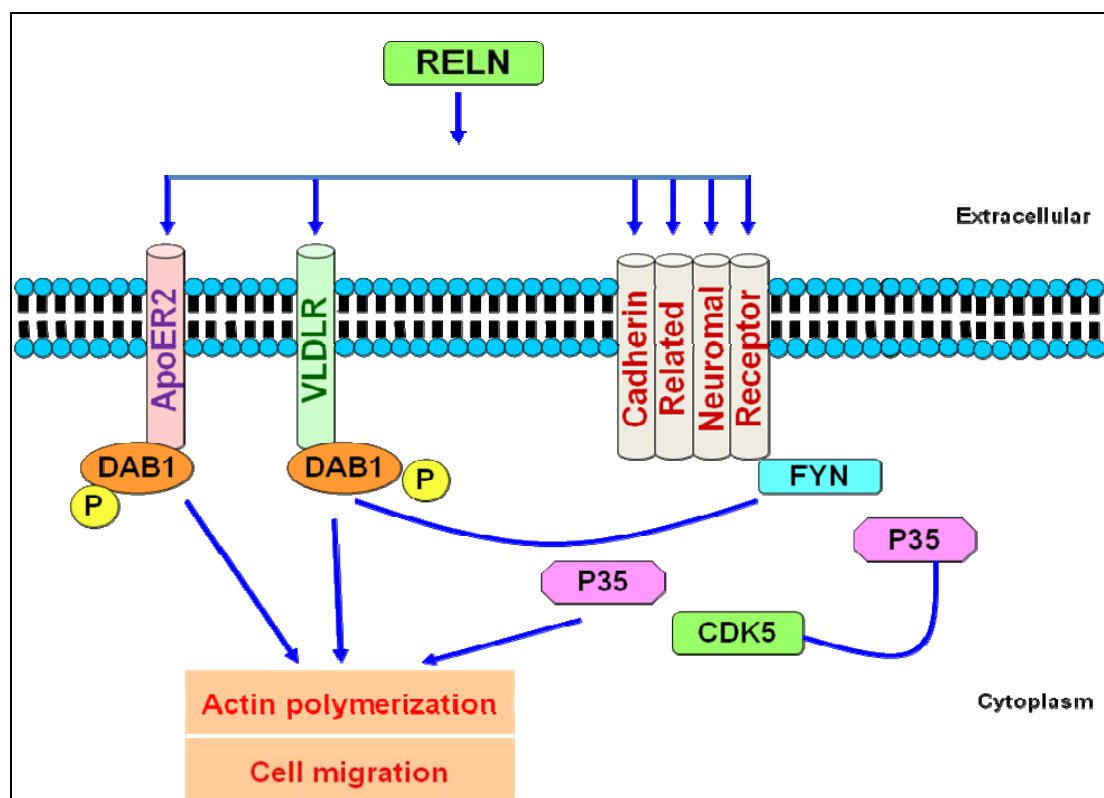
ยีน *RELN* ถูกพบครั้งแรกในหนูถีบจักร (*reeler mouse*) เมื่อปี พ.ศ. 2494 (ค.ศ. 1951) โดย Douglas Scott Falconer พบว่าหนูที่มีความผิดปกติของยีนดังกล่าว ส่งผลให้เนื้อสมองส่วนซีรีเบลลัม (*cerebellum*) มีขนาดลดลงเมื่อเทียบกับหนูปกติ ต่อมาในปี พ.ศ. 2513 (ค.ศ. 1970) พบว่าความผิดปกติของเนื้อสมองดังกล่าวเกิดจากการกลับชั้นของสมองส่วนนีโอคอร์เท็กซ์ (*neocortex*)

ในปี พ.ศ. 2538 (ค.ศ. 1995) D'Arcangelo และคณะ (1995) ค้นพบยีน *RELN* อยู่บนโครโมโซม 7 ที่ตำแหน่ง 7q22 หลังจากนั้นได้มีการศึกษาหน้าที่ของยีน *RELN* และพบว่ายีน *RELN* สร้างโปรตีน *RELN* ซึ่งเป็น extracellular matrix glycoprotein ทำหน้าที่ในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ภายในสมอง โดยควบคุมการเคลื่อนย้ายเซลล์ประสาท ควบคุมตำแหน่งการสร้างเซลล์สมองให้ถูกต้องในสมองส่วนคอร์เท็กซ์และสมองส่วนอื่นๆ ตั้งแต่ระยะเอ็มบริโอจนกระทั่งโตเป็นผู้ใหญ่ โดยในผู้ใหญ่โปรตีน *RELN* มีความสำคัญในการควบคุมการกระจายตัวของเซลล์สมองส่วนเดนไดรทีให้มีการกระจายตัวและแตกกิ่งก้านสาขาได้มากขึ้น

ยีน *RELN* เป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วย 64 เอกซอน ยีนดังกล่าวมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 517,731 กิโลเบส สามารถถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ จำนวน 11,558 ตำแหน่ง ยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน *RELN* ที่มีมวลโมเลกุลขนาด 388 กิโลดาลตัน (D'Arcangelo et al., 1995; Quattrocchi et al., 2002) แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 3,461 ตัว (DeSilva et al., 1997) โปรตีน *RELN* พบมากในสมองส่วน *neocortex* และ *hippocampus* โดยมีโปรตีนตัวรับ (*protein receptors*) ที่จำเพาะหลายตัวอยู่บริเวณ *transmembrane* การจับของโปรตีน *RELN* กับโปรตีนตัวรับส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (*tyrosine phosphorylation*) ให้แก่กรดอะมิโนไทโรซีนของโปรตีน *DAB1* ผ่านทางการกระตุ้นของโปรตีน *VLDLR* และ *ApoER2* ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับของโปรตีน *RELN* ทำให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 1 การศึกษาในหนูพบว่า โปรตีน *RELN* และ *VLDLR* แสดงออกมากในเซลล์ *Cajal-Retzius* (เซลล์ประสาทชนิดหนึ่งที่สร้างโปรตีน *RELN* ในระยะเอ็มบริโอของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบมากบริเวณเซลล์ประสาทที่มีการ *migration*) และในมนุษย์โปรตีน *RELN*, *DAB1*, *VLDLR* และ *ApoER2* แสดงออกมากในเซลล์ *Cajal-Retzius* เช่นกัน (Perez-Garcia et al., 2004; Yip et al., 2000) โดยการทำงานของโปรตีนดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเคลื่อนที่และการระบุตำแหน่งที่ถูกต้องของเซลล์ประสาททำให้สมองสามารถทำงานได้เป็นปกติในช่วงพัฒนาการทางด้านสมองของทารกจนกระทั่งโตเป็นผู้ใหญ่ นอกจากนี้พบว่าขนาดของเซลล์ *Purkinje* ในสมองส่วน *cerebellum* ของผู้ป่วยออทิซึมมีขนาดเล็กลงร้อยละ 24 เมื่อเทียบกับสมองคนปกติ (Fatemi et al., 2002) นอกจากนี้เมื่อยีน *RELN* ผิดปกติจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ของเซลล์ประสาทหลายๆ ชนิด เช่น *pyramidal neurons* ใน

cerebral cortex และเซลล์ Purkinje ในสมองส่วนซีรีเบลลัมผิดปกติส่งผลให้ตำแหน่งของเซลล์ประสาทผิดปกติไป (Tissir and Goffinet, 2003)

โปรตีน RELN มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ในเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตับ pituitary pars intermedia และ adrenal chromaffin cell โดยพบโปรตีน RELN ขนาด 420, 310 และ 160 กิโลดาลตัน แสดงออกมากในซีรัมของหนูและมนุษย์ แต่ไม่พบในหนูที่มีการขาดหายไปของยีน *reln*^{-/-} (reeler mice) (Smalheiser et al., 2000) นอกจากนี้พบว่าโปรตีน CR-50 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน RELN จากการศึกษาของ D'Arcangelo และคณะ (1997) พบ CR-50 monoclonal antibody (Cajal-Retzius marker 50) สามารถจับกับโปรตีน RELN ได้ในสมองหนูที่มีการทำงานของยีน RELN ปกติแต่ไม่พบในสมองหนูที่ขาดยีน *reln*^{-/-} ผลปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี CR-50 กับโปรตีน RELN นำไปสู่การจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ประสาท ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณโปรตีน RELN ได้



ดัดแปลงจาก <http://149.142.158.188/phenowiki/wiki/index.php/RELN> (January 20, 2011)

รูปที่ 1 แสดงวิธีการทำงานของยีน RELN โดยโปรตีน RELN จะจับกับตัวรับที่จำเพาะ ได้แก่ ApoER2, VLDLR และ Cadherin related neuronal receptor กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน DAB1 ส่งผลให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่ได้

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึม

จากการทราบนหน้าที่ของโปรตีน *RELN* ทำให้นักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษายีน *RELN* ในกลุ่มเด็กที่มีภาวะออทิซึม และพบความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน *RELN* บริเวณ 5'UTR แบบการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ 3 นิวคลีโอไทด์ (trinucleotide repeat) เป็นชุด (GGC_n) โดยพบจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำ แตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมและกลุ่มควบคุม (Kelemenova et al., 2010; Persico et al., 2001; Skaar et al., 2005; Zhang et al., 2002) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงรายงานผลการศึกษานับจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR บนยีน *RELN* กับภาวะออทิซึม

ยีน	พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออทิซึม	ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออทิซึม
<i>RELN</i>	Persico et al., 2001 Zhang et al., 2002 Skaar et al., 2005 Dutta et al., 2007 Kelemenova et al., 2010	Krebs et al., 2002 Bonora et al., 2003 Devlin et al., 2004

การศึกษาของ Persico และคณะ (ค.ศ. 2001) ด้วยวิธี fragment analysis ในผู้ป่วยชาวอิตาลีที่มีภาวะออทิซึม จำนวน 95 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่มีเชื้อชาติเดียวกัน จำนวน 186 คน พบว่าคนส่วนใหญ่จะมีจำนวนซ้ำ GGC 8 และ 10 ซ้ำ แต่ในผู้ป่วยออทิซึมมีจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำสูงกว่าในกลุ่มควบคุม และศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมด้วยวิธี TDT (transmission disequilibrium test) จำนวน 172 ราย จาก 164 ครอบครัวชาวอิตาลีและชาวอเมริกัน พบจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำ มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้ ต่อมา Zhang และคณะ (2002) ได้ศึกษาจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 126 ครอบครัว พบจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าที่คาดไว้ อย่างมีนัยสำคัญ แต่การศึกษาระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างของจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำระหว่าง 2 กลุ่ม การศึกษาของ Skaar และคณะ (2005) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 371 ครอบครัว พบจำนวนซ้ำ $GGC \geq 11$ ซ้ำมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้เช่นเดียวกัน ต่อมา Persico และคณะ (2006) ได้ศึกษาจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มขึ้นต่อการแสดงออกของยีน *RELN* พบจำนวนซ้ำ GGC 12-13 ซ้ำ

ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลงร้อยละ 50-60 โดยการ transfect จำนวนซ้ำ GGC เข้าสู่ pGL3-Promoter vector โดยมี luciferase reporter gene เป็นตัวแสดงผลการแสดงออกของยีน พบว่าจำนวนซ้ำที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของยีนทั้งในเซลล์ประสาทและ embryonic cell ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ส่งผลต่อโครงสร้างของเอ็มอาร์เอ็นเอ ทำให้การขดตัวของสายเอ็มอาร์เอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ทำให้การถอดรหัสดีเอ็นเอ (transcription) และ การแปลรหัสเป็นโปรตีน (translation) ลดลง (Persico et al., 2006) Dutta และคณะ (2007) ศึกษาจำนวนซ้ำ GGC ในชาวอินเดียพบว่า จำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดจากพ่อมาสู่ลูกสูงกว่าที่คาดไว้ แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มคนปกติ Kelemenova และคณะ (2010) ศึกษาจำนวนซ้ำ GGC ในชาวสโลวาเกียพบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำในผู้ป่วยออทิซึมสูงกว่าในกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงรายงานผลการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR บนยีน *RELN* กับภาวะอหิวาต์

กลุ่มผู้วิจัย	กลุ่มประชากรที่ศึกษา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา
Persico et al., 2001	กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะอหิวาต์ จำนวน 189 ราย - ชาวอิตาลี 95 ราย - ชาวอเมริกัน 89 ราย กลุ่มควบคุมชาวอิตาลี จำนวน 186 ราย ศึกษาด้วยวิธี Fragment analysis	Case – control	<u>พบ</u> ความแตกต่างของ GGC ≥ 11 ซ้ำสูงเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
		TDT	<u>พบ</u> GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญ
Zhang et al., 2002	กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรปที่มีภาวะอหิวาต์ จำนวน 126 ครอบครัว ศึกษาโดยวิธี PCR และแยกจำนวนซ้ำด้วย polyacrylamide gel	Case – control	<u>ไม่พบ</u> ความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
		TDT	<u>พบ</u> GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญ
Skaar et al., 2005	กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรปที่มีภาวะอหิวาต์ จำนวน 317 ครอบครัว ศึกษาด้วยวิธี gel-based oligonucleotide ligation assay (OLA)	TDT	<u>พบ</u> GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญ
Dutta et al., 2007	กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยอหิวาต์ชาวอินเดีย 129 ครอบครัว กลุ่มควบคุม 80 ราย ศึกษาโดยวิธี PCR และแยกจำนวนซ้ำด้วย 12% polyacrylamide gel	Case – control	<u>ไม่พบ</u> ความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
		TDT	<u>พบ</u> GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดจากพ่อมาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญ
Kelemenova et al., 2010	กลุ่มผู้ป่วยชาวสโลวาเกีย 90 ราย กลุ่มควบคุม 85 ราย ศึกษาด้วยวิธี Fragment analysis	Case-control	<u>พบ</u> ความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 10 ซ้ำในผู้ป่วยสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออทิซึมมีหลายการศึกษา โดย Krebs และคณะ (2002) ศึกษาจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออทิซึมในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมแต่ไม่พบการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ที่สูงจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้เช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ ในคนยุโรป เช่น การศึกษาของ Bonora และคณะ (2003) และการศึกษาของ Devlin และคณะ (2004) เป็นต้น ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปการรายงานผลการศึกษานับซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ที่ไม่พบความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม

กลุ่มผู้วิจัย	กลุ่มประชากรที่ศึกษา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา
Krebs et al., 2002	กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรปที่มีภาวะออทิซึม จำนวน 186 ครอบครัว ประกอบด้วยผู้ป่วยออทิซึม จำนวน 218 ราย ศึกษาโดยวิธี PCR และแยกจำนวนซ้ำด้วย 8% polyacrylamide gel	TDT	<u>ไม่พบ</u> ความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC \geq 11 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูง
Bonora et al., 2003	กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรป ที่มีภาวะออทิซึม จำนวน 122 ครอบครัว ศึกษาด้วยวิธี Fragment analysis	TDT	<u>ไม่พบ</u> ความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC \geq 11 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูง
Devlin et al., 2004	กลุ่มครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม โดยใช้เกณฑ์พัฒนาการด้านการพูดล่าช้า เป็นฟีโนไทป์ในการศึกษา จำนวน 385 ครอบครัว ศึกษาด้วยวิธี Fragment analysis	TDT	<u>ไม่พบ</u> ความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC \geq 11 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกับภาวะพัฒนาการด้านการพูดล่าช้า

นอกจากการศึกษานับซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* แล้วยังมีการศึกษา Single Nucleotide Polymorphisms หรือ SNP ที่บริเวณต่างๆ ของยีนหลายตำแหน่ง และพบความสัมพันธ์ของ snipส์ดังกล่าวกับภาวะออทิซึม ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *RELN* กับภาวะออทิซึม

กลุ่มที่ศึกษา	ตำแหน่งที่ศึกษา	SNPs ID	แอลลีล	ผลต่อโปรตีน	ผลการศึกษา
Skaar et al., 2005 ศึกษาในครอบครัว ออทิซึม จำนวน 317 ครอบครัว จาก 3 สถาบัน คือ จาก AGRE 85 ครอบครัว, จาก มหาวิทยาลัย Duke 218 ครอบครัว และ จาก มหาวิทยาลัย Tufts 68 ครอบครัว ศึกษาแบบ family based association (TDT) ใช้วิธี TaqMan-PCR โดยการติดฉลากโพรบ ด้วยสารเรืองแสง	อินทรอน 5	rs607755	A/G	Splicing junction	พบ การถ่ายทอดของสลิปส์ แฮ็พลไทป์แบบ ATATT ของ สลิปส์ rs607755-rs2075043- rs362746-rs2229864- rs736707 มีการถ่ายทอดแบบ haplotype จากพ่อแม่มาสู่ลูก สูงกว่าสลิปส์แฮ็พลไทป์แบบ อื่นอย่างมีนัยสำคัญ
	เอกซอน 44	rs2075043	C/T	C2234C	
	เอกซอน 45	rs362746	A/G	V2370V	
	เอกซอน 50	rs2229864	C/T	H2682H	
	อินทรอน 59	rs736707	T/C	-	
Serajee et al., 2006 ศึกษาในครอบครัว ออทิซึมจากสถาบัน AGRE จำนวน 196 ครอบครัว ศึกษาแบบ TDT	เอกซอน 22	rs362691	C/G	V997L	พบ แอลลีล G มีการถ่ายทอด จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแอล ลีล C
	อินทรอน 59	rs736707	C/T	-	พบ แอลลีล C มีการถ่ายทอด จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแอล ลีล T
Li et al., 2008 ศึกษาใน คนจีน 213 ราย ศึกษาแบบ case-control	อินทรอน 59	rs736707	C/T	-	พบ จีโนไทป์แบบ C/C สูง อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วย เทียบกับกลุ่มควบคุม

นอกจากการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึมแล้ว ยังมี การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับโรคอื่นๆ อีกหลายโรค ได้แก่

Lissencephaly โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *RELN* เกิดการ splicing ผิด ตำแหน่ง ส่งผลให้การสร้างโปรตีน *RELN* ลดลง ให้ผู้ป่วยมีลักษณะอาการ hypotonia, ataxia และพัฒนาการล่าช้า มีภาวะปัญญาอ่อนและพัฒนาการด้านภาษาผิดปกติ ซึ่งบางรายอาจพบ อาการชักร่วมด้วย (Hong et al., 2001)

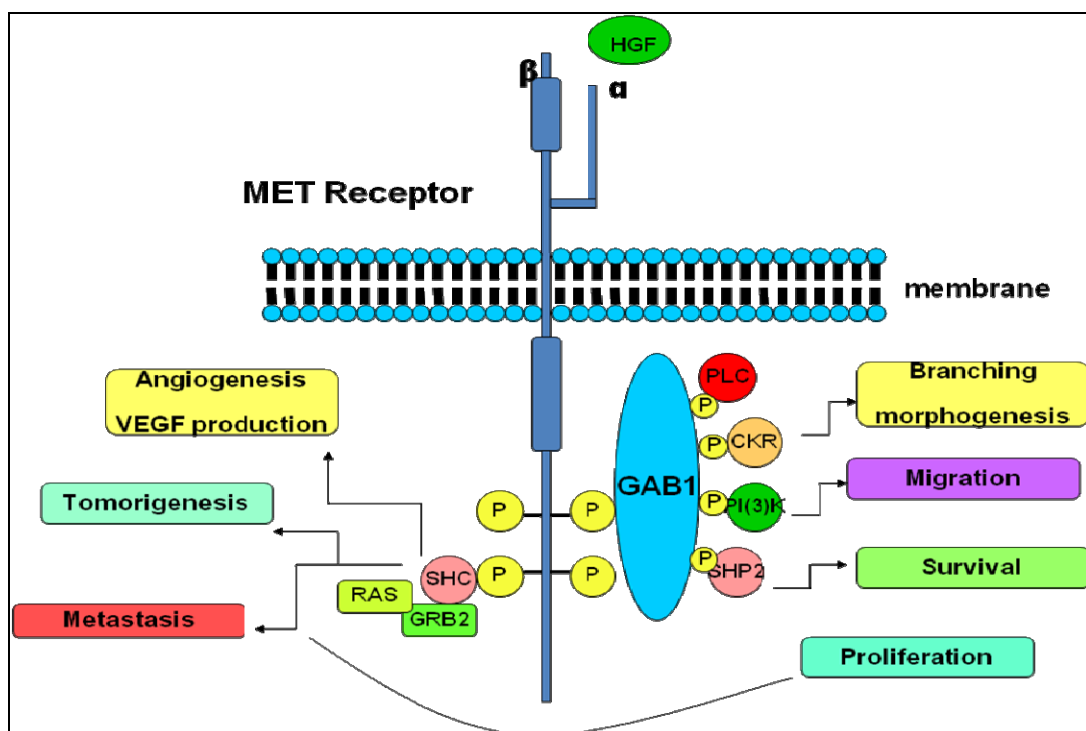
Schizophrenia หรือโรคจิตเภท ซึ่งเกิดจากการลดลงของโปรตีน *RELN* และ ระดับเอ็มอาร์เอ็นเอในสมองของผู้ป่วยจิตเภท (Impagnatiello et al., 1998) ในสมองบริเวณ hippocampus, cerebellum, basal ganglia และ cortex เป็นต้น ซึ่งในบางบริเวณพบว่าโปรตีน *RELN* ลดลงถึงร้อยละ 50

Alzheimer's disease พบความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* และสไนป์ส์ rs607755 ระหว่างผู้ป่วยอัลไซเมอร์กับคนปกติ (Seripa et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะมีระดับโปรตีน *RELN* ที่แตกต่างจากคนปกติ โดยพบว่า มีระดับโปรตีน *RELN* เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 40 เมื่อเทียบกับคนปกติ (Botella-Lopez et al., 2006) และพบจำนวนเซลล์ Cajal-Retzius ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ เป็นต้น

Epilepsy หรืออาการชัก พบผู้ป่วยที่มีอาการชักมีความถี่ของแอลลีล C ของ สไนป์ส์ rs362691 บริเวณเอกซอน 22 ของยีน *RELN* สูงกว่าแอลลีล G อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีอาการชัก (Dutta et al., 2010)

ยีน *MET* (MET receptor tyrosine kinase)

ยีน *MET* เป็นหนึ่งในหลายยีนบนโครโมโซม 7 ที่เป็น candidate gene ของภาวะออทิซึม โดยยีน *MET* อยู่บนโครโมโซม 7 แขนข้างยาวที่ตำแหน่ง 7q31.2 มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 125,982 กิโลเบส แปลงเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอได้จำนวน 6,641 ตำแหน่ง ถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ทั้งหมด 1,391 ตัว มีมวลโมเลกุล 155.5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 21 เอกซอน ยีนดังกล่าวกำหนดการสร้างโปรตีนตัวรับที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (receptor tyrosine kinase) ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ alpha chain (50 kDa) และ beta chain (145 kDa) ซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์เป็นตัวเชื่อม ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับของ HGF/SF (Comoglio and Boccaccio, 2001; Gherardi et al., 2003; Furge et al., 2000; Sheth and Watowich, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2



ดัดแปลงจาก http://www.nature.com/ncb/journal/v3/n7/fig_tab/ncb0701_e161_F1.html
(January 20, 2011)

รูปที่ 2 แสดงวิธีการทำงานของยีน *MET* โดยยีน *MET* สร้างโปรตีน MET receptor tyrosine kinase ซึ่งเป็นตัวรับ (receptor) ของโปรตีน HGF/SF เมื่อ HGF เข้ามาจับจะส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนตัวอื่นต่อไปทำให้เซลล์ทำงานได้อย่างปกติ

โปรตีน MET เป็นโปรตีนที่ให้โปรตีนของ Hapatocyte growth factor (HGF) และ Scatter factor (SF) มาจับ ส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่กรดอะมิโนไทโรซีนในโปรตีนเป้าหมาย ผลจากการเติมหมู่ฟอสเฟตแก่กรดอะมิโนไทโรซีน ทำให้โปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านโปรตีนตัวรับดังกล่าวมารวมตัวกัน โดยมีกรดอะมิโนไทโรซีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปทำหน้าที่เป็นที่ยึดจับของโปรตีนต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ เช่น การเจริญของเซลล์ (proliferation) การเปลี่ยนแปลงเซลล์ (differentiation) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอวัยวะ (organ regeneration) การเจริญของตัวอ่อน (embryogenesis) รวมไปถึงการเกิดเนื้องอก (tumorigenesis) ถ้าการเพิ่มขึ้นของเซลล์แบบควบคุมไม่ได้ ส่งผลให้เกิดมะเร็งได้ และความผิดปกติของการถ่ายทอดสัญญาณจะพบได้เนื่องจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนที่เกี่ยวข้องทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวที่ผิดปกติอาจส่งผลต่อสมองในการแบ่งเซลล์ของเปลือกสมองส่วนคอร์เท็กซ์ (cortex) และสมองส่วนซีรีเบลลัม (cerebellum) นอกจากนี้มีการศึกษาระดับ hepatocyte growth factor (HGF) ในซีรัมของผู้ป่วยออทิซึม พบว่า ปริมาณ HGF ในซีรัมของผู้ป่วยออทิซึมลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ (Russo et al., 2009)

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *MET* กับภาวะออทิซึม

การศึกษายีน *MET* กับภาวะออทิซึมมีน้อย การศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) พบสนิปส์ตำแหน่ง rs1858830 บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *MET* แบบ G>C มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม (Campbell et al., 2006) โดยพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะออทิซึมมีความถี่ของแอลลีล C สูงกว่าแอลลีล G อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเบสดังกล่าวส่งผลให้การจับกันของโปรตีน SP1 และ PC4 ที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมให้เกิดการถอดรหัสได้ (transcription factors) จับกับยีนบริเวณโปรโมเตอร์ได้ลดลง (State, 2006) นอกจากการศึกษานิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมแล้ว ได้มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *MET* ในสมองเด็กออทิซึม โดยการสแกตอาร์เอ็นเอจากสมองส่วน superior temporal gyrus ของเด็กออทิซึมและกลุ่มเด็กปกติ โดยทั้ง 2 กลุ่มมีความสอดคล้องทั้งด้านเพศและอายุ การศึกษาการแสดงออกของยีนทดสอบโดยการ transfected ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ประสาท (N2A และ SN56) พบว่า ปริมาณโปรตีนของยีน *MET* ที่มีแอลลีลเป็น C ในสมองของเด็กออทิซึมมีปริมาณลดลง 2 เท่า เมื่อเทียบกับเด็กปกติ (Campbell et al., 2006) และยังมีการศึกษานิปส์ตำแหน่ง rs1858830 โดยการดูปริมาณโปรตีนที่แสดงออกในสมองของเด็กกลุ่มออทิซึมและเด็กกลุ่มควบคุมเพื่อยืนยันผลการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการแสดงออกของโปรตีน *MET* ลดน้อยลงตาม จีโนไทป์แบบ C/C < C/G < G/G ในกลุ่มควบคุมแต่ในกลุ่มออทิซึมพบความสัมพันธ์ในแบบลักษณะสุ่มและไม่มี ความสัมพันธ์ทางสถิติ แต่พบปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้น โดยผู้ศึกษาให้คำอธิบายว่าอาจเกิด

จากความผิดปกติในกระบวนการทำงานของโปรตีน MET เพราะพบว่าเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน MET (MET signaling pathway) เพิ่มสูงขึ้นซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการทำงานของเอ็มอาร์เอ็นเอผิดปกติไป (Campbell et al., 2007)

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* และยีน *MET* กับภาวะออทิซึมสเปคตรัมในเด็กไทย แต่พบว่ายีนดังกล่าวอยู่บนโครโมโซม 7 ตำแหน่ง 7q21-31 ซึ่งเป็นตำแหน่ง candidate region ของออทิซึม จึงคาดว่ายีน *RELN* และยีน *MET* อาจมีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมสเปคตรัม ดังนั้นจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *RELN* และยีน *MET* ในเด็กไทยที่ภาวะออทิซึมสเปคตรัม

เครื่องหมายพันธุกรรม

ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายพันธุกรรม เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ (คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวซ้ำๆกันประมาณ 2-7 เบส) และสโนิปส์มาใช้ในการศึกษาสาเหตุของโรคหรือตำแหน่งที่น่าจะก่อให้เกิดโรค สโนิปส์มีข้อดีกว่าไมโครแซทเทลไลท์ คือ มีอัตราการผ่าเหล่าน้อยกว่าและมีจำนวนที่ครอบคลุมในยีนที่หนาแน่นมากกว่า และวิธีการศึกษาจีโนมไทยปีของสโนิปส์ยังเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่าย เช่น PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) และ Biallelic-ARMS PCR เป็นต้น (Brightwell et al., 2002; Ferrie et al., 1992; Huang et al., 1992; Newton et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลสโนิปส์ที่มีการศึกษามาแล้วในเวบไซต์ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* และยีน *MET* ที่อาจจะเป็นปัจจัยทางพันธุกรรมและส่งเสริมให้เกิดกลุ่มอาการออทิซึมสเปคตรัมในเด็กไทย

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

วัตถุประสงค์

ตัวอย่างผู้ป่วย

กลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมสเปกตรัมตามเกณฑ์วินิจฉัย DSM-IV จำนวน 188 ราย เป็นผู้ป่วยจากโรงพยาบาลรามารับดี 91 ราย (เพศชาย 77 ราย เพศหญิง 14 ราย) จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 55 ราย (เพศชาย 45 ราย เพศหญิง 10 ราย) และจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 42 ราย (เพศชาย 34 ราย เพศหญิง 8 ราย) อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยทั้งหมดเท่ากับ 4.31 ± 2.22 ปี จำแนกรายละเอียดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 7 ผู้ป่วยผ่านการตรวจวัดพฤติกรรมโดยใช้ Vineland Adaptive behavior Scales (VABS) และตรวจวัดระดับสติปัญญาโดยใช้แบบทดสอบ non verbal IQ (Binet-V) ผู้ป่วยทุกรายที่เลือกมาวิเคราะห์จะต้องได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมหรือ PDD-NOS และทุกรายต้องเป็นไปตามข้อกำหนดดังนี้

- 1.1 ผ่านการตรวจตามเกณฑ์ Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders, 4th Edition (DSM-IV) ว่าเป็นผู้ป่วยออทิซึมหรือ PDD-NOS
- 1.2 ไม่มีประวัติการคลอดผิดปกติหรือมีการติดเชื้อขณะตั้งครรภ์
- 1.3 ไม่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับกลุ่มอาการที่ชัดเจน เช่น กลุ่มอาการดาวน กลุ่มอาการพราเดอร์วิลลี และกลุ่มอาการทูเบอร์ส สเคลอโรซิส (Tuberous sclerosis complex)
- 1.4 ผู้ป่วยทุกรายมีผลการตรวจโครโมโซมและดีเอ็นเอของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะปกติ ในผู้ป่วยชายมีผลการศึกษารกลายพันธุ์ในเอกซอน 2 ของยีน ARX เป็นปกติ และในผู้หญิงมีผลการศึกษารกลายพันธุ์ของยีน MECP2 ปกติ
- 1.5 ผู้ปกครองยินยอมให้เข้าร่วมโครงการโดยมี Inform consent ทุกราย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติตามลักษณะที่ปรากฏ (Phenotype) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *RELN* และยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ได้รับการวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV

โรงพยาบาล	ออทิซึม		PDD-NOS		รวม (ราย)
	เพศชาย (ราย)	เพศหญิง (ราย)	เพศชาย (ราย)	เพศหญิง (ราย)	
สงขลานครินทร์	27	8	7	0	42
รามธิบดี	52	9	25	5	91
ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ	42	9	3	1	55
รวม	121	26	35	6	188

ตารางที่ 8 แสดงกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาตามลักษณะที่ปรากฏ

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึม	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	จำนวนครอบครัว*
	การศึกษา case-control	การศึกษา TDT
ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด	188	160
ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายทั้งหมด	156	134

* ประกอบด้วย พ่อ แม่ และ ลูก หรือเรียกว่า Trio

การศึกษากายภาพถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกด้วยวิธี TDT ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม 160 ครอบครัว ประกอบด้วยครอบครัวที่มีลูกเป็นออทิซึม 1 ราย (simplex family) จำนวน 151 ครอบครัว และครอบครัวที่มีลูกเป็นออทิซึมมากกว่า 1 ราย (multiplex family) จำนวน 9 ครอบครัว

ตัวอย่างกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างกลุ่มควบคุมจากคลังเลือดของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติและโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวน 250 ราย โดยทุกรายต้องผ่านการซักประวัติว่าไม่มีประวัติทางจิตเวชและพัฒนาการผิดปกติที่ชัดเจนใน 3 รุ่น โดยพิจารณาว่าไม่มีประวัติการรักษาในโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่อง หรือต้องกินยาเพื่อลดปัญหาสุขภาพจิต หรือปัญหาเรื่องเรียนหนังสือไม่ได้ โดยเก็บประวัติภูมิลำเนาและเชื้อชาติตั้งแต่ปู่ย่าตายายลงมาเพื่อให้ได้กลุ่มควบคุมที่มีพื้นฐานใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยมากที่สุด กลุ่มควบคุมมีอัตราส่วนระหว่างชายต่อหญิงเป็นสัดส่วนใกล้เคียงกับตัวอย่างผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา โดยไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงอายุ เพราะกลุ่มควบคุมในการศึกษานี้ต้องการผู้ที่ไม่เป็นออทิสซึมจึงเลือกกลุ่มควบคุมที่มีอายุผ่านจุดที่จะมีโอกาสเกิดออทิสซึมได้ เนื่องจากออทิสซึมมีอาการตั้งแต่เด็ก จึงเลือกกลุ่มควบคุมที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี โดยโครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการการตรวจกรองและการศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมในผู้ป่วยไทยที่เป็นออทิสติก ที่ผ่านการประเมินของคณะกรรมการจริยธรรมของสถาบันที่เกี่ยวข้อง 3 สถาบัน (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โรงพยาบาลรามธิบดี โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ)

วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย บิดามารดาผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ที่ได้ยินยอมเข้าร่วมโครงการ จากหลอดเลือดดำบริเวณแขน ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร ในหลอดปลอดเชื้อที่มี 0.5M EDTA (500 μ l of 0.5 M EDTA / 15 ml of blood sample) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ผสมเลือดให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดเบาๆ 4-5 ครั้ง เพื่อให้เลือดผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ลงบันทึกข้อมูลการเก็บและปริมาณตัวอย่างเลือดที่เก็บได้

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดที่เก็บมาได้ถ่ายลงหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร หลังจากนั้นแยกเอาเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการเติม TE buffer ให้ได้ปริมาตรรวม 13 มิลลิลิตร กลับหลอดเบาๆ ให้เลือดกับ TE buffer ผสมกันดีแล้วปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จึงเทส่วนใสทิ้ง เติม TE buffer ให้ได้ปริมาตรรวม 13 มิลลิลิตร และทำเหมือนเดิมอีกสองครั้งหรือจนกว่าสีแดงของฮีโมโกลบินในเลือดจะหายไป จึงนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอหรือเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอทำโดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาย่อยโดยการเติมสารช่วยย่อยเซลล์ (Lysis buffer) ซึ่งประกอบด้วย Solution A ปริมาตร 2,280 ไมโครลิตร, 10% SDS 120 ไมโครลิตร (0.14 M NaCl, 0.01 M Tris pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, Nonidet P-40, dH₂O) Proteinase K (10 mg/ μ l) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นจึงปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวจะย่อยหมด จากนั้นเติมสารผสมของ saturated phenol, chloroform และ isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเริ่มต้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารผสมของ saturated phenol, chloroform และ isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรเริ่มต้นและทำซ้ำอีกหนึ่งครั้ง จากนั้นจึงเติมสารผสมของ chloroform และ isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมเอธานอลบริสุทธิ์เย็น ปริมาตร 2 เท่า กลับหลอดเบาๆ จนกว่าจะเห็นดีเอ็นเอตกตะกอนแล้วเขี่ยดีเอ็นเอที่ตกตะกอน

โดยใช้ Autopipette tip ปลายแหลมเล็ก (200 μ l) ใส่หลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเอธานอลเย็นความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่น ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทเอธานอลทิ้ง จากนั้นจึงตากดีเอ็นเอไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที จึงเติม TE buffer ในปริมาณที่เหมาะสมกับขนาดตะกอนดีเอ็นเอที่สกัด ได้ (100-300 ไมโครลิตร) เพื่อละลายดีเอ็นเอ เมื่อดีเอ็นเอละลายดีแล้วนำไปวัดหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดเทียบสีของสารละลาย เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

สารเคมี

Absolute ethanol
Acrylamide/Bis solution
Ammonium persulfate
BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems)
Betaine
Boric acid
dNTP Mix: dATP, dTTP, dCTP and dGTP,
7-Deaza dGTP
Dimethylsulfoxide (DMSO)
Elution buffer
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
Ethidium bromide (EtBr)
Hidi Formamide
Glycerol
Hot start Taq DNA polymerase (Invitrogen)
Isoamyl alcohol
Methanol
Magnesium Chloride ($MgCl_2$, Invitrogen)
Nonidet P-40 (NP-40)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
PCR buffer, 10X (Invitrogen)
Phenol, Saturated
Proteinase K
Sodium bisulphate (Sigma)
Taq DNA polymerase (Invitrogen)
3', 3'', 5', 5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein (Bromophenol blue)
Tris

อุปกรณ์

เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (3130 Genetic Analyzer, AB)
 เครื่องควบคุมอุณหภูมิชนิดแห้ง (Heat block, Biosan/Latvia)
 เครื่องถ่ายภาพยวี่ (Bioimaging system SynGene)
 เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (PTC200, MJ Research)
 เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (2720 Thermal cycler, AB)
 เครื่องวัดเทียบสีของสารละลาย (Spectrophotometer, Ultrospec 1100pro)
 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวตั้งพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Protean II Xi cell, 20X20 cm, Biorad)
 เครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับตัวอย่างขนาด 1.5-2.0 มิลลิลิตร (Centrifuge, 5415D, Eppendorf)
 เครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับตัวอย่างขนาด 30-50 มิลลิลิตร (Centrifuge, Model 5420 Kubota)
 ตู้ดูดควันพิษ (Fume hood with carbon filter)
 ตู้บ่มเชื้อ (Air Incubator, incucell 111)
 ตู้อบร้อน (Hot Air Oven, Oven Model ED 115)

สารเคมีอื่น ๆ

1. องค์ประกอบและปริมาณของสารเคมี ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข
2. 25% Ammonium persulfate
3. 6% polyacrylamide gel solution
4. 2.5 mM dNTP Mix
5. Loading dye (for non-denature gel electrophoresis)
6. 6% Polyacrylamide gel
7. 10X TBE

การศึกษาครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึมในผู้ป่วยทั้งหมด (ออทิซึมและ PDD-NOS) ด้วยการเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุมเป็นประชากรทั่วไปในสังคมไทยโดยใช้วิธี Fragment analysis เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างจำนวนซ้ำ GGC ทั้งแบบแอลลีลและจีโนไทป์ระหว่าง 2 กลุ่มด้วยการทดสอบไคสแควร์
2. การศึกษาความสัมพันธ์ของสปีส์ตำแหน่งต่างๆบนยีน *RELN* และยีน *MET* กับภาวะออทิซึมโดยใช้วิธี Bi-allelic ARMS PCR และ PCR-RFLP โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 แบบ คือ แบบ Population based case control และแบบ Family based association

วิธีการศึกษา Microsatellite (GGC repeat) บนยีน *RELN* บริเวณ 5'UTR

ทำการศึกษาจำนวนซ้ำของ GGC บริเวณ 5'UTR (NT_007933.15) ด้วยวิธี Fragment analysis ด้วยเครื่อง Automate Genetic Analyzer รุ่น ABI Prism 3130 โดยใช้ไพรเมอร์ตามวิธีการศึกษาของ Persico และคณะ (2001) ทำการติดฉลากฟลูออโรเรสเซนต์ไพรเมอร์ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์สีน้ำเงิน (6-FAM Fluorescence : RELNGGC_F*) ที่ปลาย 5 ไพร์ม์ม ตั้งแสดงรายละเอียดไพรเมอร์ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงไพรเมอร์ในการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5'-3')	วิธีการทดสอบ
RELNGGC_F*	5'-CGGCGTCTCCAAACTGAAT-3'	พีซีอาร์ฟลูออเรสเซนต์
RELNGGC_R	5'-AACAGCGCTAGGAGGAAAGT-3'	

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN*

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1X PCR Buffer MgCl₂ 1.0 มิลลิโมลาร์ 50% 7 deza dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ ไพร์เมอร์ 0.15 ไมโครโมลาร์ 1M Betaine Hot start Taq DNA polymerase (Platinum) 0.1 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง MJ thermal cycler โดยใช้องค์ประกอบและสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังรายละเอียดในตารางที่ 10 และตารางที่ 11

ตารางที่ 10 แสดงองค์ประกอบพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC

องค์ประกอบพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Primer_RELNGGC_F* 10uM (6-FAM fluorescent)	0.15
Primer_RELNGGC_R 10uM	0.15
Genomic DNA (50 ng/ul)	1.0
50% 7 deza dNTP (2.5mM)	0.8
10X Buffer (Invitrogen)	1.0
MgCl ₂ (50mM)	0.2
Hot start Taq DNA polymerase (Platinum) (Invitrogen)	0.1
Betaine	2.0
Deionized water	4.6
ปริมาตรรวม	10

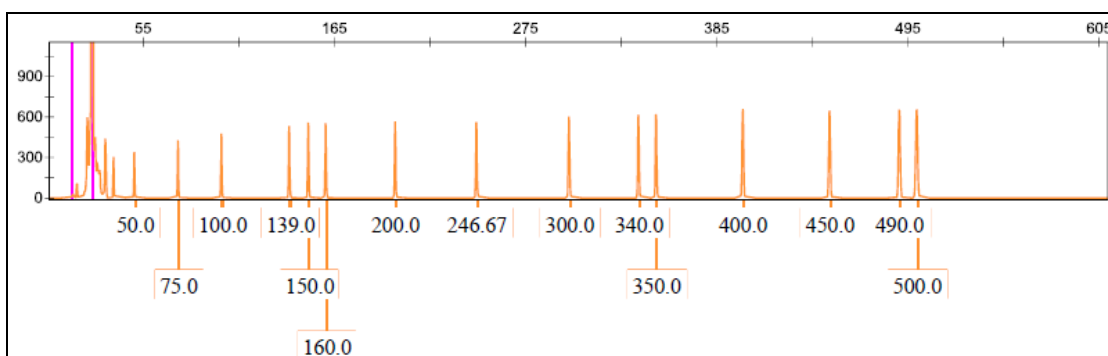
ตารางที่ 11 แสดงสภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	34
Annealing	58	30 วินาที	
Extention	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1

การทดสอบจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ด้วยวิธี Fragment analysis

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของจำนวนซ้ำ GGC จำนวน 2 ไมโครลิตรมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Fragment analysis โดยการผสมกับ HiDi-formamide 10 ไมโครลิตร และสารมาตรฐาน 500LIZ* 0.25 ไมโครลิตร ทำให้เสียสภาพที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นำตัวอย่างทดสอบด้วยเครื่องทดสอบสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 3130) โดยใช้โพลีเมอร์ POP4 สภาวะในการทดสอบ 15 กิโลวัตต์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ข้อมูลถูกเก็บด้วยซอฟต์แวร์ data collection software และวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ GeneMapper v3.2

500LIZ* คือ GenScan 500LIZ ซึ่งเป็นสเกลมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในการศึกษาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี Fragment analysis โดย 500LIZ จะมีขนาดมาตรฐานตั้งแต่ 35 – 500 เบส (ขนาดชิ้นส่วนมาตรฐานประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 246.67, 300.0, 340.0, 350.0, 400.0, 450.0, 490.0 และ 500 นิวคลีโอไทด์) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยขนาดมาตรฐานดังกล่าวจะสร้างจากดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA fragments) และติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ fifth dye



รูปที่ 3 แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน 500LIZ (GeneScan 500LIZ standard size) ที่ใช้ในการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธี Fragment analysis

การศึกษาตำแหน่งสไนป์ส ของยีน *RELN* และยีน *MET* โดยใช้วิธี **Bi-allelic ARMS PCR**

ตำแหน่งสไนป์สที่ใช้ในการศึกษาเลือกจากตำแหน่งสไนป์ส ที่มีการศึกษามาแล้ว หรือ สไนป์สจากฐานข้อมูล (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) โดยตำแหน่งสไนป์สที่เลือกต้องมีการศึกษาในกลุ่มประชากรเอเชีย (จีนและญี่ปุ่น) เพื่อให้ทราบถึงความถี่ของแอลลีลแต่ละตำแหน่ง ในการคัดเลือกสไนป์สที่ใช้ในการศึกษาจะต้องคำนึงถึงคือ

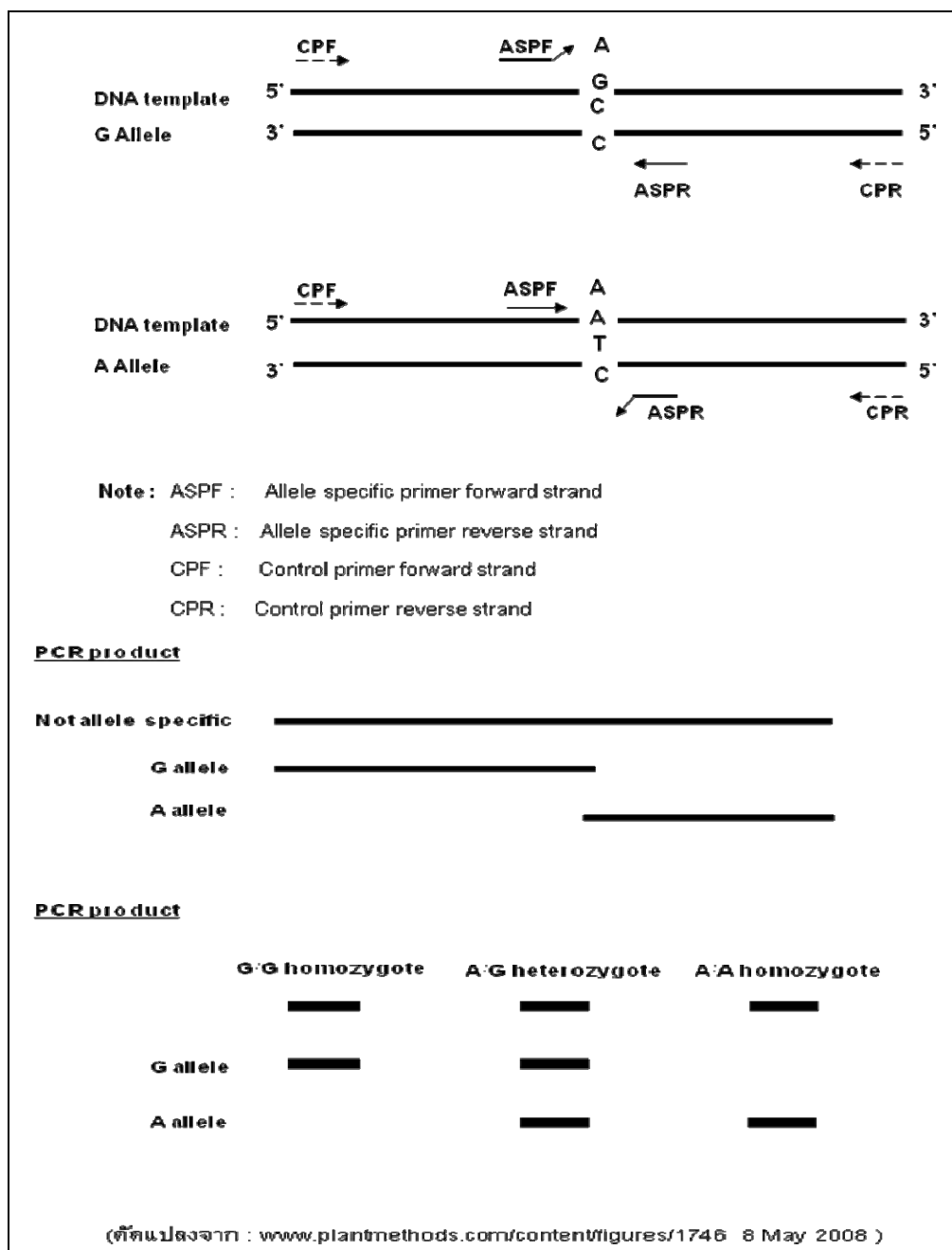
1. สไนป์สดังกล่าวมีการศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ (Previous study)
2. สไนป์สดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของยีน (Function)
3. สไนป์สดังกล่าวอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน เช่น สไนป์สอยู่บริเวณ โปรโมเตอร์ เอกซอน หรือส่งผลให้การดอะมิโนเปลี่ยน เป็นต้น

การออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับตำแหน่งสไนป์สที่ใช้ในการศึกษา

การออกแบบไพรเมอร์ของสไนป์สในแต่ละตำแหน่งใช้วิธี Biallelic-ARMS PCR technique ที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ 2 แบบในตำแหน่งเดียวกันได้ (Brightwell et al., 2002; Espinosa de los Monteros et al., 1998; Ferrie et al., 1992; Huang et al., 1992; Newton et al., 1989) โดยแต่ละปฏิกิริยาของ PCR ประกอบไปด้วย primer จำนวน 2 คู่ คือ Control Primers (CP) และ Allele Specific Primers (ASP) อย่างละคู่ โดยตำแหน่งปลาย 3' end ของแต่ละ ASP ถูกออกแบบให้เข้าคู่กัน แต่นิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งถัดมา -2 จากปลาย 3' end ของแต่ละ ASP จะถูกออกแบบให้อยู่ต่างกลุ่มกัน ดังแสดงในรูปที่ 4 ข้อมแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรเมอร์ดังนี้

- ความยาวของไพรเมอร์ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์
- ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอไม่ควรใช้ลำดับเบสที่เรียงตัวไม่ปกติ และพยายามหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurine หรือ polypyrimidine หรือเรียงตัวของเบสซ้ำๆกัน
- ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีเบส C+G content อยู่ระหว่างร้อยละ 50-60 ไม่ควรเลือกที่มี C+G content สูงเกินไป
- ไพรเมอร์ต้องมีเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายในดีเอ็นเอต้นแบบ
- หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี second structure คือต้องไม่จับกับลำดับเบสของตนเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีการเกิด Hairpin และเกิดการจับกันที่ปลาย 3' end ของไพรเมอร์

- ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55-70 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ของสปีส์ในแต่ละตำแหน่งโดยใช้วิธีเทคนิค Bi-allelic-ARMS PCR

การศึกษาสปีดด้วยวิธี **Biallelic-ARMS PCR** ของยีน **RELN** และยีน **MET**

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของการศึกษาสปีดแต่ละตำแหน่งของยีน **RELN** และยีน **MET** จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นเพื่อใช้การศึกษาครั้งนี้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1 X PCR buffer dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.1 ยูนิต สำหรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ปริมาณของไพรเมอร์และสาร adjuvant ขึ้นกับแต่ละปฏิกิริยาของสปีดแต่ละตำแหน่ง ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง MJ thermal cycler ภายใต้สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ annealing จะแตกต่างกันในสปีดแต่ละตำแหน่ง และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 34 รอบ และอุณหภูมิ final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปแยกด้วยเจลโพลีอะคริลามัดความเข้มข้นร้อยละ 6 ด้วย 1X TBE ที่สภาวะ 180 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้ UV transilluminator จีโนไทป์ของแต่ละรายจะอ่านตามขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และในทุกตัวอย่างจะมีแถบของ internal standard เพื่อตรวจสอบผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์

วิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP)

พีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นการศึกษาโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) เป็นวิธีที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) หรือการกลายพันธุ์ (mutation) ในจีโนม ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสทำให้เกิดตำแหน่งตัดที่จำเพาะต่อการตัดของเอนไซม์ ทำให้ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แตกต่างกัน สามารถแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ วิธีการนี้มีขั้นตอนในการศึกษา 3 ขั้นตอนหลักคือ

- 1) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะครอบคลุมกับบริเวณดังกล่าวที่มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา
- 2) ตัดผลพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อาจใช้เอนไซม์เพียงหนึ่งหรือหลายชนิดก็ได้
- 3) นำผลพีซีอาร์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเจล เปรียบเทียบรูปแบบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์

วิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีข้อจำกัดคือ ถ้าเอนไซม์ที่เลือกใช้ในการศึกษาตัดผลพีซีอาร์เมื่อมีแอลลีลแค่แบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น ทำให้แอลลีลอีกแบบมีขนาดเท่ากับขนาดของพีซีอาร์ที่ไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งยากต่อการอ่านและแปลผลการศึกษา โดยผลที่อ่านได้อาจเกิดจากการตัดไม่สมบูรณ์ (Incomplete cut) หรือเป็นอีกแอลลีลหนึ่งจริงๆ ก็เป็นไปได้ เช่น สนิปส์ rs607755 บนยีน *RELN* ที่มีแอลลีลแบบ A/G และตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII* ที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะเป็นเบส G ถ้า สนิปส์ดังกล่าวมีจีโนไทป์เป็น A/A เอนไซม์ *PvuII* จะไม่สามารถตัดผลพีซีอาร์ได้ ทำให้ขนาดผลพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดเดียวกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งทำให้เกิดการอ่านผลจีโนไทป์ผิดได้ในกรณีที่เกิดการตัดไม่สมบูรณ์ แต่ถ้า สนิปส์มีจีโนไทป์เป็น A/G หรือ G/G เอนไซม์ดังกล่าวสามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีเบส G ได้ ทำให้ได้ขนาดผลพีซีอาร์ที่เล็กลง สามารถอ่านจีโนไทป์ได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นในการศึกษา สนิปส์โดยใช้วิธีนี้ควรเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้มากกว่าหนึ่ง ตำแหน่ง และสามารถตัดจีโนไทป์ทั้ง 2 แบบได้ เพื่อป้องกันกรณีดังกล่าวที่อาจเกิดขึ้น หากไม่สามารถทำตามวิธีการดังกล่าวได้ ในการตัดแต่ละครั้งควรมีตัวอย่างที่มีแอลลีลที่สามารถตัดได้อย่างสมบูรณ์อยู่ในทุกครั้งที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ เพื่อเป็นการตรวจสอบความสามารถในการตัดของเอนไซม์นั้นๆ ว่าตัดได้สมบูรณ์หรือไม่

การศึกษา สนิปส์ของยีน *RELN* และยีน *MET* ด้วยวิธี PCR-RFLP

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ สนิปส์แต่ละตำแหน่งแล้วมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยมีส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด แสดงรายละเอียดในตารางที่ 12 จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิตามที่เอนไซม์แต่ละชนิดสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุด

จากนั้นตรวจสอบผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยโพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้นร้อยละ 6 ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ความต่างศักย์ 150 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด 5 นาที ตรวจสอบผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลที่มีแหล่งกำเนิดแสงยูวี และถ่ายรูปเจลด้วยโปรแกรม Gel image system with UV transilluminator

ตารางที่ 12 แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในการศึกษาครั้งนี้

สารเคมี	ตำแหน่งสนิปส์			
	ยีน <i>RELN</i>	ยีน <i>MET</i>		
	<i>PvuII</i>	<i>Hpy188I</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
	rs607755	rs10243024	rs38859	rs2299439
Recognition Site	5'...CAGCTG...3' 3'...GTCGAC...5'	5'...TCNGA...3' 3'...AGNCT...5'	5'...GACT...3' 3'...TCGA...5'	5'...TTAA...3' 3'...AATT...5'
Deionized water	6.8	6.8	6.8	6.8
10X Buffer (NEB)	1.0 (Buffer 2)	1.0 (Buffer 4)	1.0 (Buffer 4)	1.0 (Buffer 4)
Adjuvent	-	-	-	0.1M BSA
Restriction enzyme (5units/ul)	0.2	0.2	0.2	0.2
PCR product (ul)	2.0	2.0	2.0	2.0
ปริมาตรรวม (ul)	10.0	10.0	10.0	10.0
อุณหภูมิในการบ่ม (°C)	37	37	37	37
เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	16	16	16	16

การอ่านผลจีโนมไทป์ด้วยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในการศึกษาด้วยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *RELN* และยีน *MET* ตรวจสอบผลด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบ slap gel ขนาด 10x10 เซนติเมตร หนา 2 มิลลิเมตร โดยเริ่มจากการเตรียมกระจกให้สะอาด นำกระจกประกบกัน กันด้วย spacer และยึดทั้งสองด้านด้วยตัวหนีบ จัดวางกระจกในระนาบเดียวกันทั้งแผ่น จากนั้นเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ส่วนประกอบแสดงดังในตารางที่ 13 โดยผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ยกเว้น TEMED ด้วยการคนเบาๆ ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเติม TEMED เป็นลำดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปเทในกระจกที่เตรียมไว้ ระวังไม่ให้เกิด

ฟองอากาศในเจล และสอต comb เพื่อทำให้เกิดหลุมขนาด 25 ไมโครลิตร รอให้เจล polymerize ประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ ขณะรอเจล polymerize ควรคลุมเจลด้วยพลาสติกเพื่อลดการสัมผัสอากาศที่จะทำให้เจลแห้งและหดตัว

การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำโดยนำเจลที่พร้อมใช้งาน ประกอบกับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวตั้ง ยึดน๊อตทั้งสองด้านให้สมดุลกัน เพื่อให้แรงกดทับเจลทั้งสองด้านสม่ำเสมอและป้องกันกระจกแตก นำเจลไปวางใน chamber อิเล็กโตรโฟรีซิส เต็ม 1XTBE บัฟเฟอร์ให้ท่วมขดลวดนำไฟฟ้า จากนั้นทำความสะอาดหลุมสำหรับโหลดตัวอย่าง ให้สะอาดด้วยการฉีดไล่บัฟเฟอร์ด้วยเข็มฉีดยา 1-2 ครั้ง โหลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผสมกับ loading dye อัตราส่วน 5:1 ลงในหลุม ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย เมื่อโหลดตัวอย่างเสร็จ ควรตรวจสอบระดับบัฟเฟอร์ให้อยู่ในระดับที่ทำให้กระแสไฟฟ้าครบวงจร จากนั้นประกอบสายไฟเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ตั้งค่าความต่างศักย์ 150 โวลต์ เวลา 60 นาทีหรือจนกว่า loading dye ไกล่ตจากเจลประมาณ 1 เซนติเมตร เมื่อครบเวลาย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลที่มีแหล่งกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจลด้วยโปรแกรม gel image system with transilluminator

ตารางที่ 13 แสดงส่วนประกอบเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 สำหรับ 1 เจล

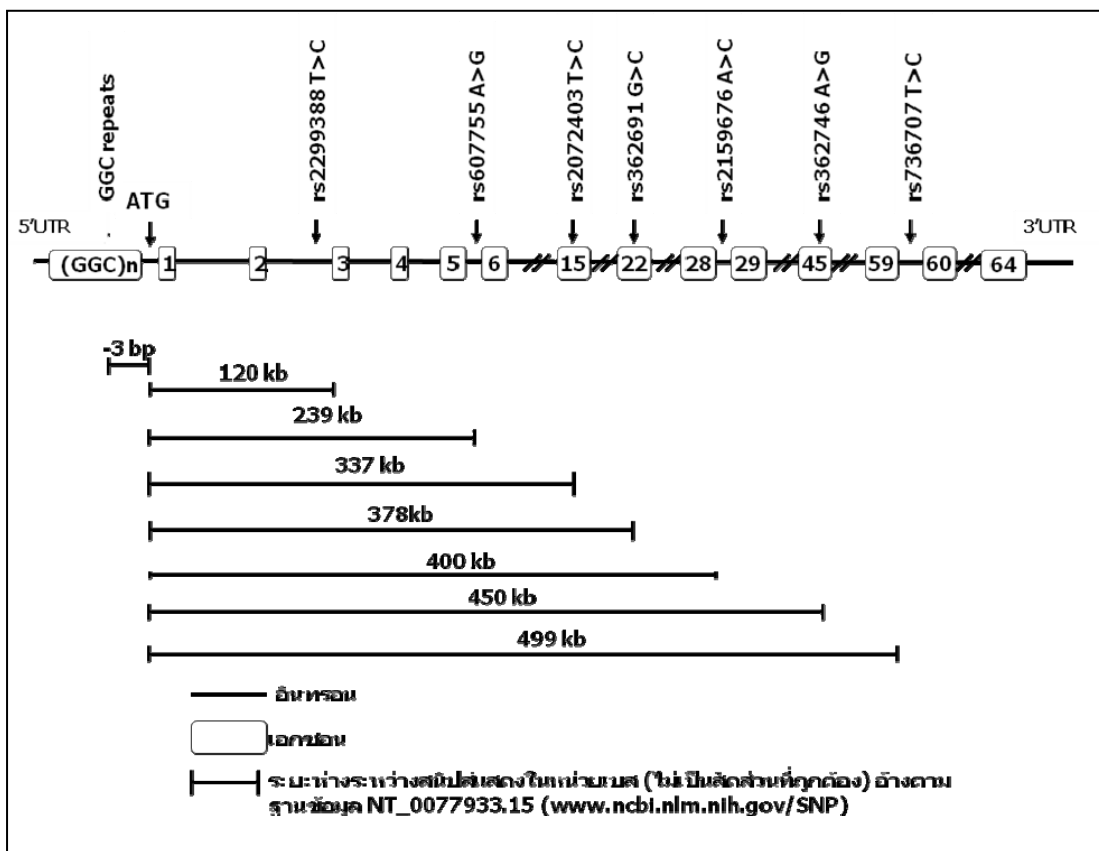
ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
40% w/v Acrylamide / Bis solution	1.5
10X TBE buffer	1.0
Glycerol	1.0
Distilled water	6.5
25% APS	0.02
TEMED (เติมลำดับสุดท้าย)	0.02

การศึกษาตำแหน่งสลิปส์ต่าง ๆ บนยีน *RELN*

ตำแหน่งสลิปส์ที่สนใจศึกษาและเหตุผลในการเลือกศึกษาสลิปส์ดังกล่าว แสดงรายละเอียดในตารางที่ 14 โดยระยะห่างของสลิปส์แต่ละตำแหน่งแสดงในรูปที่ 5

ตารางที่ 14 แสดงตำแหน่งสลิปส์ในการศึกษายีน *RELN* พร้อมเหตุผลในการศึกษา

สลิปส์	ตำแหน่ง	ความถี่ แอลลีล	เหตุผลในการศึกษา
rs2299388 (C/T)	Intron 2	C:0.389 T:0.611	เป็น Tag SNP ซึ่งเป็นตัวแทนของสลิปส์บริเวณใกล้เคียง เพื่อให้สลิปส์ที่ศึกษาครอบคลุมทั่วทั้งยีน
rs607755 (A/G)	Intron 5	A:0.593 G:0.407	เป็นสลิปส์บริเวณอินทรอน 5 บริเวณ Splicing junction
rs2072403 (C/T)	Exon 15	C:0.136 T:0.864	เป็นสลิปส์ที่เลือกศึกษาเพื่อให้ครอบคลุมทั้งยีนและสามารถศึกษา Linkage disequilibrium (LD)
rs362691 (C/G)	Exon 22	C:0.122 G:0.878	พบความสัมพันธ์ของความถี่ของแอลลีล G สูงในผู้ป่วยที่มีภาวะออทิซึมเทียบกับกลุ่มคนปกติ
rs2159676 (A/C)	Intron 28	A:0.512 C:0.488	เป็น Tag SNP ซึ่งเป็นตัวแทนของสลิปส์บริเวณใกล้เคียง เพื่อให้สลิปส์ที่ศึกษาครอบคลุมทั่วทั้งยีน
rs362746 (A/G)	Exon 45	G:0.200 A:0.800	เป็นสลิปส์ที่เลือกศึกษาเพื่อให้ครอบคลุมทั้งยีนและสามารถศึกษา Linkage disequilibrium (LD)
rs736707 (C/T)	intron 59	C:0.422 T:0.578	พบความสัมพันธ์ของความถี่ของแอลลีล C สูงในผู้ป่วยที่มีภาวะออทิซึมเทียบกับกลุ่มคนปกติในประชากรจีน



รูปที่ 5 แสดงตำแหน่ง SNP และระยะห่างของ SNP แต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* ที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาสลิปส์บนยีน *RELN*

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาจีโนไทป์ของสลิปส์ตำแหน่งต่างๆ บนยีน *RELN* แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ในตารางที่ 15 สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสลิปส์ต่างๆ บนยีน *RELN* ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 16-22 และรูปแสดงผลของพีซีอาร์ในรูปที่ 6-12

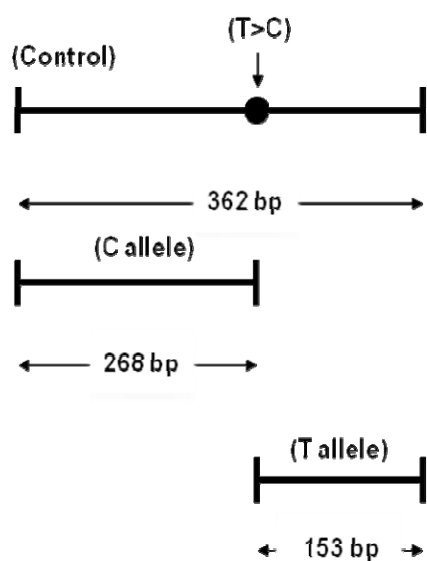
ตารางที่ 15 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับศึกษาจีโนไทป์ของสลิปส์ของยีน *RELN* โดยไพรเมอร์ทั้งหมดออกแบบโดยการศึกษาคั้งนี้

สลิปส์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5'-3')	วิธีการศึกษา
rs2299388 (C/T)	RELN388F	5'- GAAATTCAGCCTCAAACCGAGCAAGC -3'	Biallelic- ARMS PCR
	RELN388R	5'- TTATGGAGGGTGATCTGGATGGACAG -3'	
	RELN388TF	5'- CGTAAATGAGAACTCCACATGAAATGGT -3'	
	RELN388CR	5'- GTAGATGAAGATTCTGAAATGATGTGGCAG -3'	
rs607755 (A/G)	RELN755F	5'- GCAGTCTACATTAAGCCCAGTTCC -3'	RFLP; <i>PvuII</i>
	RELN755R	5'- CTTCTAGGTGTTTAAACCGCAGAGC -3'	
rs2072403 (C/T)	RELN403F	5'-AGCTGGTCAGACTTTAGTGAAAGAG-3'	Biallelic- ARMS PCR
	RELN403R	5'-TCTCAGAGAGAATGTA CTACCCAC-3'	
	RELN403TF	5'-GTTCTGGTTTTATTAGTGTCAGCTTGTA-3'	
	RELN403CR	5'-AGCGCCCATGGTTGGTAGAACAC-3'	
rs362691 (C/G)	RELN691F	5'-AGTAACCGACTCATTGAGTTCTCCC-3'	Biallelic- ARMS PCR
	RELN691R	5'-CACCTGAGGAAAACAGAAGCTGGGT-3'	
	RELN691CF	5'-CTCACCAAGTTTTCTGGGGAAGACCC-3'	
	RELN691GR	5'-ACACAGTGGAGGAGATCATAGGTC-3'	
rs2159676 (A/C)	RELN676F	5'- CCCTAAATATCCTGACACAATCAGTATGC-3'	Biallelic- ARMS PCR
	RELN676R	5'- ACCCACATACACACAACATCAACATTGC-3'	
	RELN7676CF	5'- ACAAGAAATCTCCCCACCAAATTATACC-3'	
	RELN676AR	5'-TGTGGGAAGTGCAGAAATCCTGTGAATG-3'	
rs362746 (A/G)	RELN746F	5'-CAGTTCTGAGCAGGCCAACAGATC-3'	Biallelic- ARMS PCR
	RELN746R	5'-CCTATGACAGAGGCAGCCACAGAA-3'	
	RELN746AF	5'-CCGTTACGTGGTCAGCACAGACTTT-3'	
	RELN746GR	5'-CTGTAGGAAGGAATCCTCATTACGTCT-3'	
rs736707 (C/T)	RELN707F	5'-GGCTGACAGGTTACACAAAGCTGC-3'	Biallelic- ARMS PCR
	RELN707R	5'-CCAATGTACACGTGGTCAATTGCC-3'	
	RELN707CF	5'-TCCCAGAGGCTGGAGGCAGTAC-3'	
	RELN707TR	5'-CAGTAGGTTGTTACTTCCATGGCTTCA-3'	

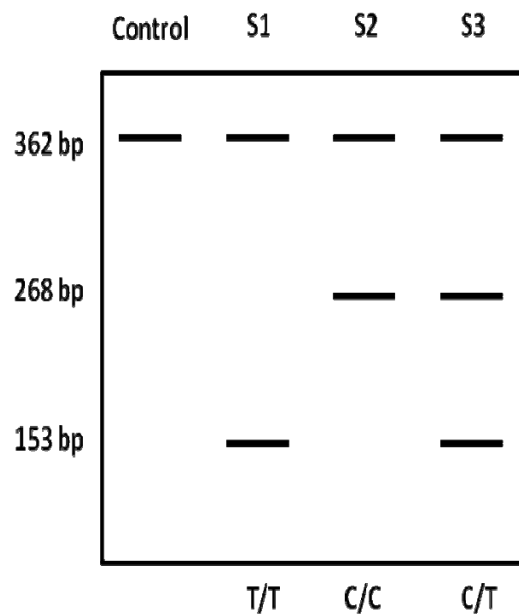
ตารางที่ 16 แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2299388 บริเวณอินทรอน 2 ของยีน *RELN*

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
RELN388F	0.15	2X TopTaq Master Mix (QIAGEN)	1.0 M Betaine	64	Control (362)
RELN388R	0.15				C allele (268)
RELN388TF	1.25				T allele (153)
RELN388CR	0.45				

(A)



(B)

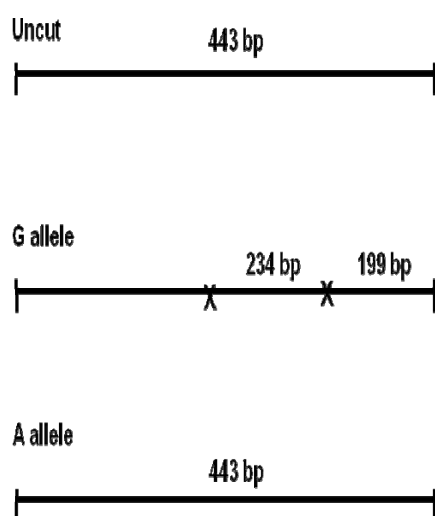


รูปที่ 6 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2299388 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 362 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ T/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 362, 153 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 362, 268 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ C/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 362, 268, 153 bp)

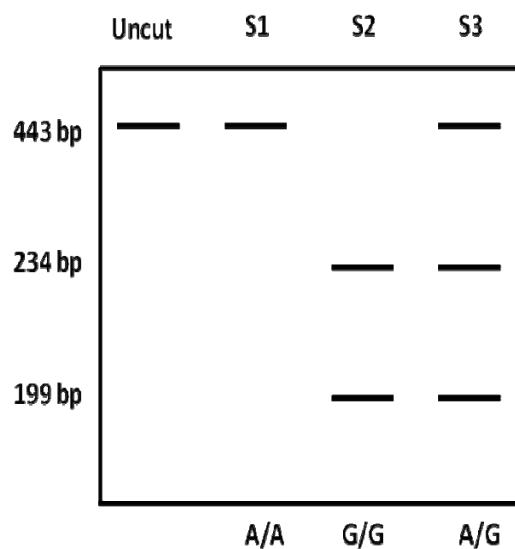
ตารางที่ 17 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs607755 บริเวณอินทรอน 5 (Splicing junction) ของยีน *RELN*

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์(bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
RELN755F	0.2	2X TopTaq Master Mix (QIAGEN)	-	60	Uncut 443 A allele (443) G allele (234,199)
RELN755R	0.2				

(A)



(B)

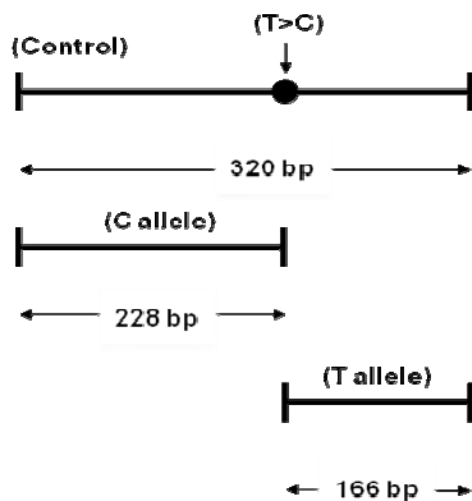


รูปที่ 7 แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* ของสไนป์ส์ rs607755 รูป (A) แสดงตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การอ่านผล จีโนไทป์ คือ S1 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 443 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 234, 199 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 443, 234, 199 bp)

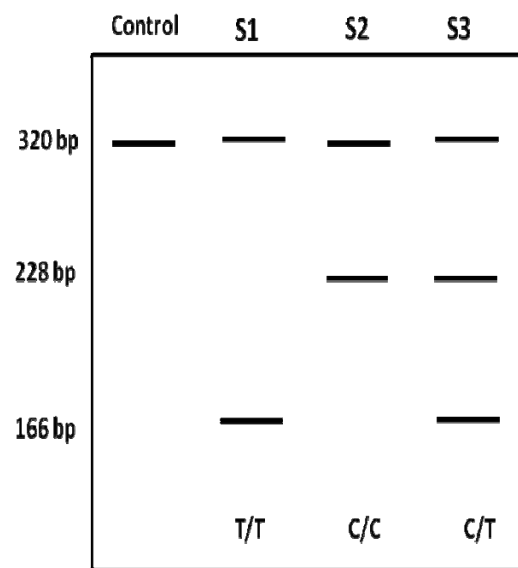
ตารางที่ 18 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2072403 บริเวณเอกซอน 15 ยีน RELN

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
RELN403F	0.10	1.5	1.0X Q-solution (QIAGEN)	60	Control (320)
RELN403R	0.15				C allele (228)
RELN403TF	0.20				T allele (166)
RELN403CR	0.10				

(A)



(B)

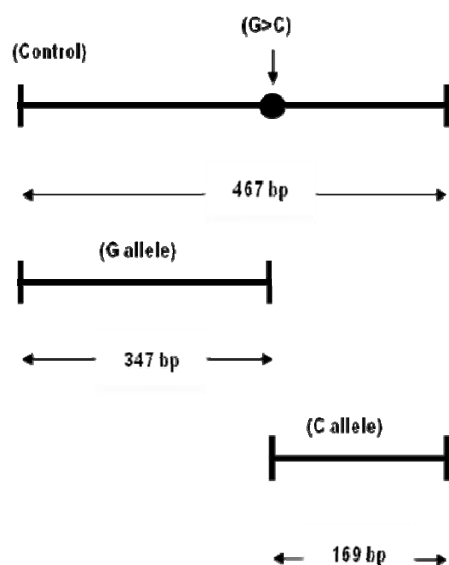


รูปที่ 8 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2072403 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 320 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ T/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 320, 166 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 320, 228 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ C/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 320, 228, 166 bp)

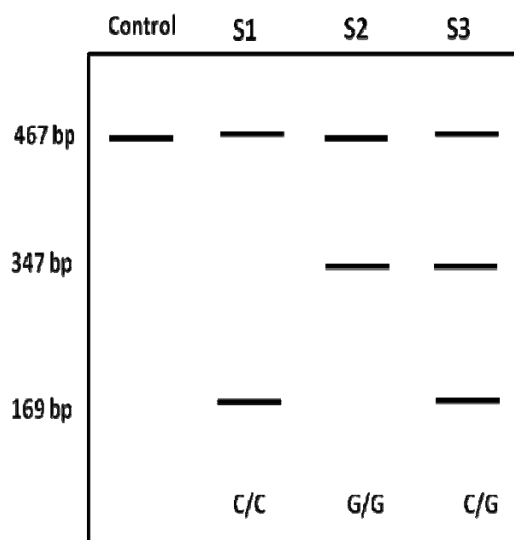
ตารางที่ 19 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs362691 บริเวณเอกซอน 22 ยีน *RELN*

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
RELN691F	0.10	2.0	10%DMSO	60	Control (467)
RELN691R	0.10				G allele (347)
RELN691CF	0.10				C allele (169)
RELN691GR	0.20				

(A)



(B)

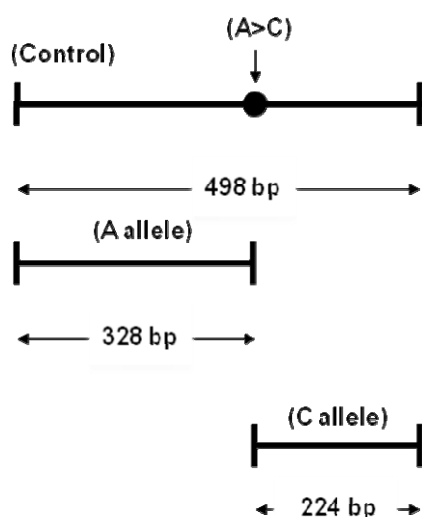


รูปที่ 9 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs362691 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 467 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 467, 169 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 467, 347 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ C/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 467, 347, 169 bp)

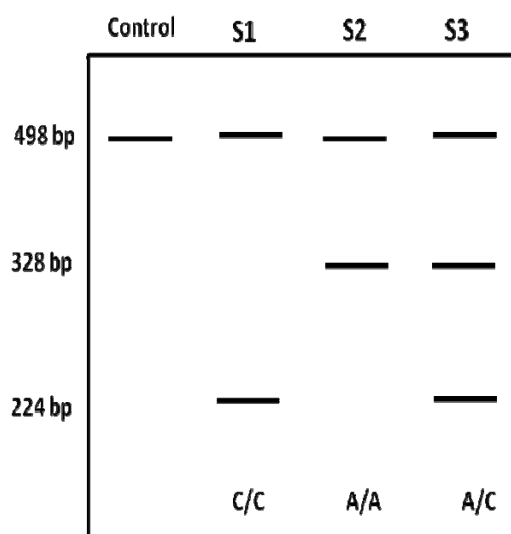
ตารางที่ 20 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs2159676 บริเวณอินทรอน 28 ของยีน *RELN*

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
RELN676F	0.20	1.0	1.0X	54	Control (498)
RELN676R	0.10		Q-solution		A allele (328)
RELN7676CF	0.10		(QIAGEN)		C allele (224)
RELN676AR	0.15				

(A)



(B)

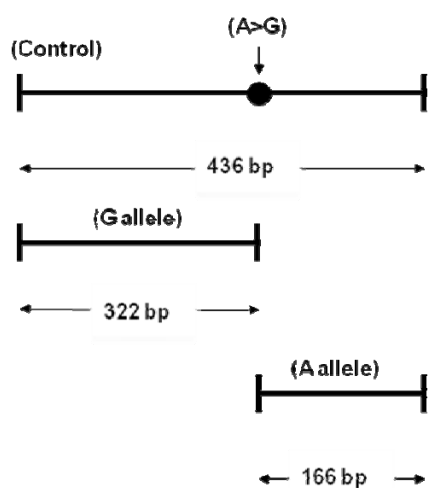


รูปที่ 10 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีโบลอสติกอาร์มพีซีอาร์ของสลิปส์ rs2159676 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 498 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 498, 224 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 498, 328 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 498, 328, 224 bp)

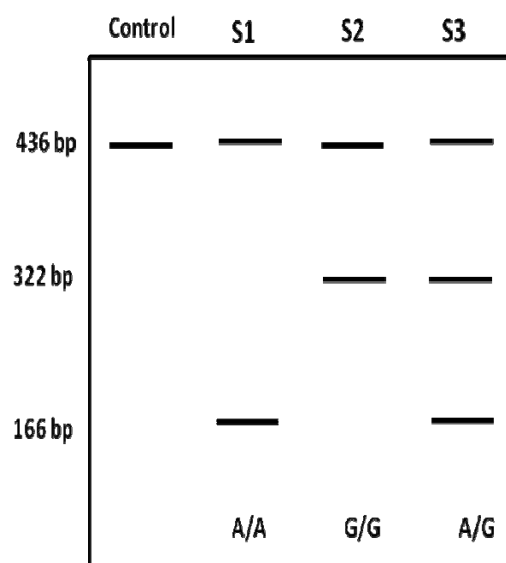
ตารางที่ 21 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs362746 บริเวณเอกซอน 45 ยีน *RELN*

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
RELN746F	0.25	1.0	1.0 M Betaine	60	Control (436)
RELN746R	0.25				G allele (322)
RELN746AF	0.25				A allele (166)
RELN746GR	0.25				

(A)



(B)

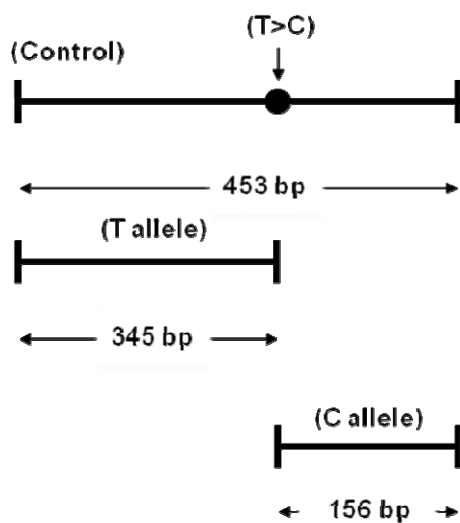


รูปที่ 11 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs362746 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 436 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 436, 166 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 436, 322 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 436, 322, 166 bp)

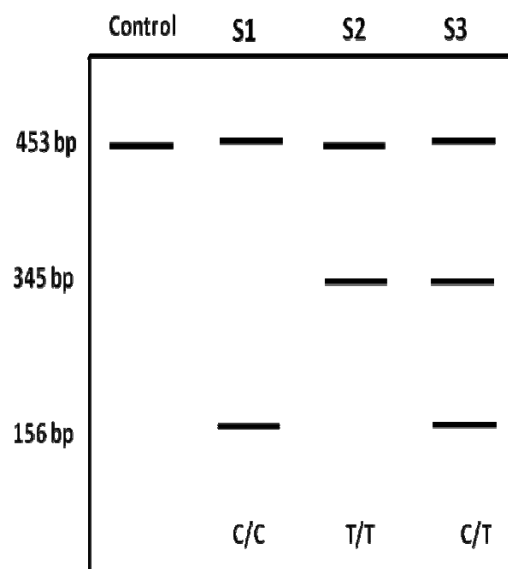
ตารางที่ 22 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs736707 บริเวณอินทรอน 59 ยีน RELN

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
RELN707F	0.10	1.5	-	62	Control (453)
RELN707R	0.10				T allele (345)
RELN707TF	0.25				C allele (156)
RELN707CR	0.10				

(A)



(B)



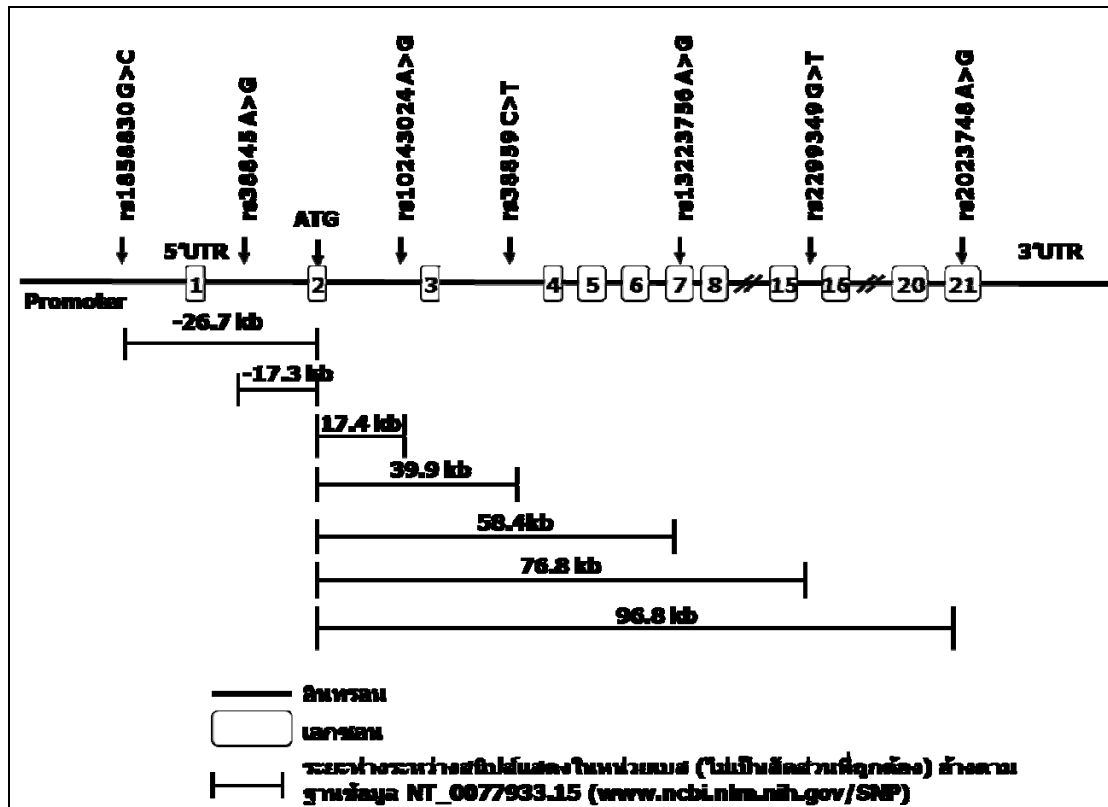
รูปที่ 12 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสลิปส์ rs736707 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 453 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 453, 156 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ T/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 453, 345 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ C/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 453, 345, 156 bp)

การศึกษาตำแหน่งสลิปส์ต่าง ๆ บนยีน *MET*

ตำแหน่งสลิปส์ที่สนใจศึกษาและเหตุผลในการเลือกศึกษาสลิปส์ดังกล่าวตั้งแสดงในตารางที่ 23 โดยระยะห่างของสลิปส์แต่ละตำแหน่งแสดงในรูปที่ 13

ตารางที่ 23 แสดงตำแหน่งสลิปส์ในการศึกษายีน *MET* พร้อมเหตุผลในการศึกษา

สลิปส์	ตำแหน่ง	ความถี่ แอลลีล	เหตุผลในการศึกษา
rs1858830 (C/G)	Promoter	C:0.500 G:0.500	<u>พบ</u> ความสัมพันธ์ของแอลลีล C และจีโนไทป์แบบ C/C ในผู้ป่วยออทิซึมสูงกว่าในกลุ่มควบคุม และจีโนไทป์ดังกล่าวยังลดการแสดงออกของโปรตีน <i>MET</i> ในผู้ป่วยออทิซึม
rs38845 (A/G)	Intron 1	A:0.356 G:0.644	<u>พบ</u> แอลลีล A มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูงกว่าแอลลีล G ในผู้ป่วยออทิซึม
rs10243024 (A/G)	Intron 2	A:0.200 G:0.800	เป็น Tag SNP ซึ่งเป็นตัวแทนของสลิปส์บริเวณใกล้เคียง เพื่อให้สลิปส์ที่ศึกษาครอบคลุมทั่วทั้งยีน
rs38859 (C/T)	Intron 3	C:0.430 T:0.570	เป็น Tag SNP ซึ่งเป็นตัวแทนของสลิปส์บริเวณใกล้เคียง เพื่อให้สลิปส์ที่ศึกษาครอบคลุมทั่วทั้งยีน
rs13223756 (A/G)	Exon 7	A:0.811 G:0.189	เป็นสลิปส์ที่เลือกศึกษาเพื่อให้ครอบคลุมทั้งยีนและสามารถศึกษา Linkage disequilibrium (LD)
rs2299439 (G/T)	Intron 15	G:0.589 T:0.411	เป็น Tag SNP ซึ่งเป็นตัวแทนของสลิปส์บริเวณใกล้เคียง เพื่อให้สลิปส์ที่ศึกษาครอบคลุมทั่วทั้งยีน
rs2023748 (A/G)	Exon 21	A:0.433 G:0.567	เป็นสลิปส์ที่เลือกศึกษาเพื่อให้ครอบคลุมทั้งยีนและสามารถศึกษา Linkage disequilibrium (LD)



รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งสไนป์ส์และระยะห่างของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *MET* ที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษา SNP บนยีน *MET*

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาจีโนมโทปีของ SNP ตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน *MET* แสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ในตารางที่ 24 สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ SNP ต่าง ๆ บนยีน *MET* ดังแสดงในตารางที่ 25-31 และรูปแสดงผลของพีซีอาร์ในรูปแบบที่ 14-20

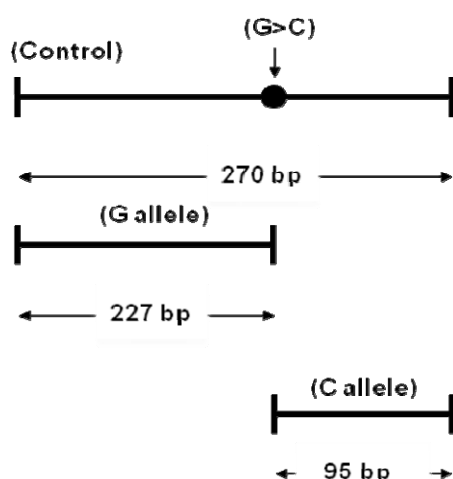
ตารางที่ 24 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับศึกษาจีโนมโทปีของ SNP ของยีน *MET*

SNP	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5'-3')	วิธีการศึกษา
rs1858830 (C/G)	MET830F	5'-ACGCGAGGCAGACAGACAC-3'	Biallelic-ARMS PCR
	MET830R	5'-CTCCGCATCTGCTCACAAAG-3'	
	MET830CF	5'-GGGCGGGGCGCTGGGCTCAGCTC-3'	
	MET830GR	5'-AGGGCCTCCGGGTCACCTGCGGACC-3'	
rs38845 (A/G)	MET845F	5'-CCACTGGGATATTGTCTCTGGGGATA-3'	Biallelic-ARMS PCR
	MET845R	5'-AAGCCCAAAGGTTTGCCTAGGTCCTAAG-3'	
	MET845AF	5'-ATGGCTCCAGCCAATGGCTACACTGTACA-3'	
	MET845GR	5'-AGATGGTTGTGAGACCACAGTCTCACGTC-3'	
rs10243024 (A/G)	MET3024F	5'-CTGATATCGCAAACGGGAAGGAG-3'	RFLP; <i>Hpy188I</i>
	MET3024R	5'-GTGACTTAGGGCACATATCTGGGC-3'	
rs38859 (C/T)	MET859F	5'-GTAGAGGGAGTGAATATGTAATCG-3'	RFLP; <i>AluI</i>
	MET859R	5'-TTAACAATGCCCGGGAATGAGG-3'	
rs13223756 (A/G)	MET756F	5'-GCTTATCTTGAACTCTGCTTGCTATTC-3'	Biallelic-ARMS PCR
	MET756R	5'-CAGTTAAAGTAAGTAAAGTGCCACCAG-3'	
	MET756AF	5'-TTATTTCAAATGGCCACGGGACAACA AAA -3'	
	MET756GR	5'-TTACCACATAGGAGAATGTACTGGAC-3'	
rs2299439 (G/T)	MET439F	5'-AAGGTTGTGCCACAGCACTCCAG-3'	RFLP; <i>MseI</i>
	MET439R	5'-CTACCACAGGAAAGTGAGAAGGC-3'	
rs2023748 (A/G)	MET748F	5'-TCCTACAACCCGAATACTGCCCAGA-3'	Biallelic-ARMS PCR
	MET748R	5'-TGGAAGAGCAAAGAATATCGATGGCC-3'	
	MET748AF	5'-T TCTGAACTGGTGTCCCGGATATCA CA -3'	
	MET748GR	5'-TGCTCCCCAATGAAAGTAGAGAAGGTC-3'	

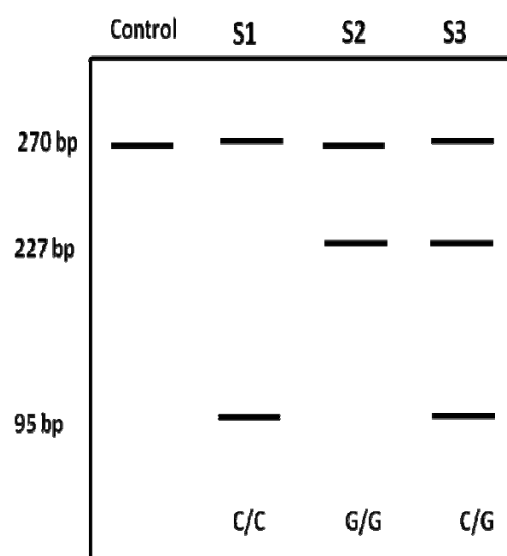
ตารางที่ 25 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs1858830 บริเวณโปรโมเตอร์ ยีน MET

ไพรมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
MET830F	0.5	1.0	10%DMSO	65	Control (270)
MET830R	4.0				G allele (227)
MET830CF	2.0				C allele (95)
MET830GR	0.05				

(A)



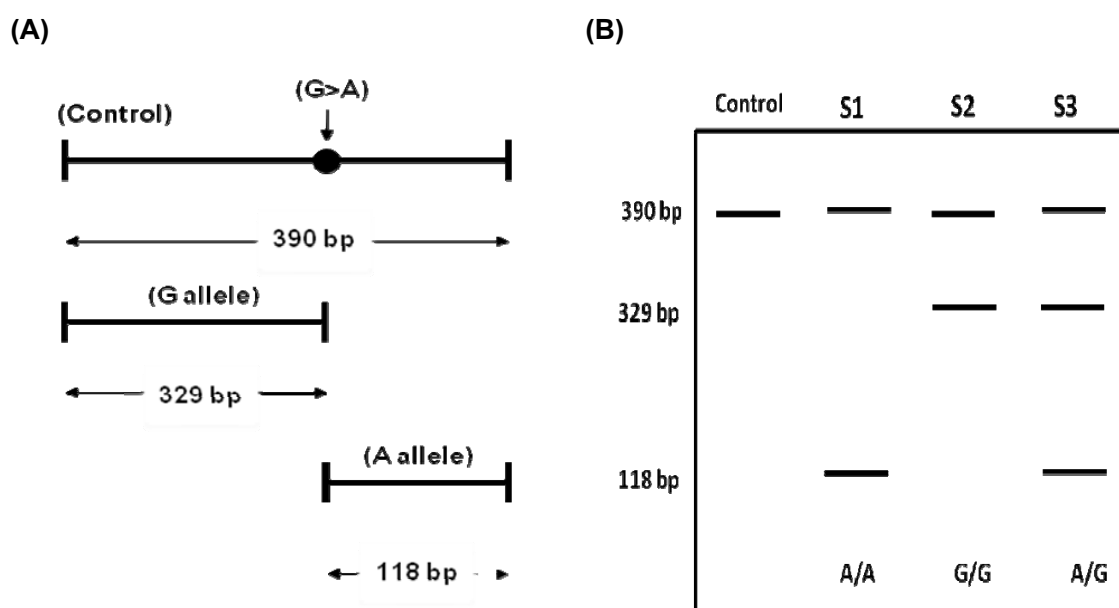
(B)



รูปที่ 14 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสลิปส์ rs1858830 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 270 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 270, 95 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 270, 227 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ C/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 270, 227, 95 bp)

ตารางที่ 26 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs38845 บริเวณอินทรอน 1 ยีน *MET*

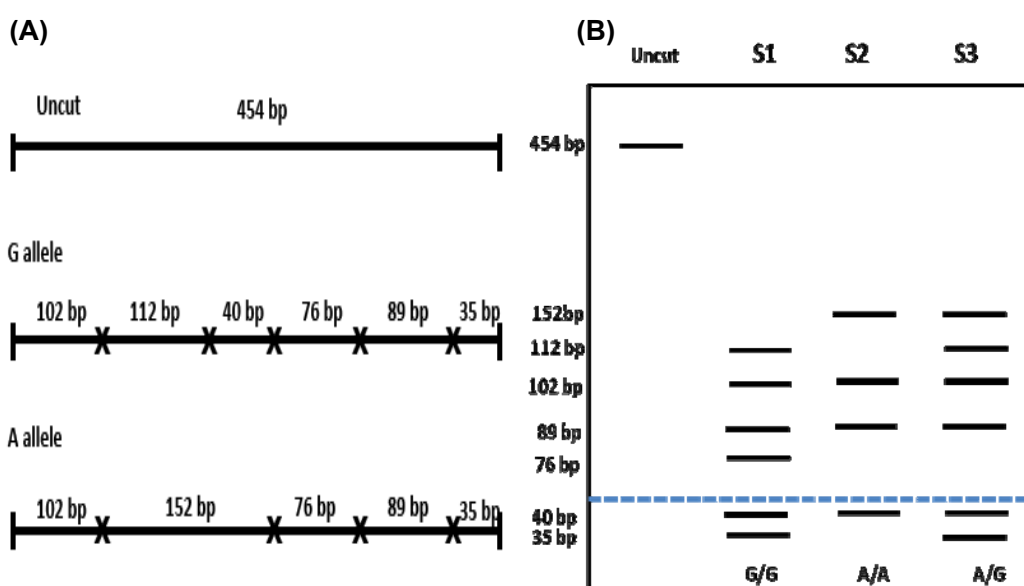
ไพรมเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
MET845F	0.1	1.0	-	62	Control (390)
MET845R	0.1				G allele (329)
MET845AF	0.25				A allele (118)
MET845GR	0.25				



รูปที่ 15 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs38845 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 390 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 390, 118 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 390, 329 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 390, 329, 118 bp)

ตารางที่ 27 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs10243024 บริเวณอินทรอน 2 ของยีน *MET*

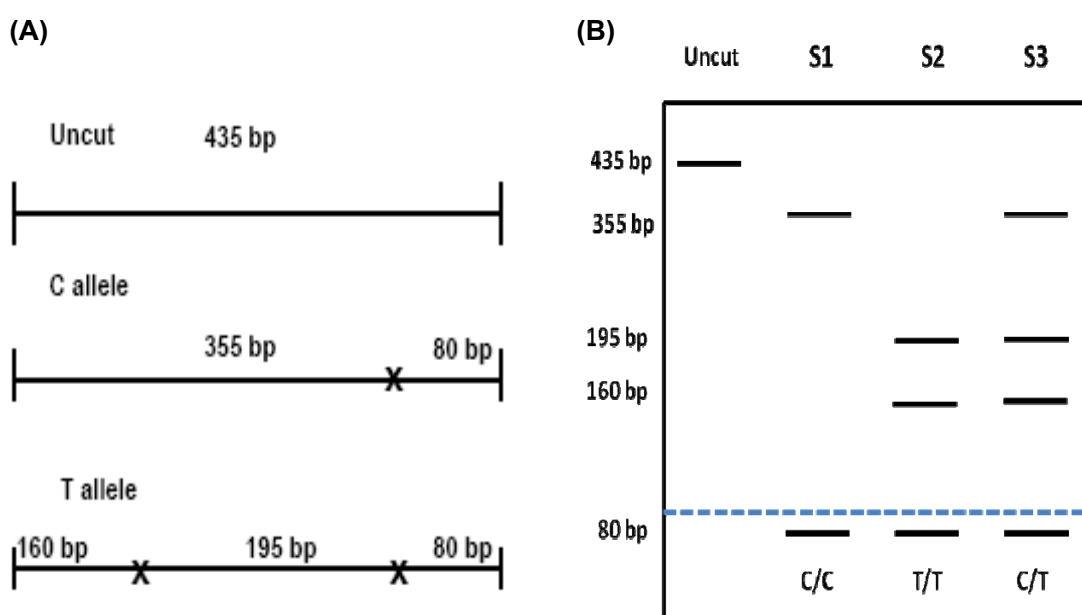
ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
MET3024F	0.25	1.5	-	58	Uncut 454 A allele (152, 102, 89, 76, 40) G allele (112, 102, 89, 76, 40, 35)
MET3024R	0.25				



รูปที่ 16 แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy188I* ของสไนป์ส์ rs10243024 รูป (A) แสดงตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy188I* รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ S1 คือขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (454 bp) การอ่านผลจีโนไทป์ คือ S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 112, 102, 89, 76, 40 และ 35 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 152, 102, 89, 76 และ 40 bp) S4 มีจีโนไทป์แบบ A/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 152, 112, 102, 89, 76, 40 และ 35 bp) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะขนาด 40 และ 35 คู่เบสจะไม่สามารถตรวจพบในเจลเนื่องจากมีขนาดเล็กและตกจากเจลเมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

ตารางที่ 28 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสลิปส์ rs38859 บริเวณอินทรอน 3 ของยีน *MET*

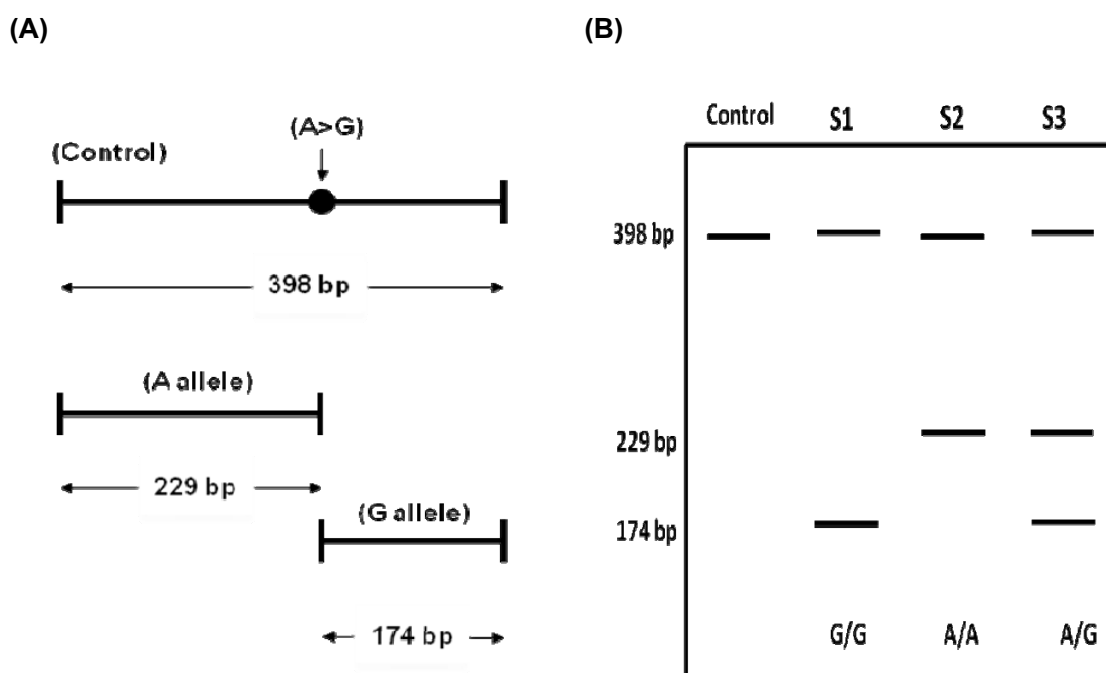
ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์(bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
MET859F	0.25	1.5	-	60	Uncut 435 C allele (355, 80) T allele (195, 160, 80)
MET859R	0.25				



รูปที่ 17 แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ของสลิปส์ rs38859 รูป (A) แสดงตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะครีลาไมด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ S1 คือ ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (435 bp) การอ่านผลจีโนไทป์ คือ S2 มีจีโนไทป์แบบ C/C (ผลพีซีอาร์ขนาด 355 และ 80 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ T/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 195, 160 และ 80 bp) S4 มีจีโนไทป์แบบ C/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 355, 195, 160 และ 80 bp) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะขนาด 80 คู่เบสจะไม่สามารถตรวจพบในเจลเนื่องจากมีขนาดเล็กและตกจากเจลเมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

ตารางที่ 29 แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs13223756 บริเวณเอกซอน 7 ยีน MET

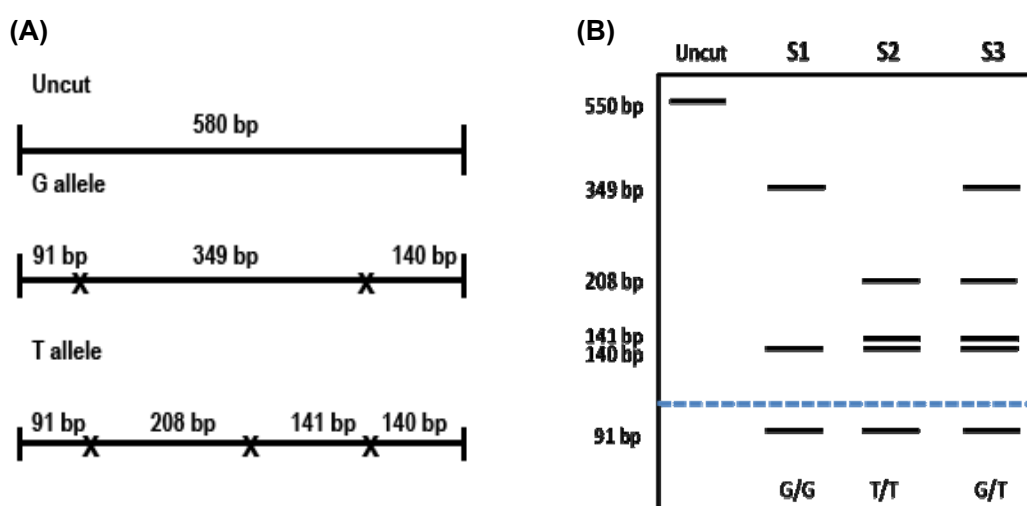
ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (µM)				
MET756F	0.2	1.0	Q-solution (Qiagen) 0.8X	60	Control (398)
MET756R	0.15				G allele (229)
MET756AF	0.25				A allele (174)
MET756GR	0.5				



รูปที่ 18 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิคอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs13223756 รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 398 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 398, 174 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 398, 229 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 398, 229, 174 bp)

ตารางที่ 30 แสดงสภาวะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2299439 บริเวณอินทรอน 15 ของยีน *MET*

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์(bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
MET439F	0.2	1.5	1M Betaine	60	Uncut 580 G allele (349, 140, 91) T allele (208, 141, 140, 91)
MET439R	0.2				

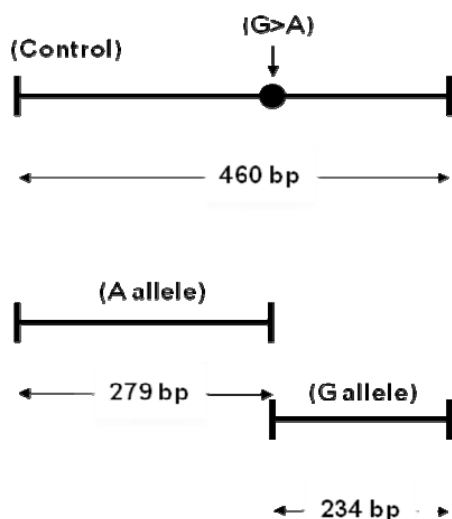


รูปที่ 19 แสดงผลพีซีอาร์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* ของสไนป์ส์ rs2299439 รูป (A) แสดงตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ S1 คือ ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (580 bp) การอ่านผลจีโนไทป์ คือ S2 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 349, 140 และ 91 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ T/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 208, 141, 140 และ 91 bp) S4 มีจีโนไทป์แบบ G/T (ผลพีซีอาร์ขนาด 349, 208, 141, 140 และ 91 bp) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะขนาด 141 และ 140 คู่เบสไม่สามารถมองเห็น 2 แถบแยกจากกันได้ เนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกันมาก และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 91 คู่เบสจะไม่สามารถตรวจพบในเจลเนื่องจากมีขนาดเล็กและตกจากเจลเมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

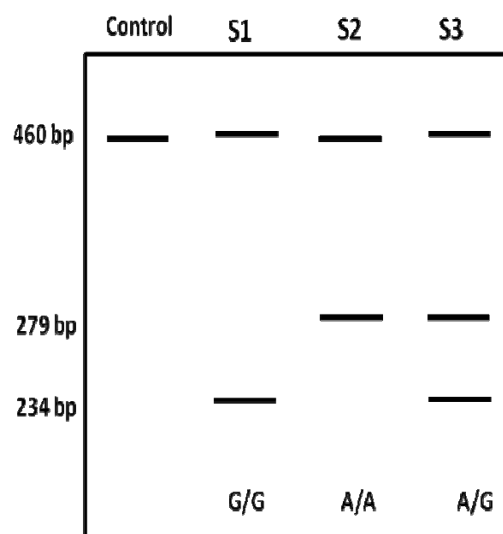
ตารางที่ 31 แสดงสถานะและขนาดของผลพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2023748 บริเวณเอกซอน 21 ยีน MET

ไพรเมอร์		MgCl ₂ (mM)	Adjuvant (Conc.)	อุณหภูมิ Annealing (°C)	ขนาดผลพีซีอาร์ (bp)
ชื่อ	ความเข้มข้น (μM)				
MET748F	0.2	1.0	-	62	Control (460)
MET748R	0.2				A allele (279)
MET748AF	0.25				G allele (234)
MET748GR	0.25				

(A)



(B)



รูปที่ 20 แสดงผลพีซีอาร์ออกแบบโดยวิธีไบแอลลีลิกอาร์มพีซีอาร์ของสไนป์ส์ rs2023748

รูป (A) แสดงผลพีซีอาร์ รูป (B) แสดงผลเจลโพลีอะคริลาไมด์ การอ่านผลจีโนไทป์ คือ Control มีขนาด 460 bp S1 มีจีโนไทป์แบบ G/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 460, 234 bp) S2 มีจีโนไทป์แบบ A/A (ผลพีซีอาร์ขนาด 460, 279 bp) S3 มีจีโนไทป์แบบ A/G (ผลพีซีอาร์ขนาด 460, 279, 234 bp)

การทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

ทำการยืนยันความถูกต้องของจำนวนซ้ำ GGC และแอลลีลในสไนป์ของยีน *RELN* และยีน *MET* โดยการทดสอบลำดับดีเอ็นเอในบางตัวอย่างของสไนป์แต่ละตำแหน่งที่เลือกมาศึกษา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่งที่ศึกษาตามสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละตำแหน่งตั้งเสนอมมาแล้วข้างต้น จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 6 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี gel purification ดังนี้

หลังจากแยกพีซีอาร์ด้วยเจลโพลีอะครีลาไมด์แล้ว ตัดเจลเฉพาะในตำแหน่งผลพีซีอาร์ที่ต้องการ ใส่ในหลอดที่เติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากเจล บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นดูดสารละลาย Elution buffer ใส่หลอดใหม่ เติม Elution buffer ใหม่จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่หลอดเดิม บ่มซ้ำที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดสาร Elution buffer รวมกันในหลอดเดียว เติมเอธานอลบริสุทธิ์ที่เย็นจำนวน 800 ไมโครลิตร แช่เย็นที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นตกตะกอนพีซีอาร์โดยนำไปปั่นตกที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอธานอลทิ้ง เติมเอธานอลร้อยละ 70 จำนวน 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นตกที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเอธานอลทิ้ง ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ละลายดีเอ็นเอโดยนำบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำพีซีอาร์เพื่อหาลำดับเบส

การทำพีซีอาร์เพื่อหาลำดับเบสของจำนวนซ้ำของ GGC และสไนป์ในตำแหน่งต่างๆที่ศึกษาของยีน *RELN* และ *MET* ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3-10 นาโนกรัม ไพรเมอร์ forward หรือ reverse 1.6 พิกโกโมล BigDye terminator v1.1 ready reaction premix 1X และ บัฟเฟอร์ BigDye terminator sequencing buffer 1X เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง MJ thermal cycler ภายใต้สภาวะ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ ตกตะกอนผลพีซีอาร์ด้วยวิธี Sodium acetate/ethanol ละลายพีซีอาร์ด้วยสารละลาย HiDi-formamide ปริมาตร 12 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปหาลำดับดีเอ็นเอด้วยเครื่องทดสอบสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI 3130)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

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

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

O_i = ความถี่ที่สังเกตได้ (an observed frequency)

E_i = ความถี่ที่คาดหวัง (ค่าทางทฤษฎี) (an expected frequency)

การวิเคราะห์ผลการศึกษาโดยใช้โปรแกรม PLINK v1.00 (Purcell et al., 2007)

โปรแกรม PLINK (Package: PLINK) เขียนขึ้นโดย Shaun Purcell ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จาก (URL: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) PLINK เป็นโปรแกรมที่ทำงานผ่าน command line mode โดยข้อมูลที่จะศึกษาจะต้องประกอบด้วยข้อมูลหรือผลของจีโนไทป์และตำแหน่งที่ตั้งของตำแหน่งที่ศึกษาซึ่งโปรแกรม PLINK สามารถวิเคราะห์ Association analysis และวิเคราะห์ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium ได้ ข้อมูลที่จะใช้วิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม PLINK จะต้องเป็นไฟล์ที่บันทึกลงในโปรแกรม excel และแปลงเป็นไฟล์นามสกุล .txt การเตรียมข้อมูลในการวิเคราะห์ผล จะต้องมีการเตรียมข้อมูลจีโนไทป์แต่ละสลิปส์ของทั้งกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมใช้โปรแกรม Excel ซึ่งจะประกอบด้วยข้อมูลทั้งหมดอย่างน้อย 7 คอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 21 และสร้างแผนที่ของตำแหน่งสลิปส์บนยีนโดยใช้โปรแกรม Notepad โดยสลิปส์ตำแหน่งแรกของแต่ละยีนกำหนดเป็นตำแหน่งอ้างอิง (ตั้งค่าที่ 100) และสลิปส์ตำแหน่งอื่นๆ เป็นระยะทางห่างจากตำแหน่งอ้างอิง ตั้งชื่อแผนที่สลิปส์เป็นไฟล์นามสกุล .txt ดังแสดงในรูปที่ 22

Untitled - Notepad														
File	Edit	Format	View	Help										
PS1-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	CT	CC	AG	AG	GG	
PS5-3	201	0	0	1	2	TT	CC	AA	CT	CG	AG	AA	AA	
PS7-3	201	0	0	2	2	TT	CG	AA	TT	GG	AA	AG	AG	
PS8-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	CT	CC	GG	AA	GG	
PS9-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AG	CT	CG	AG	AA	AA	
PS10-3	201	0	0	1	2	TT	CG	AA	CT	GG	GG	AG	AG	
PS11-3	201	0	0	1	2	TT	CG	AA	CT	CG	AG	GG	GG	
PS14-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	CT	GG	AA	AG	GG	
PS16-3	201	0	0	2	2	TT	CG	AA	CC	GG	AG	AG	AG	
PS19-3	201	0	0	1	2	TT	CG	AA	TT	GG	GG	AG	AG	
PS22-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	CT	CC	AA	AG	AG	
PS23-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	CT	CG	AA	AG	AG	
PS24-3	201	0	0	1	2	CT	GG	AG	CC	CC	GG	AA	AG	
PS26-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	TT	CG	AG	AG	GG	
PS27-3	201	0	0	2	2	TT	GG	AA	CT	CG	AA	GG	GG	
PS28-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	CT	CG	AG	AG	AG	
PS31-3	201	0	0	1	2	TT	GG	AA	TT	CG	GG	AA	AA	
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	-----							(7)	-----

รูปที่ 21 แสดงข้อมูล (input) นามสกุล .txt ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมแฮพลอวิ

- (1) Pedigree name เป็นการตั้งค่าของครอบครัว (family ID) เช่น PS1-3 เป็นต้น
- (2) Individual ID เป็นการตั้งค่าหมายเลขประจำตัวของแต่ละบุคคลในการศึกษา โดยกำหนดให้ผู้ป่วยมีรหัสเป็น 201 พ่อผู้ป่วยเป็น 101 และแม่ผู้ป่วยเป็น 102
- (3) Parental ID เป็นการตั้งค่าของบิดา (Paternal ID) กำหนดเป็น 0 ในกรณีการศึกษาแบบ Association based case control
- (4) Maternal ID เป็นการตั้งค่าของมารดา (Maternal ID) กำหนดเป็น 0 ในกรณีการศึกษาแบบ Association based case control
- (5) Sex เป็นการตั้งค่าของเพศ ผู้ชายกำหนดเป็น 1 และผู้หญิงกำหนดเป็น 2
- (6) Affection status เป็นการตั้งค่าสถานะ กลุ่มควบคุมกำหนดเป็น 1 และกลุ่มผู้ป่วยกำหนดเป็น 2
- (7) Marker genotype จีโนไทป์ของแต่ละสลิปแยกตามคอลัมน์ โดยกำหนดเป็น A T C และ G หรือ 1 2 3 และ 4 และใช้ตัวเลข 0 0 แทนมาร์คเกอร์ที่ไม่มีผลจีโนไทป์

(1)	(2)	(3)	(4)
7	rs1858830_MET	0	100
7	rs38845_MET	0	9463
7	rs10243024_MET	0	34264
7	rs38859_MET	0	66755
7	rs13223756_MET	0	85233
7	rs2299439_MET	0	103671
7	rs2023748>MET	0	123683

รูปที่ 22 แสดงแผนที่ (map) ที่ระบุถึงตำแหน่งของสลิปส์ที่ต้องการศึกษา (1) แสดงตำแหน่งโครโมโซมของสลิปส์ที่ศึกษา (2) แสดงชื่อของสลิปส์ (3) แสดงช่วงระยะเริ่มกำหนดเป็น 0 (4) แสดงระยะห่างของลำดับคู่เบส

นอกจากนี้โปรแกรม PLINK ยังสามารถวิเคราะห์ค่าต่างๆทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมได้หลายค่า ดังนี้

1. Hardy-Weinberg Equilibrium
2. Association analysis (association, model, logistic, dominant, recessive)
3. Family base association โดยวิธี TDT

การใช้โปรแกรม PLINK วิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. ผู้ใช้งานต้องเปิดหน้าต่าง Command Prompt โดยเลือกไปที่ Start > Accessories > Command Prompt จะปรากฏหน้าต่าง Command Prompt ขึ้นมา
2. ขั้นตอนต่อไปผู้ใช้งานเปลี่ยนตำแหน่งการทำงานไปที่ drive C: หรือ drive อื่นที่เก็บข้อมูลข้างต้นไว้ โดยใช้คำสั่ง cd ตามด้วยไฟล์ที่เก็บข้อมูลไว้
3. จากนั้นป้อนคำสั่งในการหาค่าทางสถิติแบบต่างๆ โดยเริ่มจากคำสั่ง plink โดยกำหนดให้ใส่ชื่อไฟล์ที่ต้องการศึกษาหลังคำสั่ง -ped ใส่ชื่อแผนที่ยีนที่ศึกษาหลังคำสั่ง -map จากนั้นใส่คำสั่งทางสถิติที่ต้องการศึกษา และใส่ชื่อไฟล์ผลการศึกษาหลังคำสั่ง -out ดังแสดงตัวอย่างการศึกษายีน MET ในรูปแบบต่างๆทางสถิติ โดยใช้ไฟล์ชื่อ MET_CASE_All188.txt ในการศึกษาแบบ population based case control และไฟล์ชื่อ MET_TDT_All160.tx ในการศึกษาแบบ Family based association และแผนที่ชื่อ map_MET.txt ในตารางที่ 32

4. เมื่อป้อนคำสั่งเรียบร้อยแล้ว กด Enter ผลการวิเคราะห์จะแสดงรายละเอียดของการใช้คำสั่ง และผลการวิเคราะห์ทางสถิติในหน้าจอของ command prompt ดังแสดงในรูปที่ 23
5. คำสั่งทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาจะแสดงผลออกมาในไฟล์ของ .log ซึ่งแสดงผลเหมือนกับในหน้าจอ command prompt ส่วนผลการศึกษสามารถเปิดอ่านผลได้โดยโปรแกรม notepad ดังแสดงตัวอย่างผลการศึกษาในบางคำสั่งในรูปที่ 24-26

ตารางที่ 32 แสดงคำสั่งในการหาค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม PLINK

สถิติที่ต้องการศึกษา	คำสั่งบน command prompt
Hardy-Weinberg Equilibrium test	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -hardy -nonfounders - out MET_HWE_test
Association	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -assoc -ci 0.95 -out MET_Case_all188_assoc
Model	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -model -ci 0.95 -out MET_Case_all188_model
Logistic (additive)	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -logistic -ci 0.95 -out MET_Case_all188_logistic
Logistic (dominant)	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -logistic -dominant -ci 0.95 -out MET_Case_all188_dom
Logistic (recessive)	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -logistic -recessive -ci 0.95 -out MET_Case_all188_rec
Fisher	Plink -ped MET_CASE_All188.txt -map map_MET.txt -model --fisher -ci 0.95 -out MET_Case_all188_fisher
TDT	Plink -ped MET_TDT_All160.txt -map map_MET.txt -tdt -ci 0.95 -out MET_TDT_All160
--ci 0.95	ช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio จากค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุด

หมายเหตุ

1. assoc ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของแอลลีลที่แตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
2. model ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม

3. logistic ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์โดยจะทำการคำนวณ minor allele และ major allele เพื่อใช้ในการคำนวณ model ต่างๆ additive model, dominant model และ recessive model
4. fisher ใช้ในการศึกษาในกรณีที่มีจีโนไทป์แบบใดแบบหนึ่งน้อยกว่า 5
5. TDT ใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นโรค

```

c:\ Command Prompt
C:\Documents and Settings\Toshiba M200>cd\
C:\>cd C:
C:\>cd Analyse_MET_JAN2011
C:\Analyse_MET_JAN2011>plink --ped MET_CASE_All188.txt --map map_MET.txt --hardy
--nonfounders --ci 0.95 --out MET_HWE_Test
-----
          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... Problem connecting to web

Writing this text to log file [ MET_HWE_Test.log ]
Analysis started: Sat Jan 08 13:32:39 2011

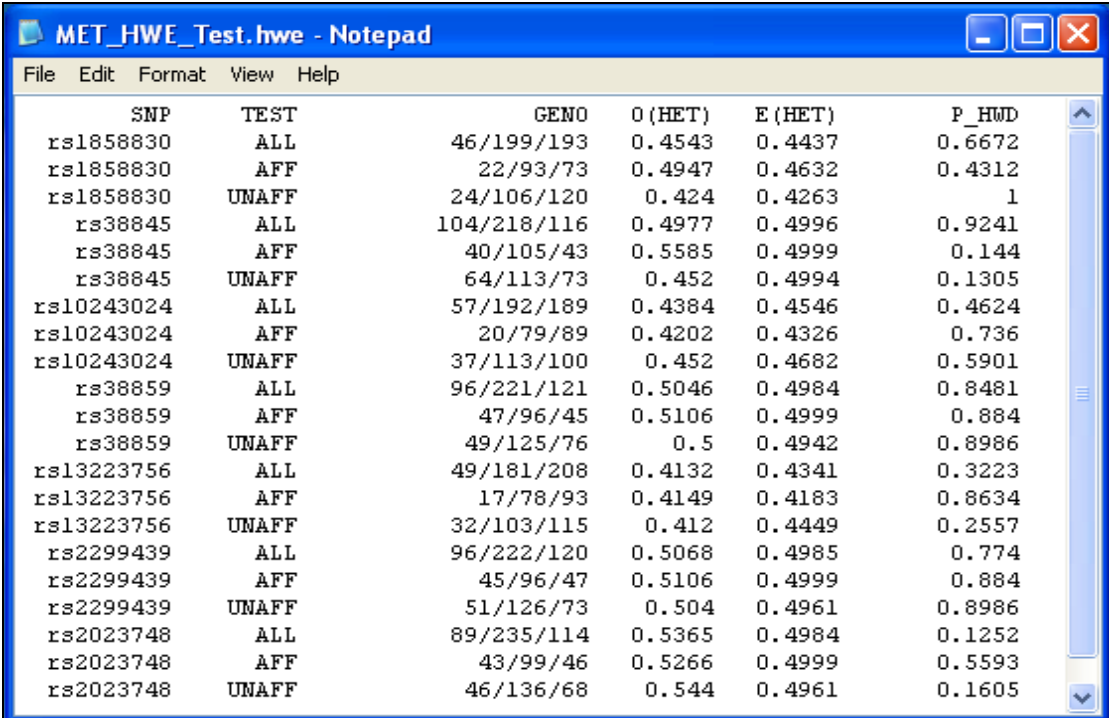
Options in effect:
  --ped MET_CASE_All188.txt
  --map map_MET.txt
  --hardy
  --nonfounders
  --ci 0.95
  --out MET_HWE_Test

7 <of 7> markers to be included from [ map_MET.txt ]
438 individuals read from [ MET_CASE_All188.txt ]
438 individuals with nonmissing phenotypes
Assuming a disease phenotype (1=unaff, 2=aff, 0=miss)
Missing phenotype value is also -9
188 cases, 250 controls and 0 missing
334 males, 104 females, and 0 of unspecified sex
Before frequency and genotyping pruning, there are 7 SNPs
438 founders and 0 non-founders found
0 of 438 individuals removed for low genotyping < MIND > 0.1 >
Writing Hardy-Weinberg tests (all individuals) to [ MET_HWE_Test.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 7 SNPs

Analysis finished: Sat Jan 08 13:32:39 2011

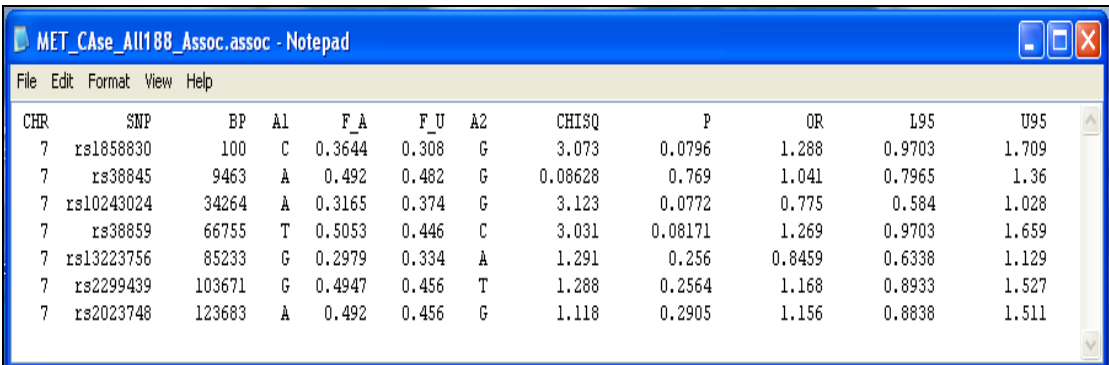
```

รูปที่ 23 แสดงการทำงานบน command line mode เพื่อเรียกใช้โปรแกรม PLINK ในการวิเคราะห์หาค่าสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium)



SNP	TEST	GENO	O (HET)	E (HET)	P_HWD
rs1858830	ALL	46/199/193	0.4543	0.4437	0.6672
rs1858830	AFF	22/93/73	0.4947	0.4632	0.4312
rs1858830	UNAFF	24/106/120	0.424	0.4263	1
rs38845	ALL	104/218/116	0.4977	0.4996	0.9241
rs38845	AFF	40/105/43	0.5585	0.4999	0.144
rs38845	UNAFF	64/113/73	0.452	0.4994	0.1305
rs10243024	ALL	57/192/189	0.4384	0.4546	0.4624
rs10243024	AFF	20/79/89	0.4202	0.4326	0.736
rs10243024	UNAFF	37/113/100	0.452	0.4682	0.5901
rs38859	ALL	96/221/121	0.5046	0.4984	0.8481
rs38859	AFF	47/96/45	0.5106	0.4999	0.884
rs38859	UNAFF	49/125/76	0.5	0.4942	0.8986
rs13223756	ALL	49/181/208	0.4132	0.4341	0.3223
rs13223756	AFF	17/78/93	0.4149	0.4183	0.8634
rs13223756	UNAFF	32/103/115	0.412	0.4449	0.2557
rs2299439	ALL	96/222/120	0.5068	0.4985	0.774
rs2299439	AFF	45/96/47	0.5106	0.4999	0.884
rs2299439	UNAFF	51/126/73	0.504	0.4961	0.8986
rs2023748	ALL	89/235/114	0.5365	0.4984	0.1252
rs2023748	AFF	43/99/46	0.5266	0.4999	0.5593
rs2023748	UNAFF	46/136/68	0.544	0.4961	0.1605

รูปที่ 24 แสดงผลการทดสอบค่า Hardy-Weinberg Equilibrium โดยใช้โปรแกรม PLINK



CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR	L95	U95
7	rs1858830	100	C	0.3644	0.308	G	3.073	0.0796	1.288	0.9703	1.709
7	rs38845	9463	A	0.492	0.482	G	0.08628	0.769	1.041	0.7965	1.36
7	rs10243024	34264	A	0.3165	0.374	G	3.123	0.0772	0.775	0.584	1.028
7	rs38859	66755	T	0.5053	0.446	C	3.031	0.08171	1.269	0.9703	1.659
7	rs13223756	85233	G	0.2979	0.334	A	1.291	0.256	0.8459	0.6338	1.129
7	rs2299439	103671	G	0.4947	0.456	T	1.288	0.2564	1.168	0.8933	1.527
7	rs2023748	123683	A	0.492	0.456	G	1.118	0.2905	1.156	0.8838	1.511

รูปที่ 25 แสดงผลการทดสอบค่าโดยใช้คำสั่ง assoc โดยใช้โปรแกรม PLINK

CHR	SNP	A1:A2	T:U_TDT	OR_TDT	L95	U95	CHISQ_TDT	P_TDT
7	rs1858830	C:G	72:85	0.8471	0.6188	1.159	1.076	0.2995
7	rs38845	A:G	85:87	0.977	0.7246	1.317	0.02326	0.8788
7	rs10243024	A:G	73:79	0.9241	0.6722	1.27	0.2368	0.6265
7	rs38859	T:C	94:71	1.324	0.9728	1.802	3.206	0.07337
7	rs13223756	G:A	68:74	0.9189	0.6611	1.277	0.2535	0.6146
7	rs2299439	G:T	86:76	1.132	0.8311	1.541	0.6173	0.4321
7	rs2023748	A:G	93:75	1.24	0.9148	1.681	1.929	0.1649

รูปที่ 26 แสดงผลการทดสอบการวิเคราะห์ Family based association โดยวิธี TDT โดยใช้โปรแกรม PLINK

การวิเคราะห์ค่า Family based association โดยวิธี TDT แสดงผลการศึกษาดังรูปที่ 26 โดยประกอบด้วยข้อมูลดังนี้

- CHR คือตำแหน่งโครโมโซมที่ใช้ในการศึกษา
- SNP คือตำแหน่งสไนป์ส์
- A1:A2 คือลักษณะแอลลีลในสไนป์ส์แต่ละตำแหน่ง
- T:U-TDT คือถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอดแอลลีลแบบใดแบบหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูก เช่น rs1858830 แสดงผล C:G = 72:85 คือมีการถ่ายทอดแอลลีล C จากพ่อแม่มาสู่ลูกแต่ไม่มีการถ่ายทอดแอลลีล G เท่ากับ 72 และมีการถ่ายทอดแอลลีล G จากพ่อแม่มาสู่ลูกแต่ไม่มีการถ่ายทอดแอลลีล C เท่ากับ 85
- OR_TDT คืออัตราส่วนของโอกาสที่จะเกิดเหตุการณ์หนึ่งต่อโอกาสที่จะไม่เกิดเหตุการณ์นั้น
- L95 (Lower bound of 95% confidence interval for TDT odds ratio) คือค่าต่ำสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio
- U95 (Upper bound of 95% confidence interval for TDT odds ratio) คือค่าสูงสุดจากช่วงของความเชื่อมั่นที่ 95% ของค่า Odd ratio
- CHISQ_TDT คือค่า Chi-square test
- P_TDT คือค่า P-value

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

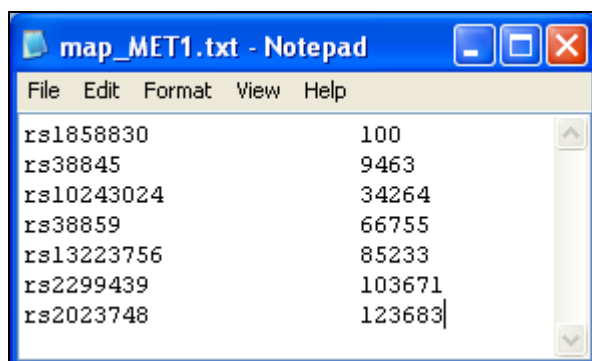
โปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลสถิติทางด้านพันธุศาสตร์จากข้อมูลจีโนมไทป์ของตัวอย่างตรวจแต่ละราย โปรแกรมสามารถแสดงค่าทางสถิติได้หลายรูปแบบ เช่น heterozygosity, HWE, %genotype, family trio, mendelian error และ minimum allele frequency นอกจากนี้ยังมีความสามารถอื่นๆ อีกในการคำนวณและวิเคราะห์การสร้าง LD และ Haplotype blocks ได้จากข้อมูลจีโนมไทป์ การหาความถี่ haplotype ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา (Haplotype population frequency estimation) การคำนวณ association test แบบใช้ข้อมูล snips ที่ละตำแหน่งและแบบใช้ข้อมูล Haplotype blocks การทำ permutation testing สำหรับคำนวณ association test และอื่นๆ

โปรแกรม Haploview เป็นโปรแกรมที่ทำงานได้กับข้อมูลที่ผู้ใช้งานดาวน์โหลดมาจาก Hapmap project และจาก Perlegen Genotype Browser โปรแกรมสามารถทำงานได้กับข้อมูลที่มีจำนวน snips หลายพันตำแหน่ง และสามารถทำงานได้มากขึ้นกับการใช้งานแบบ command line mode

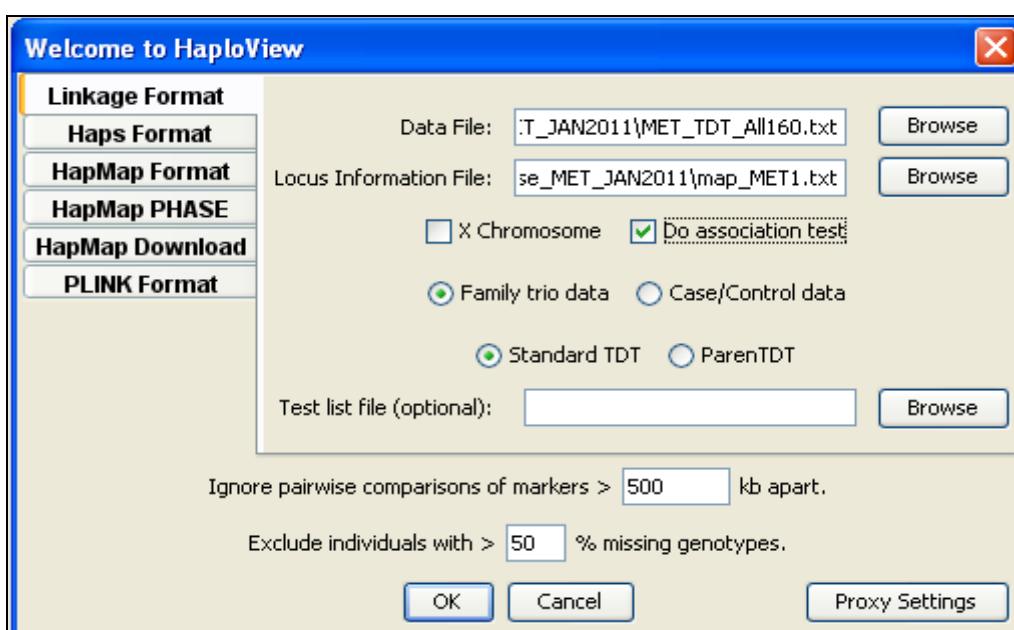
ผู้ใช้งานสามารถดาวน์โหลดโปรแกรม Haploview ผ่านทางอินเทอร์เน็ตซึ่งมี URL ดังนี้ คือ <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php> โดยโปรแกรมแฮพลอวิวมีการติดตั้งค่าตัวแปรมาตั้งแต่ต้น (default parameter) ของแต่ละฟังก์ชันของโปรแกรม

1. โปรแกรมทำการคำนวณเฉพาะสถิติ pairwise LD สำหรับมาร์คเกอร์ที่มีการกำหนดระยะระหว่างมาร์คเกอร์ ตั้งค่าไว้ที่ 500 KB
2. โปรแกรมไม่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลมาร์คเกอร์ที่มีผลจีโนมไทป์ไม่ถึง 50%
3. การศึกษา Association ผู้ใช้งานสามารถเลือกฟังก์ชันการทำงานได้ 2 แบบ คือ population base case control หรือการศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งในครอบครัว (family trios)

การศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว (Haploview) จะต้องมีการเตรียมข้อมูลจีโนมไทป์แต่ละ snips ของทั้งกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมใช้โปรแกรม Excel ซึ่งจะประกอบด้วยข้อมูลทั้งหมดอย่างน้อย 7 คอลัมน์ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PLINK ต่างกันที่แผนที่ของตำแหน่ง snips โดยการศึกษาดูด้วยโปรแกรมแฮพลอวิว จะสร้างแผนที่ของตำแหน่ง snips บนยีน โดย snips ตำแหน่งแรกกำหนดเป็นตำแหน่งอ้างอิง (ตั้งค่าที่ 100) ดังแสดงในรูปที่ 27 และ snips ตำแหน่งอื่นๆ เป็นระยะทางห่างจากตำแหน่งอ้างอิง ตั้งชื่อแผนที่ snips เป็นไฟล์นามสกุล .txt และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เลือกพารามิเตอร์ที่เป็น case-control หรือ family trios ได้ ดังแสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมในรูปที่ 28



รูปที่ 27 แสดงแผนที่ของตำแหน่งสลิปส์บนยีนที่ต้องการศึกษาโดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว



รูปที่ 28 แสดงหน้าจอหลักของโปรแกรมแฮพลอวิว

การใช้โปรแกรมแฮพลอวิว เวอร์ชัน 4.1

1. เปิดโปรแกรมแฮพลอวิวขึ้นมา
2. เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรมดังกล่าวโดยระบุนามสกุลเป็นไฟล์ .txt เช่น MET_TDT_All160.txt ใน data file และแผนที่ของตำแหน่งสลิปส์บนยีน เช่น map_MET1.txt ใน Locus Information File จากนั้นเลือกเป็น Do association test ในการศึกษาสลิปส์บนโครโมโซมร่างกาย สามารถเลือกศึกษาได้ทั้งแบบ Family trios data หรือ Case/Control data ก็สามารถทำได้ โดยโปรแกรมจะทำการนำไฟล์ทั้งสองมาวิเคราะห์ผลแบบอัตโนมัติ

ผลการศึกษาจากโปรแกรมแฮพลิว เวอร์ชัน 4.1 มีดังนี้

1. การตรวจสอบคุณสมบัติมาร์คเกอร์ (Marker Checks) โปรแกรมจะทำการคำนวณข้อมูลพื้นฐานของแต่ละมาร์คเกอร์ บางมาร์คเกอร์จะถูกกรองออกด้วยคุณสมบัติที่ได้ทำการตั้งค่าไว้แต่แรก และรายงานผลสำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติของมาร์คเกอร์ แสดงดังรูปที่ 29 ซึ่งประกอบด้วย

➤ #	คือ	เลขที่มาร์คเกอร์
➤ Name	คือ	ชื่อมาร์คเกอร์
➤ Position	คือ	ตำแหน่งของมาร์คเกอร์
➤ ObsHET	คือ	ค่าที่ได้จากการนับ observed heterozygosity
➤ PredHET	คือ	ค่าที่ได้จากการคำนวณ predicted heterozygosity ($2*MAF*(1-MAF)$)
➤ HWpval	คือ	ค่า P-value ของ Hardy-Weinberg equilibrium ซึ่งก็คือโอกาสความน่าจะเป็นที่ข้อมูลจีโนไทป์นี้จะมีการกระจายตัวแบบสมดุลง
➤ %Geno	คือ	ค่าร้อยละของการศึกษาจีโนไทป์ที่ได้ผลของแต่ละมาร์คเกอร์
➤ FamTrio	คือ	จำนวนครอบครัวที่มีผลจีโนไทป์ครบ
➤ MendErr	คือ	จำนวนครอบครัวที่มีผลจีโนไทป์ไม่เป็นไปตามกฎของ Mendel
➤ MAF	คือ	ค่า minor allele frequency ของแอลลีลแต่ละมาร์คเกอร์
➤ Allele	คือ	แสดง Major และ Minor ของแอลลีลที่ตำแหน่งสปีส์นั้นๆ
➤ Rating	คือ	ค่าที่บอกให้โปรแกรมวิเคราะห์ผล ถ้ามีเครื่องหมายถูกอยู่แล้วแสดงว่ามาร์คเกอร์นั้นผ่านการทดสอบ แต่ถ้าไม่มีเครื่องหมายถูกแสดงว่าไม่ผ่านการทดสอบ

2. หน้าต่างแสดง Linkage disequilibrium (LD Display) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กันมีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าคาดหวัง ซึ่งพิจารณาจากค่า Lewontin's coefficient (D') ที่คำนวณจากระยะทางและความถี่แอลลีลของแต่ละคู่สปีส์ หากค่า D' มากกว่า 0.8 หรือร้อยละ 80 หมายความว่า มีการ

ถ่ายทอดไปด้วยกันของคู่เครื่องหมายพันธุกรรม การสร้างบล็อกมาจากการเลือกพารามิเตอร์ solid spine ซึ่งโปรแกรมจะเลือกตำแหน่งที่มีการถ่ายทอดไปด้วยกันสูง (strong LD) ของสลิปส์ตัวแรก และตัวสุดท้าย ใน LD chart และสลิปส์ที่อยู่ใน LD เรียกว่า haplotype block ซึ่งสีในแต่ละบล็อกจะแสดงผลการศึกษาค่า LD ข้างต้น ดังแสดงในรูปที่ 30

3. หน้าจอแสดง blocks และ haplotypes โดยโปรแกรมสามารถสร้าง haplotype ได้หลายแบบ ดังแสดงตัวอย่างแฮพลไทป์ของยีน *MET* ในรูปที่ 31

The screenshot shows the Haploview 4.1 software interface. The title bar reads "Haploview 4.1 -- MET_TDT_A11160.txt". The menu bar includes "File", "Display", "Analysis", and "Help". The main window has several tabs: "LD Plot", "Haplotypes", "Check Markers", "Tagger", and "Association". Below the tabs, a status bar indicates "Using 0 singletons and 160 trios from 160 families." and an "Advanced Views" button.

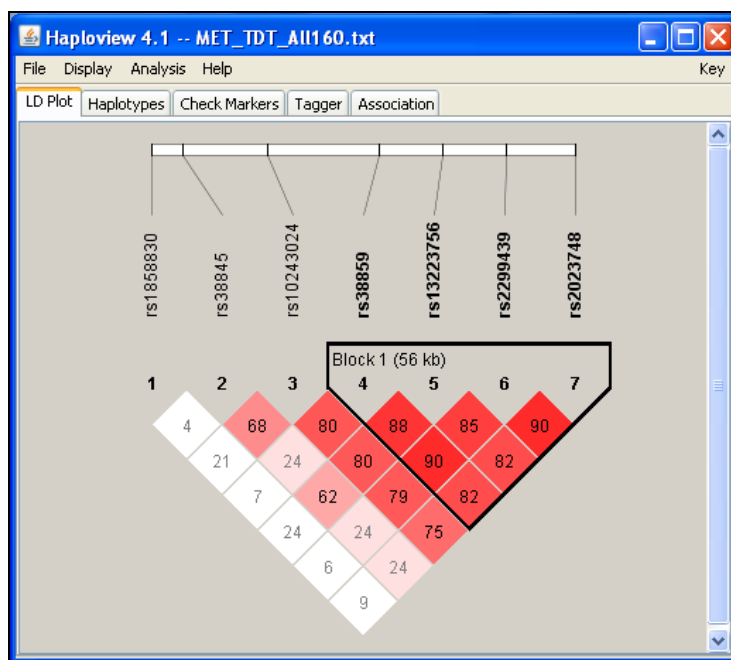
#	Name	Position	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alleles	Rating
1	rs1858830	100	0.491	0.473	0.591	100.0	160	0	0.383	G:C	✓
2	rs38845	9463	0.538	0.499	0.2187	100.0	160	0	0.481	G:A	✓
3	rs10243024	34264	0.475	0.434	0.1259	100.0	160	0	0.319	G:A	✓
4	rs38859	66755	0.516	0.498	0.618	100.0	160	0	0.467	C:T	✓
5	rs13223756	85233	0.444	0.422	0.4606	100.0	160	0	0.303	A:G	✓
6	rs2299439	103671	0.506	0.499	0.8974	100.0	160	0	0.475	T:G	✓
7	rs2023748	123683	0.525	0.498	0.3988	100.0	160	0	0.466	G:A	✓

Below the table, there are several filtering options:

- HW p-value cutoff:
- Min genotype %:
- Max # mendel errors:
- Minimum minor allele freq.

At the bottom, there are four buttons: "Select All", "Deselect All", "Reset Values", and "Rescore Markers".

รูปที่ 29 แสดงผลการทดสอบที่ได้จากโปรแกรมแฮพลิว



รูปที่ 30 แสดงผลการทดสอบ Linkage disequilibrium (LD Display) ที่ได้จากโปรแกรมแฮพลิว

Haplotype	Freq.	T:U	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TAGA	0.406	86.3 : 61.4	4.213	0.0401
CGTG	0.262	61.3 : 58.3	0.077	0.7816
CATG	0.219	52.6 : 59.7	0.443	0.5055
TAGG	0.026	5.0 : 10.0	1.646	0.1994
CAGA	0.021	4.0 : 8.9	1.885	0.1698
CGTA	0.015	3.0 : 7.1	1.636	0.2008
TATG	0.013	3.0 : 5.0	0.5	0.4795

รูปที่ 31 แสดงผลการทดสอบ haplotype block ที่ได้จากโปรแกรมแฮพลิว

บทที่ 3

ผลการวิจัย

การศึกษานี้มีผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 188 ราย โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับภาวะออทิซึมสเปกตรัมได้แบ่งผู้ป่วยออกเป็นกลุ่ม 2 กลุ่มตามลักษณะที่ปรากฏ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติหาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* และยีน *MET* กับภาวะออทิซึม ทั้งการศึกษาแบบ Population based case control และแบบ Family based association (TDT) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 33

ตารางที่ 33 แสดงการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติตามลักษณะที่ปรากฏ

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	
	case-control	TDT*
ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด	188	160
ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย	156	134

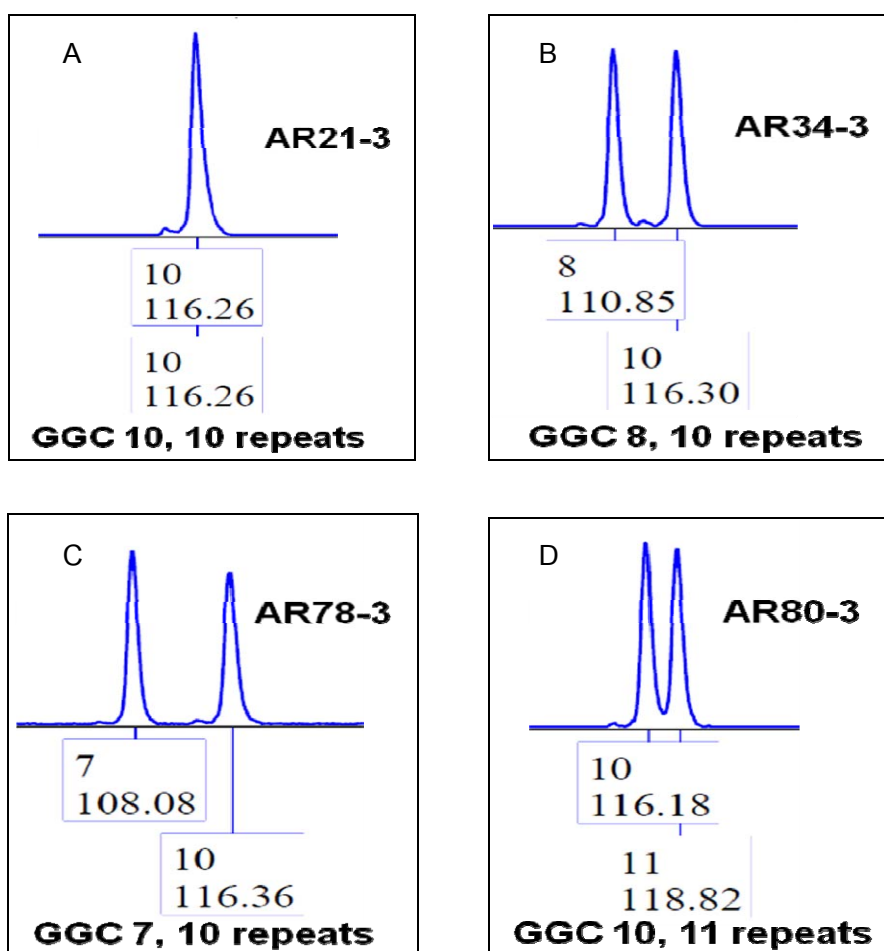
* ประกอบด้วย พ่อ แม่ และ ลูก หรือเรียกว่า Trio

คำอธิบายสัญลักษณ์

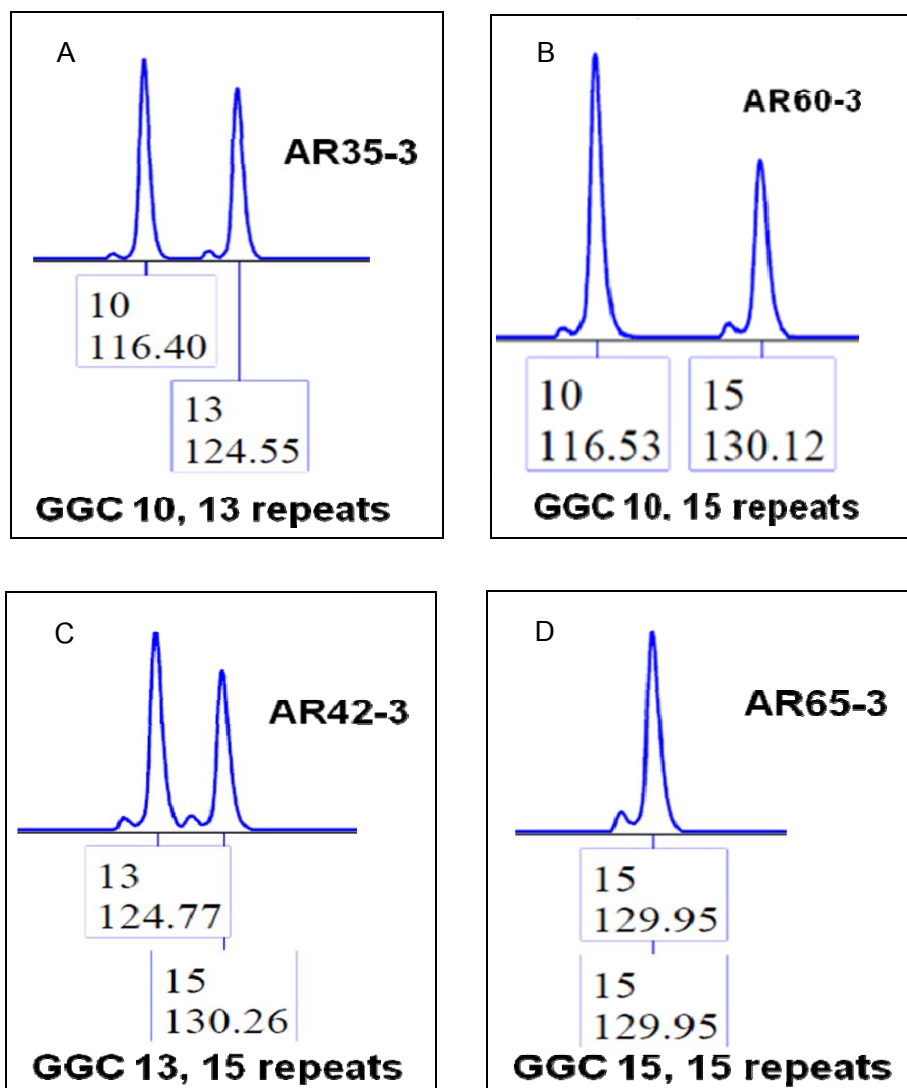
NS (Non Significance)	= ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ
*** (Significance)	= พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
df (degree of freedom)	= ระดับชั้นแห่งความอิสระ
P-value (probability value)	= ค่าความน่าจะเป็น
χ^2 (Chi Square)	= ค่าการทดสอบไคสแควร์

การตรวจวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด 188 ราย ด้วยวิธี Fragment analysis โดยดูจำนวนซ้ำ GGC จากขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่อ่านได้จาก peak signal ผลจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC แสดงในรูปที่ 32-33 และยืนยันผลจำนวนซ้ำด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 34

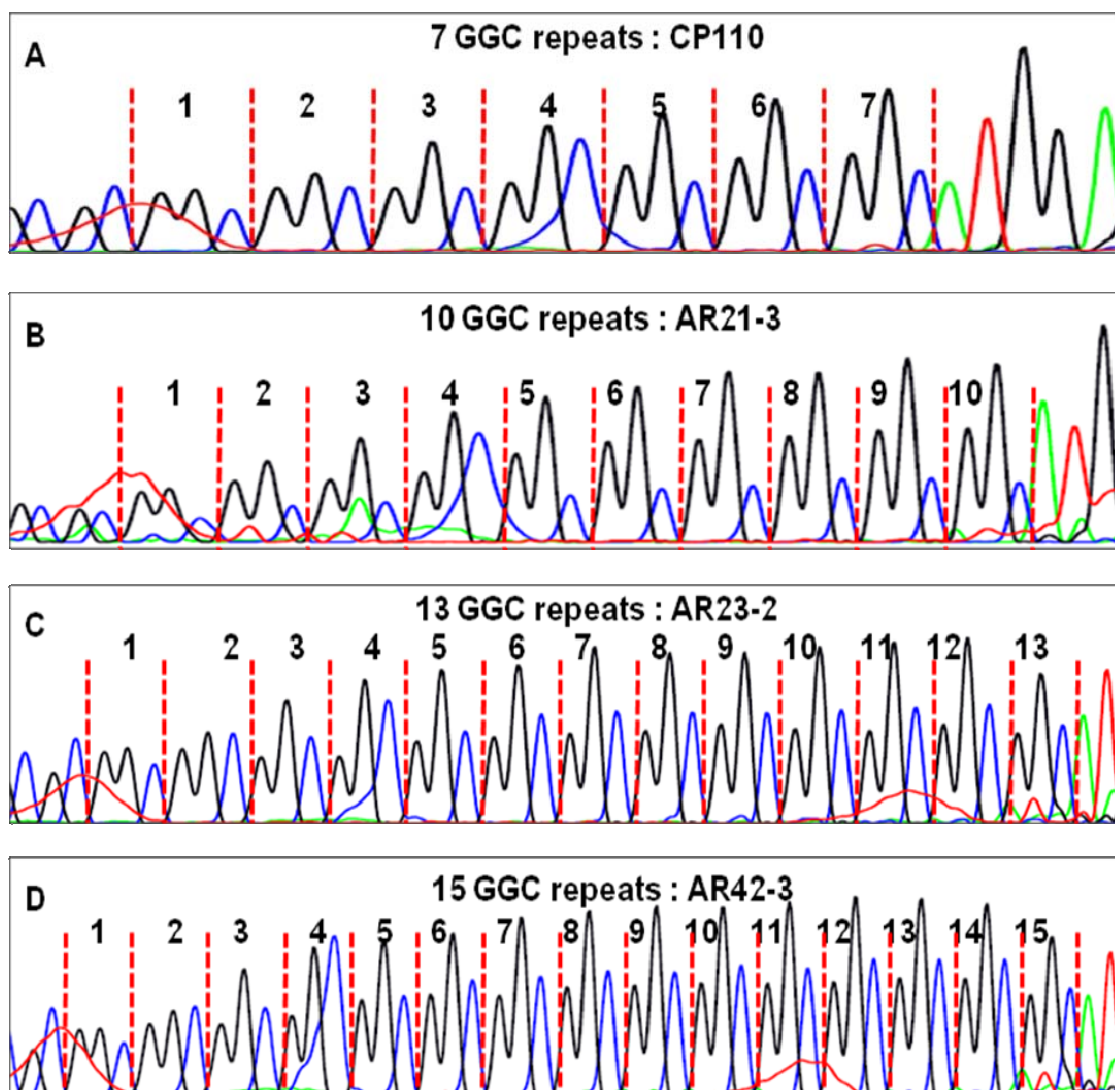


รูปที่ 32 แสดงผลการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยวิธี Fragment analysis รูป A อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 10/10 รูป B อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 8/10 ซ้ำ รูป C อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 7/10 ซ้ำ และรูป D อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 10/11 ซ้ำ



รูปที่ 33 แสดงผลการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วย ออกซิซึมสเปคตรัมด้วยวิธี Fragment analysis รูป A อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 10/13 ซ้ำ รูป B อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 10/15 ซ้ำ รูป C อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 13/15 ซ้ำ และรูป D อ่านผลจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC เป็น 15/15 ซ้ำ

ยืนยันจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 34



รูปที่ 34 แสดงผลการยืนยันจำนวนซ้ำของ GGC ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (A) ผลอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมแสดงจำนวนซ้ำ GGC 7 ซ้ำ (B) ผลอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมแสดงจำนวนซ้ำ GGC 10 ซ้ำ (C) ผลอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมแสดงจำนวนซ้ำ GGC 13 ซ้ำ (D) ผลอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมแสดงจำนวนซ้ำ GGC 15 ซ้ำ

การศึกษานี้ได้ทดสอบจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในกลุ่มประชากรปกติที่มาบริจาคเลือดที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติและโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยประชากรดังกล่าวเป็นคนไทยที่มีภูมิลำเนาอยู่ภาคกลาง 226 คน (ผู้ชาย 165 คน ผู้หญิง 61 คน) อยู่ภาคใต้ 46 คน (ผู้ชาย 35 คน และผู้หญิง 11 คน) รวมเป็น 272 คน นำมาเปรียบเทียบการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC ของแต่ละภาค โดยจัดกลุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม จำนวนซ้ำ GGC ที่พบได้น้อยจะรวมเข้าด้วยกันเพื่อให้เหมาะสมต่อการทดสอบไคสแควร์ ผลจากการทดสอบพบจำนวนซ้ำ GGC ในแต่ละภาคไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 34 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงรวบรวมข้อมูลคนปกติทั้งสองกลุ่มเข้าด้วยกันเพื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบการกระจายตัวของแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ในตัวอย่างคนไทยปกติภาคกลาง และภาคใต้ด้วยการทดสอบไคสแควร์

จำนวนซ้ำ GGC	ภาคกลาง		ภาคใต้	
	จำนวน (คน)	ร้อยละ	จำนวน (คน)	ร้อยละ
5-7	13	2.88	2	2.17
8-9	48	10.62	8	8.70
10	340	75.22	73	79.35
11-13	42	9.29	8	8.70
14-15	9	1.99	1	1.09
รวม	452	100.00	92	100.00

ผลการเปรียบเทียบการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างคนปกติภาคกลางและภาคใต้ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (Chi square = 0.5830, df = 4, $P = 0.9649$)

ผลการศึกษาพบจำนวนซ้ำ GGC ในผู้ป่วยตั้งแต่ 6 - 16 ซ้ำ ส่วนในกลุ่มควบคุมพบจำนวนซ้ำ GGC ตั้งแต่ 5-15 ซ้ำ โดยจำนวนซ้ำที่พบมากที่สุดทั้งในกลุ่มผู้ป่วย ออทีซึ่มสเปกตรัมและกลุ่มควบคุมได้แก่ 10, 8 และ 13 ซ้ำ ตามลำดับ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 35

ตารางที่ 35 แสดงการกระจายตัวของแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มผู้ป่วย ออทีซึ่มสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด (272 คน)

แอลลีล (GGC repeats)	ผู้ป่วยออทีซึ่มสเปกตรัม 188 ราย	ร้อยละ	กลุ่มควบคุม 272 คน	ร้อยละ
5	0	0.00	1	0.18
6	1	0.27	2	0.37
7	2	0.53	12	2.21
8	34	9.04	48	8.82
9	1	0.27	8	1.47
10	283	75.27	413	75.92
11	2	0.53	3	0.55
12	3	0.80	4	0.74
13	31	8.24	43	7.90
14	1	0.27	0	0.00
15	17	4.52	10	1.84
16	1	0.27	0	0.00
รวม	376	100.00	544	100.00

การเปรียบเทียบจำนวนซ้ำ GGC ในรูปแบบแอลลีล พบความแตกต่างกันของความถี่จำนวนซ้ำ GGC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุม โดยพบจำนวนซ้ำ GGC ตั้งแต่ 14 ซ้ำขึ้นไปในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมสูงถึงร้อยละ 5.06 ส่วนในกลุ่มควบคุมพบเพียงร้อยละ 1.84 ดังนั้นจึงแบ่งจำนวนซ้ำ GGC ออกเป็น 2 กลุ่มเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออทิซึมคือ กลุ่มที่มีจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำและกลุ่มที่มีจำนวนซ้ำ GGC < 14 ซ้ำ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมดและในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ($P = 0.0061$ และ $P = 0.0240$ ตามลำดับ) โดยการทดสอบไคสแควร์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 36

ตารางที่ 36 แสดงการแบ่งกลุ่มแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC และผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ไคสแควร์

แอลลีล (GGC repeats)	ผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (188 ราย)		กลุ่มควบคุมทั้งหมด (272 คน)		ผู้ป่วยชายทั้งหมด (156 ราย)		กลุ่มควบคุมเพศชาย (200 คน)	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
GGC < 14 ซ้ำ	357	94.94	534	98.16	295	94.55	391	97.75
GGC ≥ 14 ซ้ำ	19	5.06	10	1.84	17	5.45	9	2.25
รวม	376	100.0	544	100.0	312	100.0	400	100.0
ค่า P -value	0.0061***				0.0240***			

ผลการเปรียบเทียบแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 กลุ่ม (Chi square = 7.5275, df = 1, $P = 0.0061$)

ผลการเปรียบเทียบแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายกับกลุ่มควบคุมเพศชาย พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 กลุ่ม (Chi square = 5.0974, df = 1, $P = 0.0240$)

เมื่อพิจารณาจำนวนซ้ำ GGC ในรูปแบบจีโนไทป์ พบจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด 16 แบบ ส่วนในกลุ่มควบคุมพบจีโนไทป์ทั้งหมด 20 แบบ จีโนไทป์ที่พบบ่อยที่สุด 3 อันดับแรกทั้งในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุมคือ 10/10, 10/13 และ 8/10 ตามลำดับ โดยจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 37

ตารางที่ 37 แสดงการกระจายตัวของจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ที่พบในผู้ป่วย
ออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม จำนวน (272 คน)

จีโนไทป์	ผู้ป่วยออทิซึม 188 ราย	ร้อยละ	กลุ่มควบคุม 272 คน	ร้อยละ
10/10	104	55.32	163	59.93
10/11	2	1.06	2	0.74
10/12	2	1.06	0	0.00
10/13	27	14.36	37	13.60
10/14	1	0.53	0	0.00
10/15	13	6.91	4	1.47
10/16	1	0.53	0	0.00
12/13	1	0.53	0	0.00
13/15	1	0.53	2	0.74
15/15	1	0.53	2	0.74
6/15	1	0.53	0	0.00
7/10	2	1.06	7	2.57
8/10	26	13.83	35	12.87
8/13	2	1.06	1	0.37
8/8	3	1.60	3	1.10
9/10	1	0.53	0	0.00
9/12	0	0.00	2	0.74
6/10	0	0.00	1	0.37
6/8	0	0.00	1	0.37
7/8	0	0.00	3	1.10
8/9	0	0.00	2	0.74
11/13	0	0.00	1	0.37
12/12	0	0.00	1	0.37
5/10	0	0.00	1	0.37
7/13	0	0.00	2	0.74
9/9	0	0.00	2	0.74
รวม	188	100.00	272	100.00

การศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออทิซึม ได้แบ่งจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะที่พบความแตกต่างของแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมกับกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่มีจีโนไทป์ที่ประกอบด้วยจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำอย่างน้อย 1 แอลลีล และกลุ่มที่มีจีโนไทป์จำนวนซ้ำ GGC < 14 ซ้ำ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดกับกลุ่มควบคุมทั้งหมดและกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ระหว่าง 2 กลุ่ม ($P = 0.0025$ และ $P = 0.0101$ ตามลำดับ) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 38

ตารางที่ 38 แสดงผลการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดและผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ไคสแควร์

จีโนไทป์ (GGC repeats)	ผู้ป่วยทั้งหมด (188 ราย)		กลุ่มควบคุมทั้งหมด (272 คน)		ผู้ป่วยชายทั้งหมด (156 ราย)		กลุ่มควบคุมเพศชาย (200 คน)	
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
GGC < 14 ซ้ำ	170	90.43	264	97.06	140	89.74	193	96.50
GGC ≥ 14 ซ้ำ	18	9.57	8	2.94	16	10.26	7	3.50
รวม	188	100.00	272	100.00	156	100.00	200	100.00
P-value	0.0025***				0.0101***			

ผลการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 กลุ่ม (Chi square = 9.1723, df = 1, $P = 0.0025$)

ผลการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ระหว่างผู้ป่วยออทิซึมเพศชายกับกลุ่มควบคุมเพศชาย พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง 2 กลุ่ม (Chi square = 6.6201, df = 1, $P = 0.0101$)

การศึกษาการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

การศึกษาการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ทำโดยแบ่งจำนวนซ้ำ GGC ออกเป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับการศึกษาในรูปแบบ Population based case control คือกลุ่มที่มีจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำกับกลุ่มที่มีจำนวนซ้ำ GGC < 14 ซ้ำ เพื่อดูการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าจำนวนซ้ำ GGC < 14 ซ้ำหรือไม่

ผลการศึกษาไม่พบการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าจำนวนซ้ำ GGC < 14 ซ้ำ ทั้งในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (160 ครอบครัว) โดยพบอัตราการถ่ายทอดต่อไม่ถ่ายทอดเท่ากับ (16 : 13) และในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย (134 ครอบครัว) โดยพบอัตราการถ่ายทอดต่อไม่ถ่ายทอด เท่ากับ (14 : 12) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 39

ตารางที่ 39 แสดงการถ่ายทอดแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม PLINK

ลักษณะของผู้ป่วย	แอลลีล	ถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (จำนวนแอลลีล)	(χ^2)	P-value
ผู้ป่วยทั้งหมด (160)	GGC ≥ 14 : < 14	16 : 13	0.3103	0.5775 (NS)
ผู้ป่วยออทิซึมเพศชาย (134)	GGC ≥ 14 : < 14	14 : 12	0.1538	0.6949 (NS)

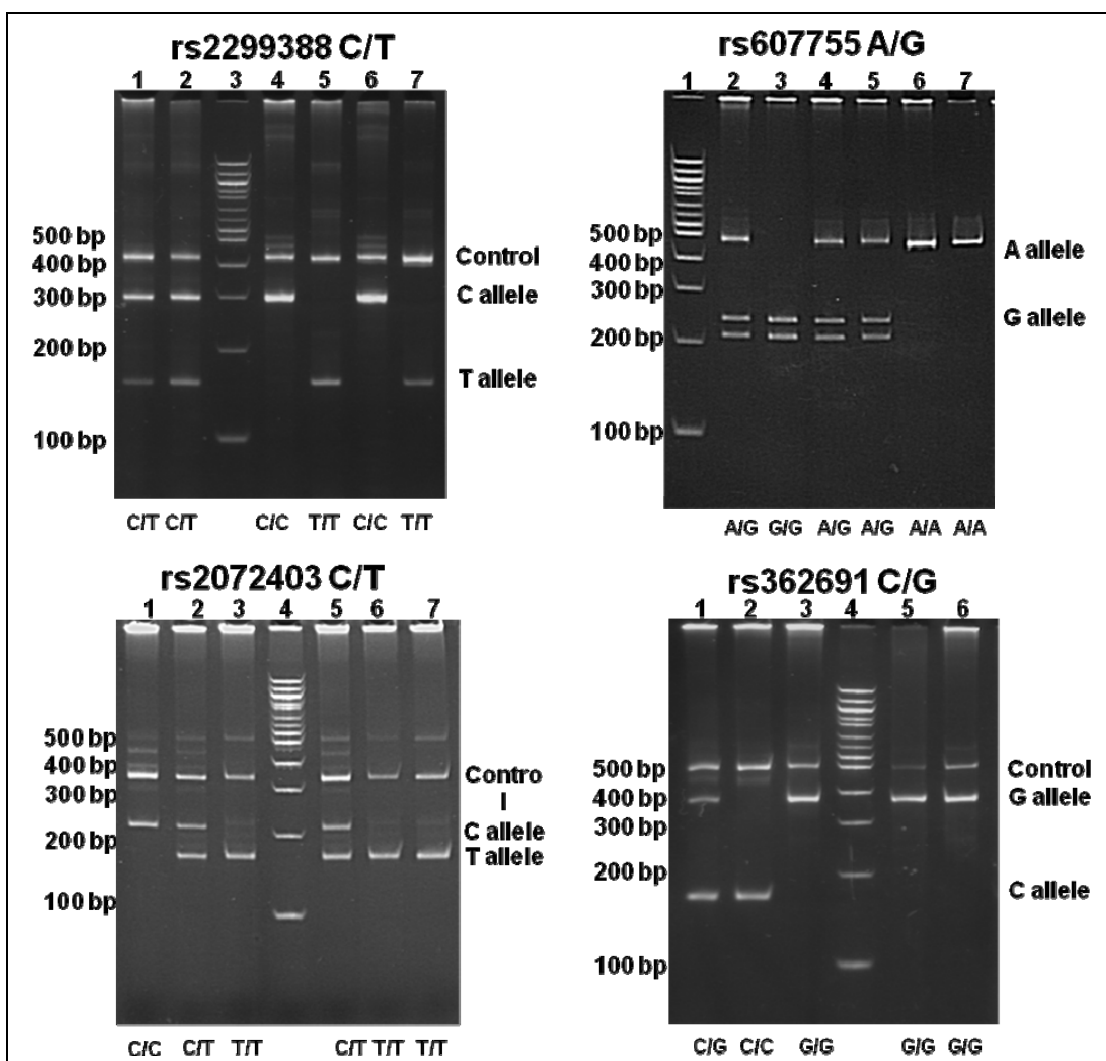
การศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกันของจำนวนซ้ำ GGC กับสนิปส์บนยีน *RELN*

การศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกันของแอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC กับสนิปส์ ตำแหน่งอื่นที่ศึกษาบนยีน *RELN* ได้แบ่งจำนวนซ้ำ GGC ออกเป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับการศึกษาแบบ Population based case control และ Family based association คือ จำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ และ GGC < 14 ซ้ำ

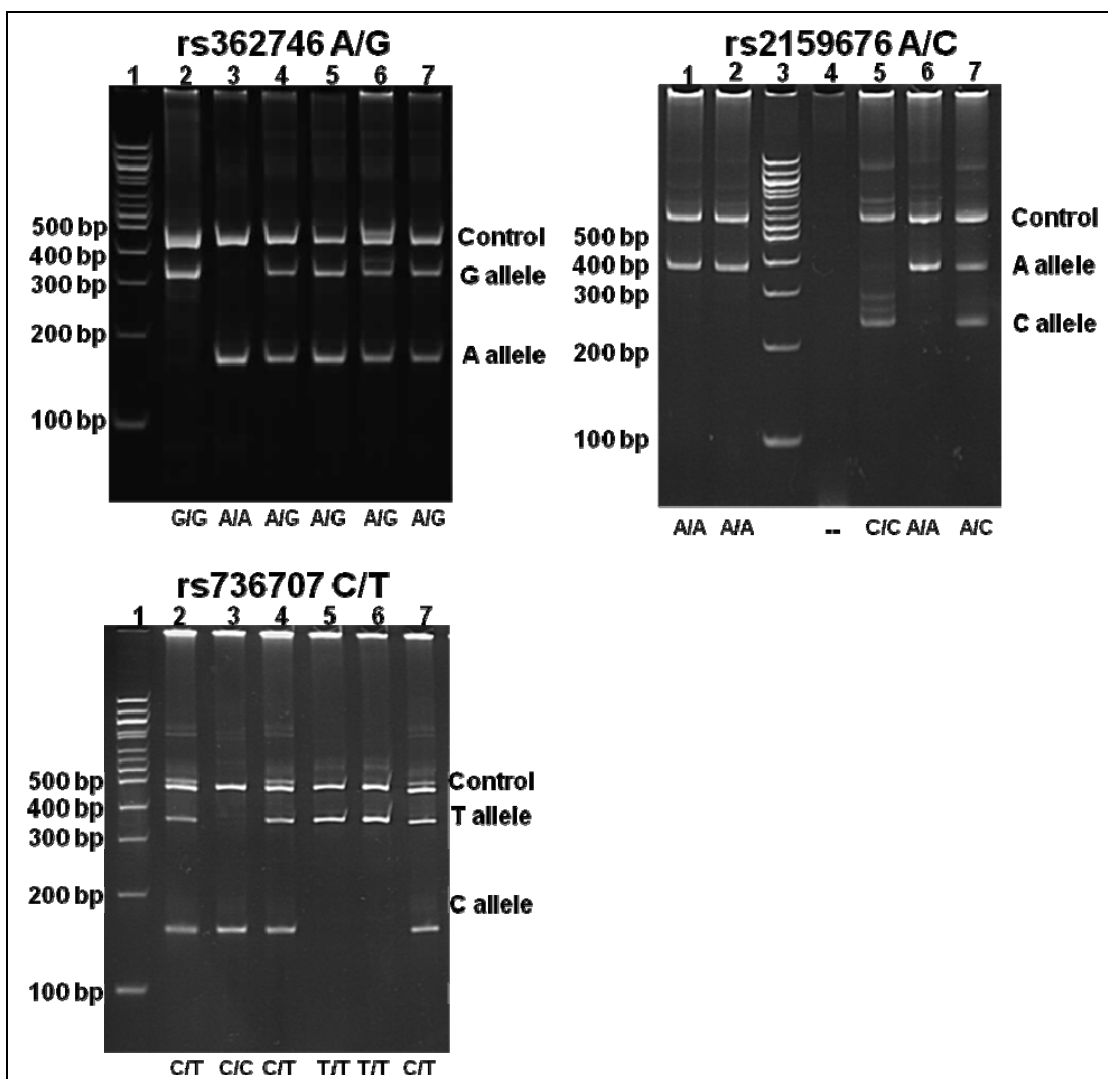
ผลการศึกษาไม่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำกับสนิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* และจากการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการถ่ายทอดแฮพล์ไทป์แต่ละแบบ ทั้งการศึกษาแบบ population based case control และการศึกษาแบบ Family based association

ผลการศึกษาสหิปล์บยีน *RELN*

การศึกษานิวไทป์ของสหิปล์บยีน *RELN* ใช้วิธี Biallelic-ARMS PCR และ PCR-RFLP โดยผลการศึกษานิวไทป์ของแต่ละนิวไทป์พิจารณาตามขนาดของพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 35-36



รูปที่ 35 แสดงผลการอ่านนิวไทป์บนเจลโพลีอะคริลลาไมด์ของสหิปล์ rs2299388 (บนซ้าย) rs607755 (บนขวา) rs2072403 (ล่างซ้าย) และ rs362691 (ล่างขวา)



รูปที่ 36 แสดงผลการอ่านจีโนไทป์บนเจลโพลีอะคริลาไมด์ของสไนป์ส์ rs2159676 (บนซ้าย) rs362746 (บนขวา) และ rs736707 (ล่างซ้าย)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของส니ปส์บนยีน *RELN* แบบ Population based case control

1.1 การศึกษาสมดุลของประชากร (Hardy-Weinberg Equilibrium) ในกลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมที่นำมาใช้ในการศึกษาแบบ Population based case control ต้องมีการตรวจสอบการกระจายความถี่จีโนไทป์ให้เป็นไปตามกฎสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) คือในประชากรใดๆ ต้องมีความถี่จีโนไทป์คงที่ ผลการทดสอบกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีผลจีโนไทป์ครบทุกรายคิดเป็นร้อยละ 100 (จำนวน 250 คน) และการกระจายความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมเป็นไปตามกฎสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 40

ตารางที่ 40 แสดงค่าฮาร์ดีไวน์เบิร์ก และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีของสนิปส์ทุกตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* โดยโปรแกรม PLINK

ชื่อสนิปส์	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	แอลลีล
rs2299388	0.364	0.398	0.2024	100	0.274	T:C
rs607755	0.456	0.438	0.5660	100	0.324	A:G
rs2072403	0.252	0.261	0.6257	100	0.154	T:C
rs362691	0.344	0.320	0.3222	100	0.200	G:C
rs2159676	0.520	0.500	0.6128	100	0.496	C:A
rs362746	0.272	0.252	0.3146	100	0.148	A:G
rs736707	0.520	0.497	0.5258	100	0.464	T:C

คำอธิบาย

ObsHET คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed Heterozygosity)

PredHET คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (Predicted Heterozygosity)

HWpval คือ ค่า P ของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg P value)

%Geno คือ ร้อยละของผลการทดสอบจีโนไทป์ในสนิปส์แต่ละตำแหน่ง

MAF คือ ค่าความถี่แอลลีลที่พบน้อย (Minor allele frequency)

1.2 การศึกษาความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* ในผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกกลุ่มผู้ป่วยในการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะที่ปรากฏ ได้แก่ ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด จำนวน 188 ราย กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย จำนวน 156 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด จำนวน 250 คน และกลุ่มควบคุมเพศชาย จำนวน 178 คน

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความถี่แอลลีลในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษายีน *RELN* แสดงรายละเอียดในตารางที่ 41 และตารางที่ 42

ตารางที่ 41 แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษายีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)

ชื่อสไนป์ส์	ตำแหน่ง สไนป์ส์	แอลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value	OR(CI)
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่			
rs2299388	Intron 2	C	119	0.3165	137	0.274	1.873	0.1711 NS	1.227 (0.9153-1.645)
		T	257	0.6835	363	0.726			
rs607755	Intron 5	G	141	0.375	162	0.324	2.467	0.1162 NS	1.252 (0.9457-1.657)
		A	235	0.625	338	0.676			
rs2072403	Exon 15	C	54	0.1436	77	0.1540	0.182	0.6997 NS	0.921 (0.632-0.1343)
		T	322	0.8564	423	0.8460			
rs362691	Exon 22	C	65	0.1729	100	0.200	1.033	0.3094 NS	0.836 (0.5917-1.181)
		G	311	0.8271	400	0.800			
rs2159676	Intron 28	C	191	0.508	248	0.496	0.123	0.7256 NS	1.049 (0.8028-1.371)
		A	185	0.492	252	0.504			
rs362746	Exon 45	G	48	0.1277	74	0.148	0.740	0.3894 NS	0.8425 (0.5700-1.245)
		A	328	0.8723	426	0.852			
rs736707	Intron 59	C	158	0.4202	232	0.464	1.666	0.1968 NS	0.8372 (0.6392-1.097)
		T	218	0.5798	268	0.536			

ตารางที่ 42 แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์สแต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* ในผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)

ชื่อสไนป์ส	ตำแหน่ง สไนป์ส	แอลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value	OR(CI)
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่			
rs2299388	Intron 2	C	97	0.3109	97	0.2725	1.191	0.2751 NS	1.205 (0.8621-1.683)
		T	215	0.6891	259	0.7275			
rs607755	Intron 5	G	112	0.3590	112	0.3146	1.469	0.2256 NS	1.22 (0.8843-1.683)
		A	200	0.6410	244	0.6854			
rs2072403	Exon 15	C	40	0.1282	60	0.1685	2.125	0.1449 NS	0.7255 (0.4707-1.118)
		T	272	0.8718	296	0.8315			
rs362691	Exon 22	C	56	0.1795	70	0.1966	0.3193	0.5721 NS	0.8938 (0.6053-1.320)
		G	256	0.8205	286	0.8034			
rs2159676	Intron 28	C	165	0.5288	171	0.4803	1.565	0.2109 NS	1.214 (0.8957-1.646)
		A	147	0.4712	185	0.5197			
rs362746	Exon 45	G	39	0.1250	54	0.1517	0.988	0.3202 NS	0.7989 (0.5129-1.245)
		A	273	0.8750	302	0.8483			
rs736707	Intron 59	C	131	0.4199	161	0.4522	0.7083	0.400 NS	0.8766 (0.645-1.191)
		T	181	0.5801	195	0.5478			

1.3 การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสไนป์สแต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* ในผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่จีโนไทป์ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของสไนป์สแต่ละตำแหน่งที่ศึกษากับภาวะออทิซึม แสดงรายละเอียดในตารางที่ 43 และตารางที่ 44

ตารางที่ 43 แสดงความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* ในผู้ป่วยออกซิซึมสเปคตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)

ชื่อสลิปส์	ตำแหน่งสลิปส์	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่		
rs2299388	Intron 2	C/C	18	9.57	23	9.2	3.029	0.2199 NS
		C/T	83	44.15	91	36.4		
		T/T	87	46.28	136	54.4		
rs607755	Intron 5	G/G	24	12.77	24	9.6	2.592	0.2736 NS
		A/G	93	49.47	114	45.6		
		A/A	71	37.76	112	44.8		
rs2072403	Exon 15	C/C	3	1.6	7	2.8	Fisher	0.7482 NS
		C/T	48	25.53	63	25.2		
		T/T	137	72.87	180	72.0		
rs362691	Exon 22	C/C	6	3.19	7	2.8	1.915	0.3839 NS
		C/G	53	28.19	86	34.4		
		G/G	129	68.62	157	62.8		
rs2159676	Intron 28	C/C	52	27.66	59	23.6	1.526	0.4664 NS
		A/C	87	46.28	130	52.0		
		A/A	49	26.06	61	24.4		
rs362746	Exon 45	G/G	5	2.7	3	1.2	Fisher	0.1303 NS
		A/G	38	20.7	68	27.2		
		A/A	145	76.6	179	71.6		
rs736707	Intron 59	C/C	36	19.2	51	20.0	2.898	0.2348 NS
		C/T	86	45.7	130	52.0		
		T/T	66	35.1	69	28.0		

ตารางที่ 44 แสดงความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* ในผู้ป่วยออกซิซึมสเปคตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)

ชื่อสลิปส์	ตำแหน่งสลิปส์	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่		
rs2299388	Intron 2	C/C	15	9.61	15	8.43	1.404	0.4956 NS
		C/T	67	42.95	67	37.64		
		T/T	74	47.44	96	53.93		
rs607755	Intron 5	G/G	17	10.9	20	11.24	3.300	0.1920 NS
		A/G	78	50.0	72	40.45		
		A/A	61	39.1	86	48.31		
rs2072403	Exon 15	C/C	2	1.28	7	3.93	Fisher	0.2632 NS
		C/T	36	23.08	46	25.84		
		T/T	118	75.64	125	70.23		
rs362691	Exon 22	C/C	6	3.85	5	2.81	1.333	0.5135 NS
		C/G	44	28.20	60	33.71		
		G/G	106	67.95	113	63.48		
rs2159676	Intron 28	C/C	47	30.13	40	22.47	2.547	0.2798 NS
		A/C	71	45.51	91	51.12		
		A/A	38	24.36	47	26.41		
rs362746	Exon 45	G/G	4	2.56	2	1.12	Fisher	0.1374 NS
		A/G	31	19.87	50	28.09		
		A/A	121	77.57	126	70.79		
rs736707	Intron 59	C/C	29	18.59	32	17.98	2.340	0.3104 NS
		C/T	73	46.79	97	54.49		
		T/T	54	34.62	49	27.53		

1.4 การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสนิปส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วย ออทิสซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ genetic model แบบต่าง ๆ

ในกรณีที่พบความแตกต่างของความถี่แอลลีลหรือจีโนไทป์ของสนิปส์จะทำการศึกษาเพิ่มเติมในรูปแบบของ genetic model เพื่อดูว่าความถี่แอลลีลหรือจีโนไทป์ดังกล่าวมีรูปแบบการถ่ายทอดอย่างไรในผู้ป่วยออทิสซึม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่จีโนไทป์ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ genetic model จะแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 3 รูปแบบ คือ

1. additive model เป็นการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ระหว่างจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสแต่ละแบบกับครึ่งหนึ่งของจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดกับกลุ่มควบคุม
2. dominant model เป็นการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ระหว่างจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่พบได้บ่อยเปรียบเทียบกับจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่พบได้น้อยรวมกับจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. recessive model เป็นการศึกษาลักษณะจีโนไทป์ระหว่างจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่พบได้น้อยเปรียบเทียบกับจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่พบได้บ่อยรวมกับจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสในกลุ่มผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปส์บนยีน *RELN* กับภาวะออทิสซึมไม่พบความแตกต่างของความถี่แอลลีลและความถี่จีโนไทป์ของสนิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* ทั้งการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด และในกลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ส่งผลให้การศึกษาในรูปแบบ genetic model ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวทั้ง 2 กลุ่มที่ศึกษา ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 45 และตารางที่ 46

ตารางที่ 45 แสดงค่าความน่าจะเป็น (*P*-value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสลิปส์ ตำแหน่งแต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model

ชื่อสลิปส์	ตำแหน่งสลิปส์	P-value		
		additive model d.f.=1	dominant model d.f.=1	recessive model d.f.=1
rs2299388	Intron 2 (C/T)	0.1802 NS	0.0927 NS	0.8941 NS
rs607755	Intron 5 (A/G)	0.1089 NS	0.1400 NS	0.2952 NS
rs2072403	Exon 15 (C/T)	0.6704 NS	0.8398 NS	0.4097 NS
rs362691	Exon 22 (C/G)	0.3007 NS	0.2060 NS	0.8113 NS
rs2159676	Intron 28 (A/C)	0.7268 NS	0.6911 NS	0.3341 NS
rs362746	Exon 45 (A/G)	0.3877 NS	0.1926 NS	0.2712 NS
rs736707	Intron 59 (C/T)	0.1978 NS	0.0928 NS	0.7453 NS

หมายเหตุ แอลลีลตัวหนาแสดงแอลลีลที่พบได้น้อย (Minor allele)
 การวิเคราะห์ในรูปแบบ genetic model จากโปรแกรม PLINK โปรแกรมจะทำการคำนวณ Minor allele และ Major allele
 ตัวอย่างการศึกษาสลิปส์ rs2299388 ในรูปแบบ genetic model
 Additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง C/C และ ½ ของ C/T เปรียบเทียบกับ T/T และ ½ ของ C/T
 Dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง T/T เปรียบเทียบกับ C/C และ C/T
 Recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง C/C เปรียบเทียบกับ T/T และ C/T

ตารางที่ 46 แสดงค่าความน่าจะเป็น (*P*-value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสไนป์ส์ ตำแหน่งแต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชายด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model

ชื่อสไนป์ส์	ตำแหน่งสไนป์ส์	P-value		
		additive model d.f.=1	dominant model d.f.=1	recessive model d.f.=1
rs2299388	Intron 2 (C/T)	0.2820 NS	0.2364 NS	0.7049 NS
rs607755	Intron 5 (A/G)	0.2246 NS	0.0911 NS	0.9217 NS
rs2072403	Exon 15 (C/T)	0.1538 NS	0.2680 NS	0.1561 NS
rs362691	Exon 22 (C/G)	0.5689 NS	0.3917 NS	0.5976 NS
rs2159676	Intron 28 (A/C)	0.2184 NS	0.6686 NS	0.1127 NS
rs362746	Exon 45 (A/G)	0.3183 NS	0.1601 NS	0.3361 NS
rs736707	Intron 59 (C/T)	0.3921 NS	0.1624 NS	0.8851 NS

หมายเหตุ แอลลีลตัวหนาแสดงแอลลีลที่พบได้น้อย (Minor allele)
 การวิเคราะห์ในรูปแบบ genetic model จากโปรแกรม PLINK โปรแกรมจะทำการคำนวณ Minor allele และ Major allele
 ตัวอย่างการศึกษาสไนป์ส์ rs2299388 ในรูปแบบ genetic model
 Additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง C/C และ ½ ของ C/T เปรียบเทียบกับ T/T และ ½ ของ C/T
 Dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง T/T เปรียบเทียบกับ C/C และ C/T
 Recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง C/C เปรียบเทียบกับ T/T และ C/T

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *RELN* แบบ Family based association ด้วยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม

การประมวลผลจีโนมไทป์ในตัวอย่างครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมจำนวน 160 ครอบครัว (N = 480 ประกอบด้วย พ่อ แม่ และลูกที่มีภาวะออทิซึมสเปคตรัม) จากการวิเคราะห์การถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของการถ่ายทอดแอลลีลบนสลิปส์ทุกตำแหน่งในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 47 และในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชาย ดังแสดงในตารางที่ 48

ตารางที่ 47 แสดงค่า *P*-value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสลิปส์ตำแหน่ง rs2299388, rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs362746 และ rs736707 บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม PLINK

สลิปส์	แอลลีล	ถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (จำนวนแอลลีล)	Chi square (χ^2)	<i>P</i> -value
rs2299388	C:T	69:73	0.1127	0.7371 (NS)
rs607755	G:A	88:77	0.7333	0.3918 (NS)
rs2072403	C:T	38:32	0.5143	0.4733 (NS)
rs362691	C:G	49:57	0.6038	0.4371 (NS)
rs2159676	A:C	95:90	0.1351	0.7132 (NS)
rs362746	G:A	33:47	2.4500	0.1175 (NS)
rs736707	C:T	70:93	3.2450	0.0716 (NS)

คำอธิบาย การถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (70:93) ของสลิปส์ rs736707 คือ ถ่ายทอดแอลลีล C เท่ากับ 70 และถ่ายทอดแอลลีล T เท่ากับ 93

การศึกษาการถ่ายทอดสลิปส์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งในสลิปส์ทุกตำแหน่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าอีกแอลลีลอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 48 แสดงค่า P -value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสโนิปส์ตำแหน่ง rs2299388, rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs362746 และ rs736707 บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชาย โดยใช้โปรแกรม PLINK

สโนิปส์	แอลลีล	ถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด (จำนวนแอลลีล)	Chi square (χ^2)	P -value
rs2299388	C:T	55:64	0.6807	0.4094 (NS)
rs607755	G:A	67:63	0.1231	0.7257 (NS)
rs2072403	C:T	29:27	0.0714	0.7893 (NS)
rs362691	C:G	43:47	0.1778	0.6733 (NS)
rs2159676	A:C	82:77	0.1572	0.6917 (NS)
rs362746	G:A	26:34	1.0670	0.3017 (NS)
rs736707	C:T	59:77	2.3820	0.1227 (NS)

คำอธิบาย การถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (59:77) ของสโนิปส์ rs736707 คือ ถ่ายทอดแอลลีล C เท่ากับ 59 และถ่ายทอดแอลลีล T เท่ากับ 77

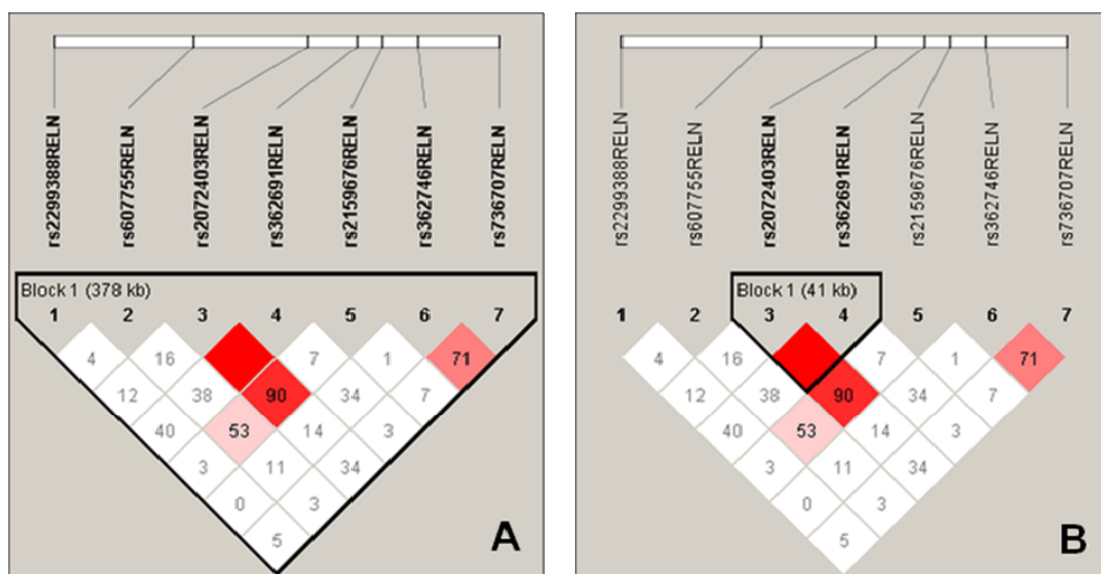
การศึกษาการถ่ายทอดสโนิปส์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งในสโนิปส์ทุกตำแหน่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าอีกแอลลีลอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

3. การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) ของสโนิปส์บนยีน *RELN*

การวิเคราะห์หา Linkage disequilibrium (LD) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลที่อยู่คนละตำแหน่งบนโครโมโซมเดียวกัน ซึ่งมีโอกาสที่จะถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งด้วยกัน ปรากฏการณ์ที่พบสโนิปส์หลายตำแหน่งถูกถ่ายทอดไปด้วยกันในกลุ่มประชากรบ่อยกว่าการที่พบโดยบังเอิญ เรียกกลุ่มสโนิปส์นั้นว่ามี Linkage disequilibrium ต่อกัน ดังนั้นการศึกษาแอสโพลไทป์จึงมีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมกกว่าการศึกษาสโนิปส์แค่เพียงตำแหน่งเดียว

3.1 การศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์บนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดกับกลุ่มควบคุม ไม่พบสไนป์ทั้ง 7 ตำแหน่งถ่ายทอดไปด้วย (LD < 80) ดังแสดงในรูปที่ 37 (A) และไม่พบสไนป์แฮพลotype แบบใดของสไนป์ทั้ง 7 ตำแหน่งมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 49 และเมื่อพิจารณาการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ 6, 5, 4, และ 3 ตำแหน่งพร้อมกัน ไม่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์แต่ละแบบที่ศึกษา แต่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ 2 ตำแหน่งคือ rs2072403 บริเวณเอกซอน 15 และ rs392691 บริเวณเอกซอน 22 ขนาดประมาณ 41 กิโลเบสถ่ายทอดไปด้วยกัน (LD > 80) ดังแสดงในรูปที่ 37 (B) แต่เมื่อพิจารณาในรูปแบบสไนป์แฮพลotype ในบล็อกดังกล่าวไม่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์แฮพลotype ใดๆ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 50



รูปที่ 37 แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรมแฮพลotype วิเคราะห์การถ่ายทอดไปด้วยกันพิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

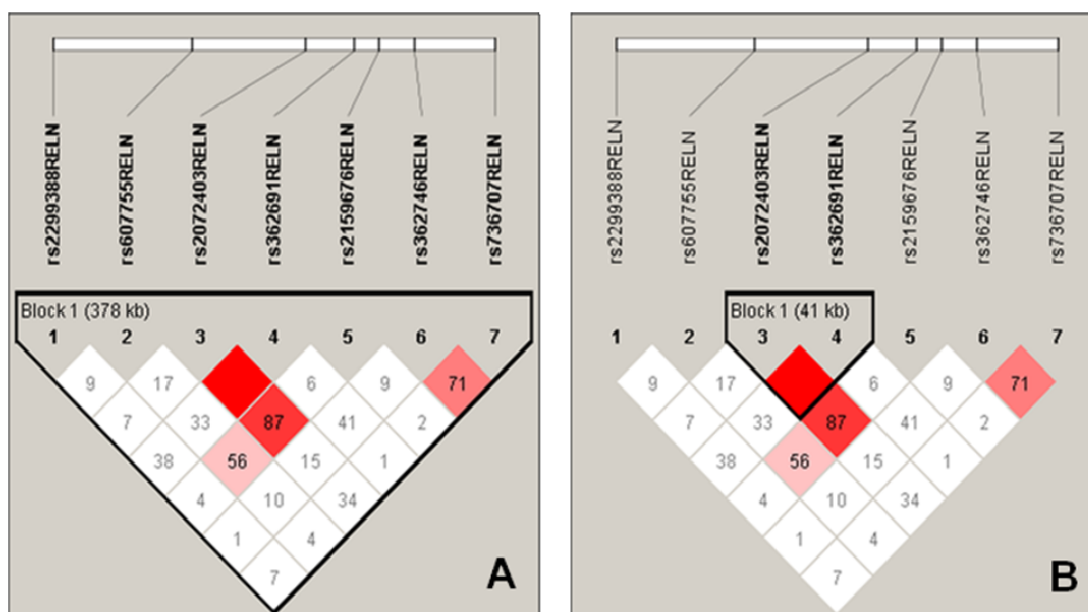
ตารางที่ 49 แสดงความถี่แฮพโลไทป์ของสปีส์ทั้ง 7 ตำแหน่งบนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วย ออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิ

แฮพโลไทป์	ความถี่ แฮพโลไทป์	ความถี่		Chi Square	P - Value
		ผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม		
TATGCAT	0.116	0.115	0.117	0.007	0.9318 NS
TATGCAC	0.067	0.049	0.080	3.228	0.0724 NS
TGTGAAT	0.063	0.074	0.055	1.218	0.2698 NS
TGTGAAC	0.059	0.062	0.057	0.094	0.7587 NS
CATGCAT	0.055	0.065	0.048	1.263	0.261 NS
TACGAAT	0.051	0.052	0.050	0.019	0.8914 NS
CATGCAC	0.05	0.056	0.045	0.58	0.4462 NS
TATCCAT	0.046	0.050	0.043	0.226	0.6345 NS
CGTGAAT	0.038	0.046	0.032	1.104	0.2933 NS
TATGCGC	0.035	0.030	0.038	0.359	0.5491 NS
TATCAAT	0.033	0.029	0.036	0.33	0.5654 NS
TGCGAAT	0.03	0.027	0.032	0.19	0.6629 NS
TATCAAC	0.027	0.021	0.032	0.98	0.3223 NS
TGTGCAC	0.024	0.025	0.024	0.012	0.9134 NS
TATGAAT	0.024	0.025	0.023	0.024	0.8774 NS
TGTGCAT	0.02	0.025	0.016	0.849	0.3569 NS
TATCCAC	0.018	0.014	0.021	0.634	0.4261 NS
CACGAAT	0.017	0.013	0.021	0.748	0.387 NS
TGTGAGC	0.017	0.015	0.019	0.241	0.6238 NS
CATGAAC	0.016	0.016	0.017	0.002	0.9638 NS
CACGAAC	0.016	0.013	0.018	0.355	0.5515 NS
TGTCAAT	0.015	0.012	0.018	0.53	0.4665 NS
TACGAGC	0.013	0.009	0.016	0.76	0.3834 NS
CGTGCAT	0.011	0.017	0.007	2.017	0.1555 NS

ตารางที่ 50 แสดงความถี่แฮโพลไทป์ของสไนป์ส์ rs2072403 และ rs362691 บนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมแฮโพลวิว

แฮโพลไทป์	ความถี่แฮโพลไทป์	ความถี่		Chi Square	P - Value
		ผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม		
TG	0.662	0.684	0.646	1.350	0.2453 NS
TC	0.188	0.173	0.200	1.033	0.3094 NS
CG	0.150	0.144	0.154	0.182	0.6697 NS

การศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ไม่พบสไนป์ส์ทั้ง 7 ตำแหน่งถ่ายทอดไปด้วย (LD < 80) ดังแสดงในรูปที่ 38 (A) และไม่พบสไนป์ส์แฮโพลไทป์แบบใดของสไนป์ส์ทั้ง 7 ตำแหน่งมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมเพศชายกับกลุ่มควบคุมเพศชาย พบสไนป์ส์ rs2072403 และ rs362691 ถ่ายทอดไปด้วยกัน ดังแสดงในรูปที่ 38 (B) แต่ไม่พบสไนป์ส์แฮโพลไทป์ในบล็อกดังกล่าวแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมเพศชายกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 51



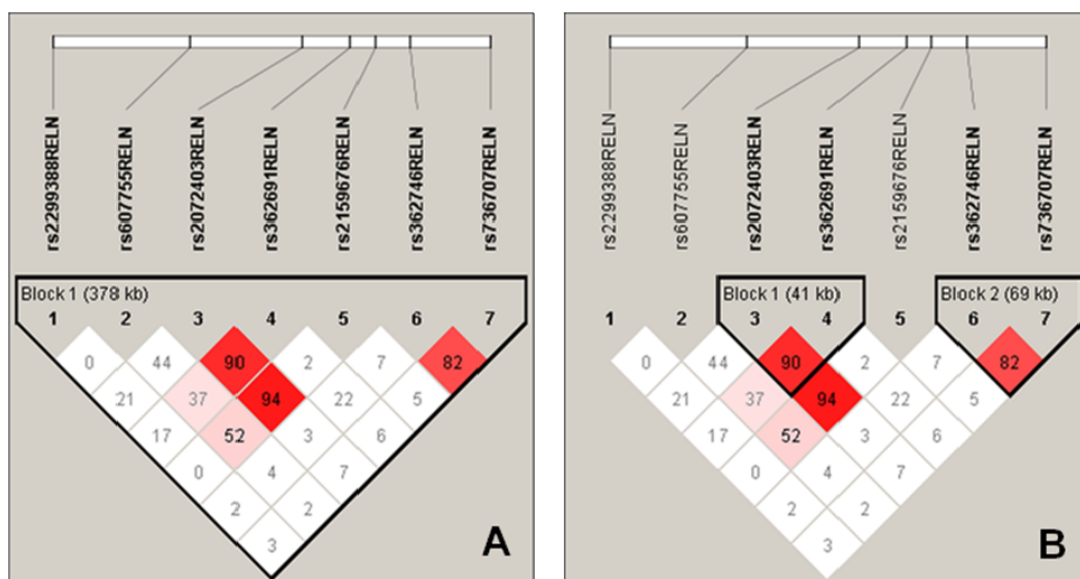
รูปที่ 38 แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย โดยใช้โปรแกรมแฮโพลวิว การถ่ายทอดไปด้วยกันพิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

ตารางที่ 51 แสดงความถี่แฮโพลไทป์ของสไนป์ส์ rs2072403 และ rs362691 บนยีน *RELN* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย โดยใช้โปรแกรมแฮโพลวิว

แฮโพลไทป์	ความถี่ แฮโพลไทป์	ความถี่		Chi Square	P - Value
		ผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม		
TG	0.662	0.692	0.635	2.454	0.1172 NS
TC	0.189	0.179	0.197	0.319	0.5721 NS
CG	0.150	0.128	0.169	2.125	0.1449 NS

3.2 การศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม

การศึกษานี้สนใจศึกษาการถ่ายทอดสไนป์ส์แฮโพลไทป์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมแฮโพลวิว จากการศึกษาไม่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ส์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 39 (A) และไม่พบสไนป์ส์แฮโพลไทป์แบบใดมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าที่คาดไว้ แต่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ส์แบบ 2 ตำแหน่ง 2 บล็อกคือ บล็อกแรกประกอบด้วยสไนป์ส์ rs2072403 และ rs362691 มีความยาวประมาณ 41 กิโลเบส เช่นเดียวกับการศึกษาแบบ population based case control และบล็อกที่ 2 ประกอบด้วยสไนป์ส์ rs362746 และ rs736707 มีความยาวประมาณ 69 กิโลเบส ดังแสดงในรูปที่ 39 (B) เมื่อพิจารณาในรูปแบบสไนป์ส์แฮโพลไทป์ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในการถ่ายทอดสไนป์ส์แฮโพลไทป์ดังกล่าวในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม ดังแสดงในตารางที่ 52



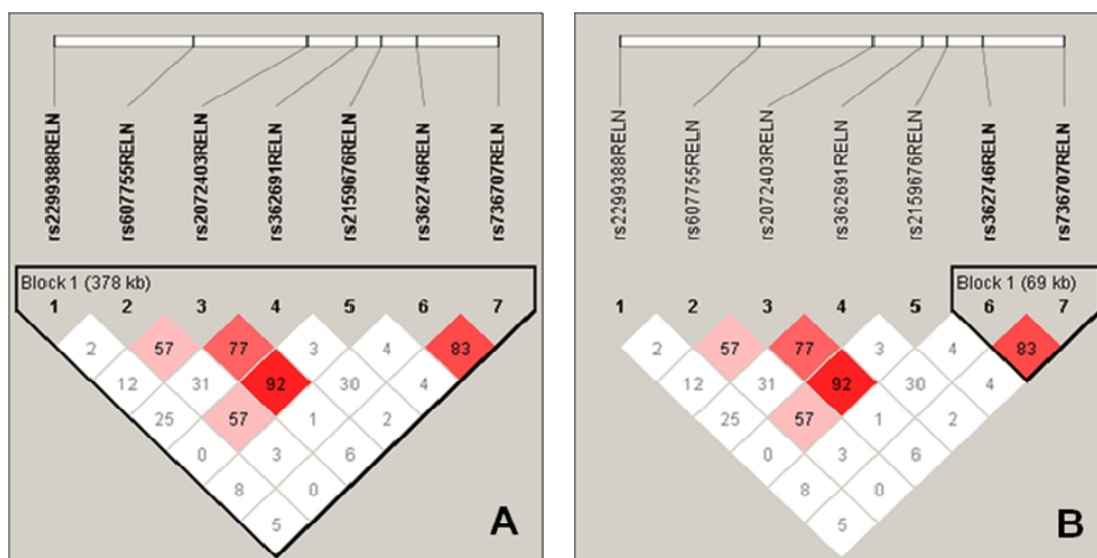
รูปที่ 39 แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว การถ่ายทอดไปด้วยกัน พิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

ตารางที่ 52 แสดงความถี่แฮพลไทป์บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว

บล็อก	แฮพลไทป์	ความถี่แฮพลไทป์	ความถี่ของการถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	Chi Square	P - Value
(rs2072403-rs362691)	TG	0.688	69.1 : 69.2	0.000	0.9956 NS
	TC	0.190	48.9 : 56.8	0.596	0.4401 NS
	CG	0.120	40.9 : 31.8	1.131	0.2876 NS
(rs362746-rs736707)	AT	0.530	93.3 : 72.1	2.726	0.0987 NS
	AC	0.322	67.7 : 73.9	0.274	0.6004 NS
	GC	0.135	29.3 : 45.1	3.341	0.0676 NS
	GT	0.014	4.7 : 3.9	0.068	0.7939 NS

การศึกษาสนิปส์แฮพลไทป์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดไม่พบความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดสนิปส์แฮพลไทป์แต่ละแบบทั้ง 2 บล็อก ($P > 0.05$)

การศึกษาสลิปส์แฮพลไทป์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชาย ไม่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 40 (A) และไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์แบบใดมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าที่คาดไว้ พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ 2 ตำแหน่ง คือ rs362746 และ rs736707 ดังแสดงในรูปที่ 40 (B) แต่ไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์แบบใดในบล็อกดังกล่าวมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกชายสูงกว่าสลิปส์แบบอื่นๆ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 53



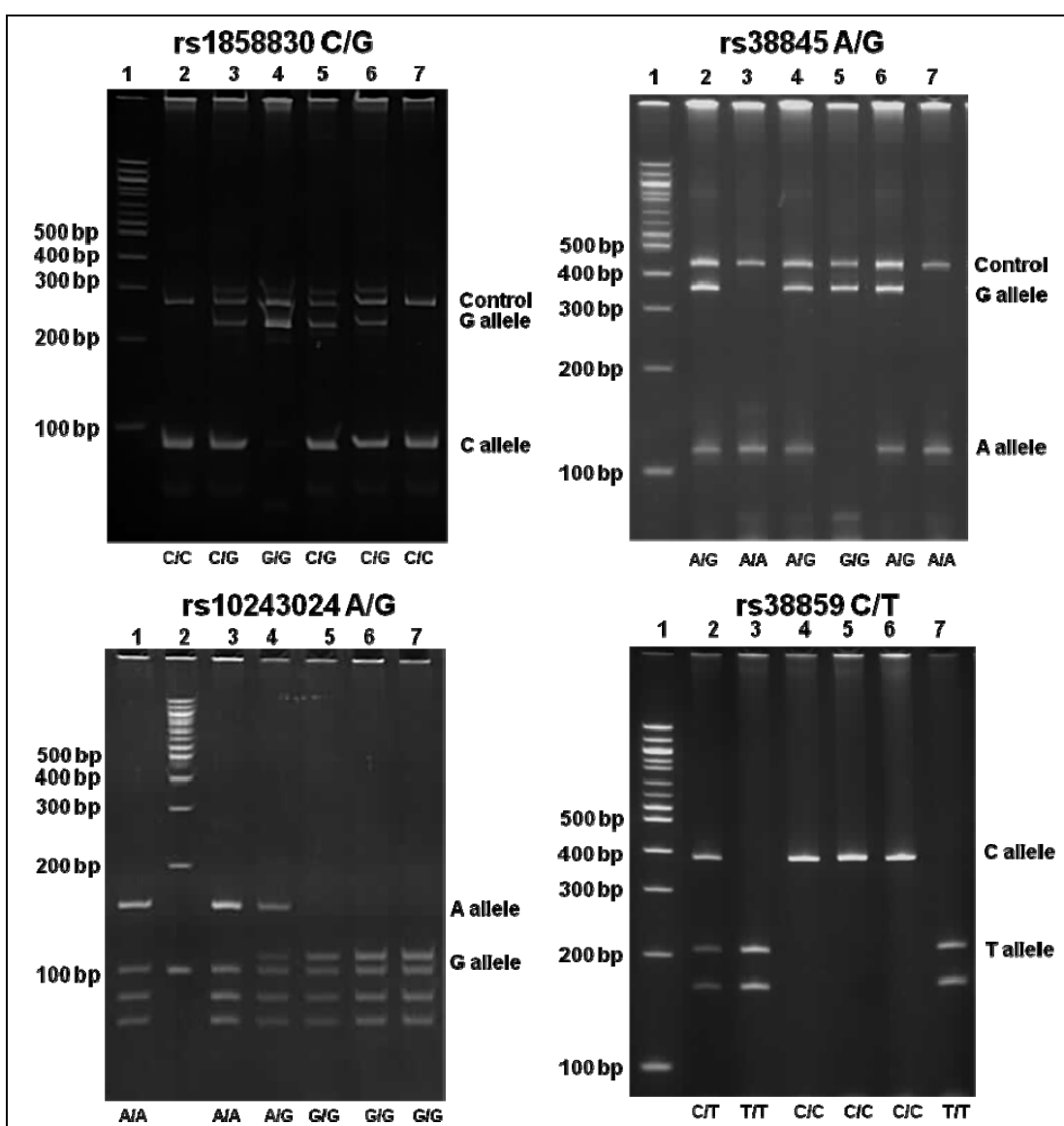
รูปที่ 40 แสดงแผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชาย โดยใช้โปรแกรมแฮพลิว การถ่ายทอดไปด้วยกันพิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

ตารางที่ 53 แสดงความถี่แฮพลไทป์บนยีน *RELN* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชาย โดยใช้โปรแกรมแฮพลิว

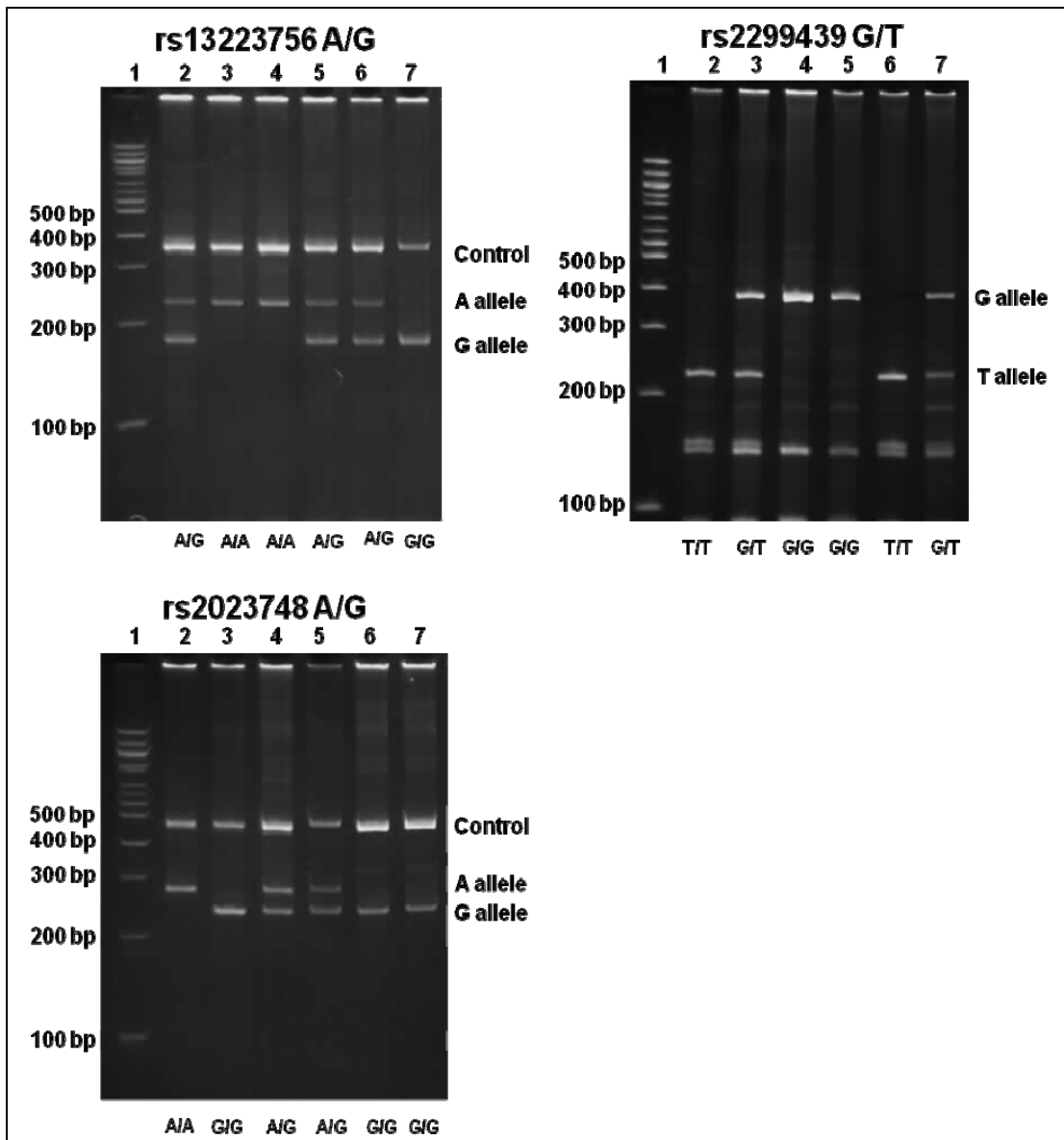
บล็อก	แฮพลไทป์	ความถี่แฮพลไทป์	ความถี่ของการถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	Chi Square	P - Value
(rs362746- rs736707)	AT	0.534	76.3 : 60.1	1.917	0.1662 NS
	AC	0.330	55.7 : 62.9	0.434	0.5099 NS
	GC	0.124	23.3 : 33.1	1.710	0.1910 NS
	GT	0.012	3.7 : 2.9	0.104	0.7466 NS

ผลการศึกษาสหิปล์บยีน *MET*

ผลการศึกษาลำโพงของสนิปล์บยีน *MET* ใช้วิธี Biallelic-ARMS PCR และ PCR-RFLP โดยผลการศึกษาลองแต่ละลำนโพงพิจารณาตามขนาดของพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 41-42



รูปที่ 41 แสดงผลการอ่านลำนโพงบนเจลโพลีอะคริลลาไมด์ของสนิปล์ rs1858830 (บนซ้าย) rs38845 (บนขวา) rs10243024 (ล่างซ้าย) และ rs38859 (ล่างขวา)



รูปที่ 42 แสดงผลการอ่านจีโนไทป์บนเจลโพลีอะคริลาไมด์ของสไนป์ส์ rs13223756 (บนซ้าย) rs2299439 (บนขวา) และrs2023748 (ล่างซ้าย)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *MET* แบบ Population based case control

1.1 การศึกษาสมดุลของประชากร (Hardy-Weinberg Equilibrium) ในกลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมที่นำมาใช้ในการศึกษาแบบ Population based case control จะต้องมีการตรวจสอบการกระจายความถี่จีโนไทป์ให้เป็นไปตามกฎสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) คือในประชากรใดๆ ต้องมีความถี่จีโนไทป์คงที่ ผลการทดสอบกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษานี้มีผลจีโนไทป์ครบทุกรายคิดเป็นร้อยละ 100 (จำนวน 250 คน) และการกระจายความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มควบคุมเป็นไปตามกฎสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 54

ตารางที่ 54 แสดงค่าฮาร์ดีไวน์เบิร์ก และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีของสลิปส์ทุกตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *MET* โดยโปรแกรม PLINK

ชื่อสลิปส์	ObsHET	PredHET	HWpval	%Geno	MAF	แอลลีล
rs1858830	0.420	0.418	1.0000	100	0.298	G:C
rs38845	0.456	0.499	0.1659	100	0.480	G:A
rs10243024	0.448	0.467	0.5013	100	0.372	G:A
rs38859	0.496	0.494	1.0000	100	0.444	C:T
rs13223756	0.412	0.445	0.2557	100	0.334	A:G
rs2299439	0.508	0.493	0.7011	100	0.442	T:G
rs2023748	0.540	0.496	0.2016	100	0.454	G:A

คำอธิบาย

ObsHET	คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed Heterozygosity)
PredHET	คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (Predicted Heterozygosity)
HWpval	คือ ค่า P ของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg P value)
%Geno	คือ ร้อยละของผลการทดสอบจีโนไทป์ในสลิปส์แต่ละตำแหน่ง
MAF	คือ ค่าความถี่แอลลีลที่พบน้อย (Minor allele frequency)

1.2 การศึกษาความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *MET* ในผู้ป่วย ออทิซึมสเปคตรัมเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความถี่แอลลีลในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษายีน *MET* แสดงรายละเอียดในตารางที่ 55 และในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย แสดงรายละเอียดในตารางที่ 56

ตารางที่ 55 แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษายีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)

ชื่อสไนป์ส์	ตำแหน่ง สไนป์ส์	แอลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value	OR(CI)
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่			
rs18858830	Promoter	C	131	0.3484	149	0.2980	2.507	0.1133 NS	1.260 (0.9464-1.676)
		G	245	0.6516	351	0.7020			
rs38845	Intron 1	A	181	0.4814	240	0.4800	0.002	0.9677 NS	1.006 (0.7693-1.314)
		G	195	0.5186	260	0.5200			
rs10243024	Intron 2	A	118	0.3138	186	0.3720	3.205	0.0734 NS	0.7721 (0.5816-1.025)
		G	258	0.6862	314	0.6280			
rs38859	Intron 3	T	191	0.5080	222	0.4440	3.525	0.0604 NS	1.293 (0.9886-1.691)
		C	185	0.4920	278	0.5560			
rs13223756	Exon 7	G	112	0.2979	167	0.3340	1.291	0.2560 NS	0.8459 (0.6338-1.129)
		A	264	0.7021	333	0.6660			
rs2299439	Intron 15	G	186	0.4947	221	0.4420	2.394	0.1218 NS	1.236 (0.945-1.616)
		T	190	0.5053	279	0.5580			
rs2023748	Exon 21	A	185	0.4920	227	0.4540	1.245	0.2644 NS	1.165 (0.8909-1.523)
		G	191	0.5080	273	0.5460			

ตารางที่ 56 แสดงความถี่แอลลีลของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=1)

ชื่อสไนป์ส์	ตำแหน่งสไนป์ส์	แอลลีล	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value	OR(CI)
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่			
rs18858830	Promoter	C	109	0.3494	109	0.3062	1.410	0.235 NS	1.217 (0.88-1.682)
		G	203	0.6506	247	0.6938			
rs38845	Intron 1	A	151	0.4840	167	0.4691	0.147	0.701 NS	1.061 (0.7829-1.439)
		G	161	0.5160	189	0.5309			
rs10243024	Intron 2	A	96	0.3077	122	0.3427	0.927	0.3357 NS	0.8525 (0.6159-1.180)
		G	216	0.6923	234	0.6573			
rs38859	Intron 3	T	154	0.4936	169	0.4747	0.237	0.626 NS	1.078 (0.7956-1.462)
		C	158	0.5064	187	0.5253			
rs13223756	Exon 7	G	95	0.3045	107	0.3006	0.012	0.9122 NS	1.019 (0.7318-1.418)
		A	217	0.6955	249	0.6994			
rs2299439	Intron 15	G	151	0.4840	165	0.4635	0.280	0.5966 NS	1.086 (0.8007-1.472)
		T	161	0.5160	191	0.5365			
rs2023748	Exon 21	A	148	0.4744	170	0.4775	0.007	0.9348 NS	0.9874 (0.7283-1.339)
		G	164	0.5256	186	0.5225			

1.3 การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความถี่จีโนไทป์ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 57 และตารางที่ 58

ตารางที่ 57 แสดงความถี่จีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (188 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุม (250 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)

ชื่อสลิปส์	ตำแหน่งสลิปส์	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่		
rs18858830	Promoter	C/C	21	11.17	22	8.8	2.695	0.2599 NS
		C/G	89	47.34	105	42.0		
		G/G	78	41.49	123	49.2		
rs38845	Intron 1	A/A	42	22.34	63	25.2	1.546	0.4617 NS
		A/G	97	51.60	114	45.6		
		G/G	49	26.06	73	29.2		
rs10243024	Intron 2	A/A	20	10.64	37	14.8	3.073	0.2151 NS
		A/G	78	41.49	112	44.8		
		G/G	90	47.87	101	40.4		
rs38859	Intron 3	T/T	46	24.47	49	19.6	3.831	0.1472 NS
		C/T	99	52.66	124	49.6		
		C/C	43	22.87	77	30.8		
rs13223756	Exon 7	G/G	18	9.57	32	12.8	1.354	0.5083 NS
		A/G	76	40.43	103	41.2		
		A/A	94	50.0	115	46.0		
rs2299439	Intron 15	G/G	45	23.94	47	18.8	2.463	0.2918 NS
		G/T	96	51.06	127	50.8		
		T/T	47	25.0	76	30.4		
rs2023748	Exon 21	A/A	43	22.87	46	18.4	1.493	0.474 NS
		A/G	99	52.66	135	54.0		
		G/G	46	24.47	69	27.6		

ตารางที่ 58 แสดงความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย (156 ราย) เทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย (178 คน) ด้วยโปรแกรม PLINK (df=2)

ชื่อสไนป์ส์	ตำแหน่งสไนป์ส์	จีโนไทป์	กลุ่มผู้ป่วย		กลุ่มควบคุม		χ^2	P-value
			จำนวน	ความถี่	จำนวน	ความถี่		
rs18858830	Promoter	C/C	18	11.54	19	10.67	2.072	0.3548 NS
		C/G	73	46.79	71	39.89		
		G/G	65	41.67	88	49.44		
rs38845	Intron 1	A/A	36	23.08	45	25.28	1.904	0.3859 NS
		A/G	79	50.64	77	43.26		
		G/G	41	26.28	56	31.46		
rs10243024	Intron 2	A/A	17	10.90	20	11.24	1.585	0.4526 NS
		A/G	62	39.74	82	46.07		
		G/G	77	49.36	76	42.69		
rs38859	Intron 3	T/T	35	22.44	40	22.47	0.7062	0.7025 NS
		C/T	84	53.85	89	50.00		
		C/C	37	23.71	49	27.53		
rs13223756	Exon 7	G/G	16	10.26	20	11.24	0.2867	0.8666 NS
		A/G	63	40.38	67	37.64		
		A/A	77	49.36	91	51.12		
rs2299439	Intron 15	G/G	35	22.44	37	20.79	0.3003	0.8606 NS
		G/T	81	51.92	91	51.12		
		T/T	40	25.64	50	28.09		
rs2023748	Exon 21	A/A	34	21.80	38	21.35	0.0817	0.9600 NS
		A/G	80	51.28	94	52.81		
		G/G	42	26.92	46	25.84		

1.4 การศึกษาความถี่จีโนไทป์ของสไนป์ส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *MET* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ genetic model แบบต่าง ๆ

จากผลการศึกษาความถี่ของแอลลีลและจีโนไทป์ของยีน *MET* ที่ไม่พบความแตกต่างของทั้งแอลลีลและจีโนไทป์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชาย ในการศึกษาแบบ genetic model ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 59 และตารางที่ 60

ตารางที่ 59 แสดงค่าความน่าจะเป็น (*P*-value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมดด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model

ชื่อสลิปส์	ตำแหน่งสลิปส์	P-value		
		additive model d.f.=1	dominant model d.f.=1	recessive model d.f.=1
rs1858830	Promoter (C/G)	0.1108 NS	0.1094 NS	0.4103 NS
rs38845	Intron 1 (A/G)	0.9682 NS	0.4688 NS	0.4880 NS
rs10243024	Intron 2 (A/G)	0.0804 NS	0.1189 NS	0.2019 NS
rs38859	Intron 3 (C/T)	0.0584 NS	0.0664 NS	0.2219 NS
rs13223756	Exon 7 (A/G)	0.2701 NS	0.4069 NS	0.2949 NS
rs2299439	Intron 15 (G/T)	0.1181 NS	0.2138 NS	0.1924 NS
rs2023748	Exon 21 (A/G)	0.2471 NS	0.4612 NS	0.2503 NS

หมายเหตุ แอลลีลตัวหนาแสดงแอลลีลที่พบได้น้อย (Minor allele)
 การวิเคราะห์ในรูปแบบ genetic model จากโปรแกรม PLINK โปรแกรมจะทำการคำนวณ Minor allele และ Major allele
 ตัวอย่างการศึกษาสลิปส์ rs1858830 ในรูปแบบ genetic model
 Additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง G/G และ ½ ของ C/G เปรียบเทียบกับ C/C และ ½ ของ C/G
 Dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง G/G เปรียบเทียบกับ C/C และ C/TG
 Recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง C/C เปรียบเทียบกับ G/G และ C/G

ตารางที่ 60 แสดงค่าความน่าจะเป็น (*P*-value) จากการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของสลิปส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *MET* ในผู้ป่วยอหิวาต์ซึมสเปคตรัมเพศชายเทียบกับกลุ่มควบคุมเพศชายด้วยโปรแกรม PLINK ในรูปแบบ genetic model

ชื่อสลิปส์	ตำแหน่งสลิปส์	P-value		
		additive model d.f.=1	dominant model d.f.=1	recessive model d.f.=1
rs1858830	Promoter (C/G)	0.2403 NS	0.1554 NS	0.8018 NS
rs38845	Intron 1 (A/G)	0.7097 NS	0.2988 NS	0.6393 NS
rs10243024	Intron 2 (A/G)	0.3409 NS	0.2231 NS	0.9217 NS
rs38859	Intron 3 (C/T)	0.6198 NS	0.4272 NS	0.9937 NS
rs13223756	Exon 7 (A/G)	0.9154 NS	0.7476 NS	0.7734 NS
rs2299439	Intron 15 (G/T)	0.5906 NS	0.6149 NS	0.7146 NS
rs2023748	Exon 21 (A/G)	0.9333 NS	0.8231 NS	0.9211 NS

หมายเหตุ แอลลีลตัวหนาแสดงแอลลีลที่พบได้น้อย (Minor allele)
 การวิเคราะห์ในรูปแบบ genetic model จากโปรแกรม PLINK โปรแกรมจะทำการคำนวณ Minor allele และ Major allele
 ตัวอย่างการศึกษาสลิปส์ rs1858830 ในรูปแบบ genetic model
 Additive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง G/G และ ½ ของ C/G เปรียบเทียบกับ C/C และ ½ ของ C/G
 Dominant model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง G/G เปรียบเทียบกับ C/C และ C/TG
 Recessive model เป็นการทดสอบลักษณะจีโนไทป์ระหว่าง C/C เปรียบเทียบกับ G/G และ C/G

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *MET* แบบ Family based association ด้วยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม

ผลการศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกด้วยวิธี TDT ของสลิปส์บนยีน *MET* ไม่พบความแตกต่างทางสถิติทั้งในกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด แสดงรายละเอียดในตารางที่ 61 และกลุ่มครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมเพศชาย แสดงรายละเอียดในตารางที่ 62

ตารางที่ 61 แสดงค่า *P*-value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสลิปส์ตำแหน่ง rs1858830, rs38845, rs10243024, rs38859, rs13223756, rs2299439 และ rs2023748 บนยีน *MET* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม PLINK

สลิปส์	แอลลีล	ถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (จำนวนแอลลีล)	Chi square (χ^2)	<i>P</i> -value
rs1858830	C:G	70:84	1.273	0.2593 NS
rs38845	A:G	85:87	0.0232	0.8788 NS
rs10243024	A:G	73:78	0.1656	0.6841 NS
rs38859	T:C	94:70	3.512	0.0609 NS
rs13223756	G:A	69:73	0.1127	0.7371 NS
rs2299439	G:T	86:76	0.6173	0.4321 NS
rs2023748	A:G	94:72	2.916	0.0877 NS

คำอธิบาย การถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (72:85) ของสลิปส์ rs1858830 คือ ถ่ายทอดแอลลีล C เท่ากับ 70 และถ่ายทอดแอลลีล G เท่ากับ 84

การศึกษากการถ่ายทอดแอลลีลในครอบครัวในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด ไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าอีกแอลลีลหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญในสลิปส์ทุกตำแหน่ง ($P > 0.05$)

ตารางที่ 62 แสดงค่า *P*-value ของการถ่ายทอดแอลลีลของสไนป์ส์ตำแหน่ง rs1858830, rs38845, rs10243024, rs38859, rs13223756, rs2299439 และ rs2023748 บนยีน *MET* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเพศชายทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม PLINK

สไนป์ส์	แอลลีล	ถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (จำนวนแอลลีล)	Chi square (χ^2)	<i>P</i> -value
rs1858830	C:G	57:71	1.531	0.2159 NS
rs38845	A:G	72:68	0.1143	0.7353 NS
rs10243024	A:G	61:66	0.1969	0.6573 NS
rs38859	T:C	77:62	1.619	0.2033 NS
rs13223756	G:A	61:59	0.0333	0.8551 NS
rs2299439	G:T	72:66	0.2609	0.6095 NS
rs2023748	A:G	74:65	0.5827	0.4452 NS

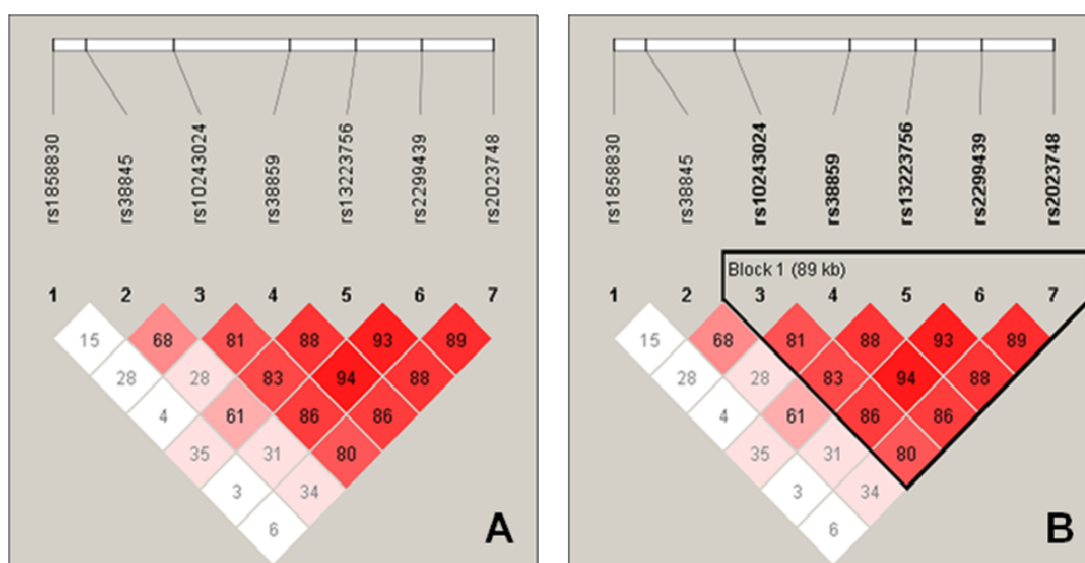
คำอธิบาย การถ่ายทอด:ไม่ถ่ายทอด (57:71) ของสไนป์ส์ rs1858830 คือ ถ่ายทอดแอลลีล C เท่ากับ 57 และถ่ายทอดแอลลีล G เท่ากับ 71

การศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมเพศชายไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าอีกแอลลีลหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญในสไนป์ส์ทุกตำแหน่ง ($P > 0.05$)

3. การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) ของสไนป์บนยีน *MET*

3.1 การถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ทั้ง 7 ตำแหน่งบนยีน *MET* ไม่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ($LD < 80$) ดังแสดงในรูปที่ 42 (A) และเมื่อพิจารณา สไนป์แฮพลไทป์ไม่พบความแตกต่างของสไนป์แฮพลไทป์แบบใดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุม แต่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสไนป์ 5 ตำแหน่ง ($LD > 80$) ประกอบด้วยสไนป์ rs10243024, rs38859, rs13223756, rs2299439 และ rs2023748 มีความยาวประมาณ 89 กิโลเบสถ่ายทอดไปด้วยกัน ดังแสดงในรูปที่ 42 (B) แต่ไม่พบสไนป์แฮพลไทป์แบบใดในบล็อกดังกล่าวมีความแตกต่างกันระหว่างผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 63



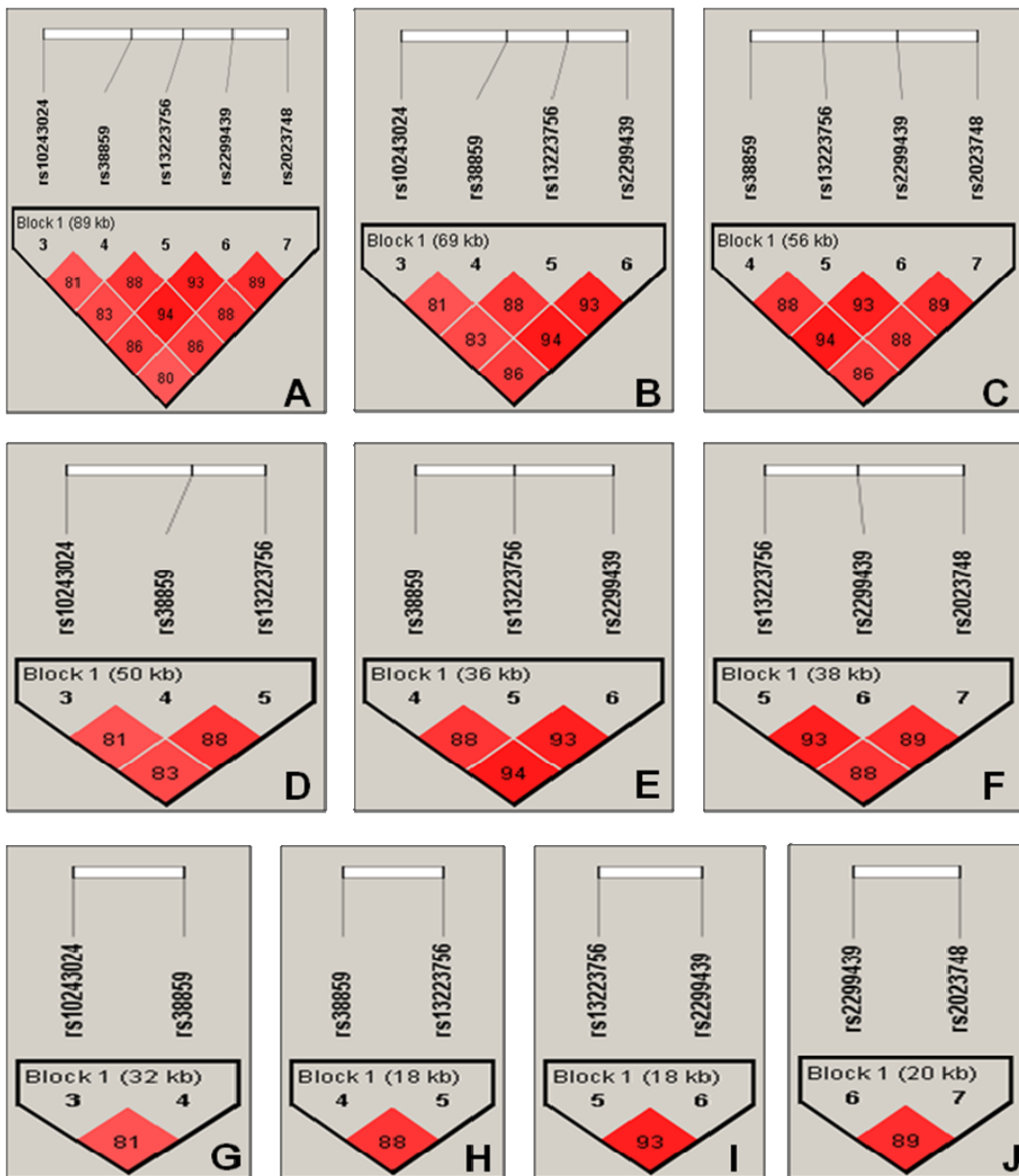
รูปที่ 42 แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *MET* ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรมแฮพลวิว การถ่ายทอดไปด้วยกันพิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

ตารางที่ 63 แสดงความถี่แฮโพลไทป์ของสไนป์ส์ rs10243024-rs38859-rs13223756-rs2299439-rs2023748 บนยีน *MET* ในกลุ่มผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งหมด โดยใช้โปรแกรมแฮโพลวิว

แฮโพลไทป์	ความถี่ แฮโพลไทป์	ความถี่		Chi Square	P - Value
		ผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม		
GTAGA	0.407	0.443	0.380	3.492	0.0617 NS
ACGTG	0.264	0.254	0.272	0.371	0.5423 NS
GCATG	0.162	0.179	0.150	1.386	0.2391 NS
ACATG	0.04	0.023	0.053	4.858	0.0275 ***
GCGTG	0.026	0.016	0.033	2.264	0.1324 NS
GTAGG	0.017	0.013	0.021	0.759	0.3835 NS
ATAGA	0.015	0.012	0.018	0.429	0.5126 NS
ACGTA	0.012	0.007	0.016	1.574	0.2096 NS
GCAGA	0.012	0.008	0.014	0.649	0.4206 NS

การศึกษาสไนป์ส์แฮโพลไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปคตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมพบความแตกต่างของสไนป์ส์แฮโพลไทป์แบบ A-C-A-T-G ของสไนป์ส์ rs10243024-rs38859-rs13223756-rs2299439-rs2023748 ในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.0275$) แต่พบสไนป์ส์แฮโพลไทป์ดังกล่าวน้อย (ร้อยละ 4) ซึ่งอาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญ

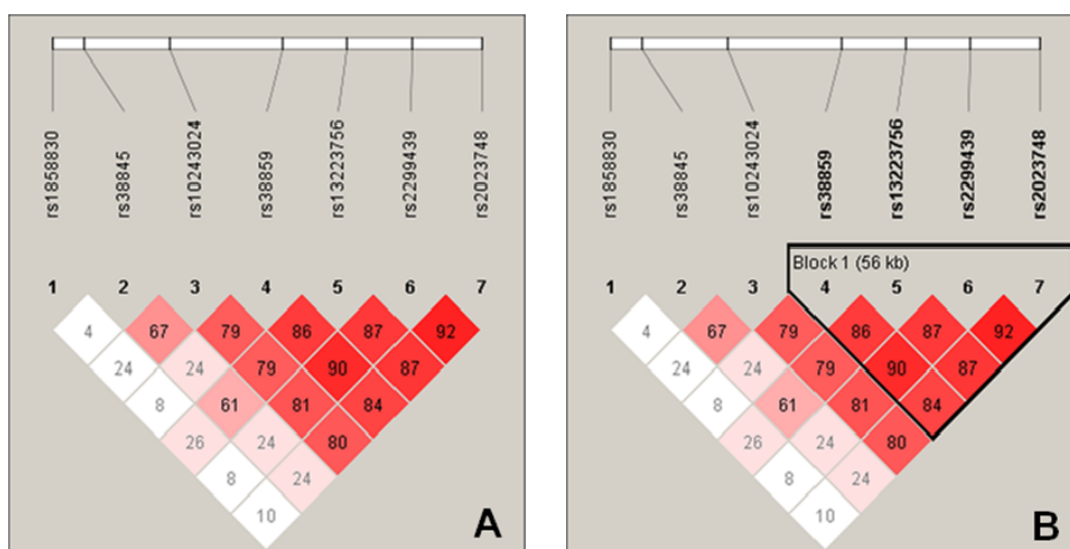
เมื่อแยกพิจารณาสไนป์ส์แฮโพลไทป์ในบล็อกที่ถ่ายทอดไปด้วยกัน ตั้งแต่สไนป์ส์ rs10243024-rs2023748 ดังแสดงในรูปที่ 43 โดยพิจารณาสไนป์ส์ 5 ตำแหน่ง (รูปที่ 43 A) 4 ตำแหน่ง (รูปที่ 43 B,C) 3 ตำแหน่ง (รูปที่ 43 D-F) และ 2 ตำแหน่ง (รูปที่ 43 G-J) ไม่พบสไนป์ส์แฮโพลไทป์แบบใดในการพิจารณาแต่ละแบบมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$)



รูปที่ 43 แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *MET* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว การถ่ายทอดไปด้วยกัน พิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

3.2 การถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ผลการศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์บนยีน *MET* ไม่พบสลิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งถ่ายทอดไปด้วยกันจากพ่อแม่ไปสู่ลูก ดังแสดงในรูปที่ 44 (A) และไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์ของสลิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าที่คาดไว้ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 64 แต่พบสลิปส์ rs38859 rs13223756 rs2299439 และ rs2023748 ตั้งแต่อินทรี 3 ถึงเอกซอน 21 มีความยาวประมาณ 56 กิโลเบสมีการถ่ายทอดไปด้วยกันในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 44 (B) และพบสลิปส์แฮพลไทป์แบบ T-A-G-A ซึ่งประกอบด้วยสลิปส์ rs38859 rs13223756 rs2299439 และ rs2023748 ตั้งแต่อินทรี 3 ถึงเอกซอน 21 มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นโรคสูงกว่าแฮพลไทป์แบบอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ($P = 0.0400$) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 65 แต่ไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์ดังกล่าวมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย



รูปที่ 44 แผนที่การถ่ายทอดไปด้วยกัน (Linkage disequilibrium map, LD map) บนยีน *MET* ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว การถ่ายทอดไปด้วยกันพิจารณาจากค่า $D' > 0.8$ หรือร้อยละ 80

ตารางที่ 64 แสดงความถี่แฮพลไทป์ของสไนป์ส์ทั้ง 7 ตำแหน่งบนยีน *MET* ในครอบครัวผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว

แฮพลไทป์	ความถี่	ความถี่ของการ ถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	Chi Square	P - Value
GGGTAGA	0.161	41.5 : 40.1	0.024	0.8763 NS
GAACGTG	0.157	47.5 : 33.5	2.394	0.1218 NS
CGGTAGA	0.093	31.8 : 24.1	1.068	0.3013 NS
CAGTAGA	0.073	23.1 : 16.9	0.971	0.3244 NS
CGGCATG	0.073	21.4 : 21.9	0.006	0.937 NS
GGGCATG	0.072	18.7 : 21.7	0.222	0.6376 NS
GAGTAGA	0.064	21.5 : 12.9	2.17	0.1407 NS
CAACGTG	0.039	9.0 : 13.7	0.95	0.3298 NS
GGACGTG	0.028	12.8 : 5.3	3.107	0.0779 NS
GAGCATG	0.023	11.0 : 4.9	2.397	0.1216 NS
GAACATG	0.02	3.0 : 10.4	4.105	0.0427 NS
CAGCATG	0.016	4.8 : 5.5	0.045	0.8325 NS
GGGCAGA	0.015	3.0 : 4.1	0.169	0.6811 NS
GAGCGTG	0.015	2.6 : 6.0	1.39	0.2384 NS
CGACGTG	0.013	1.7 : 6.5	2.806	0.0939 NS
CAACATG	0.013	3.0 : 4.6	0.323	0.5700 NS
GGGTAGG	0.012	3.2 : 4.0	0.095	0.7581 NS

ตารางที่ 65 แสดงความถี่แฮพลไทป์บนยีน *MET* ในครอบครัวผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัม โดยใช้โปรแกรมแฮพลอวิว ของสไนป์ส์ rs38859 rs13222756 rs2299439 และ rs2023748

แฮพลไทป์	ความถี่	ความถี่ของการ ถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	Chi Square	P - Value
TAGA	0.408	86.4 : 61.4	4.22	0.0400 ***
CGTG	0.267	60.4 : 60.3	0.00	0.9958 NS
CATG	0.22	51.6 : 59.7	0.586	0.4441 NS
TAGG	0.024	4.0 : 11.0	3.239	0.0719 NS
CAGA	0.023	4.0 : 10.0	2.548	0.1105 NS
TATG	0.01	3.0 : 3.0	0.00	1.0000 NS

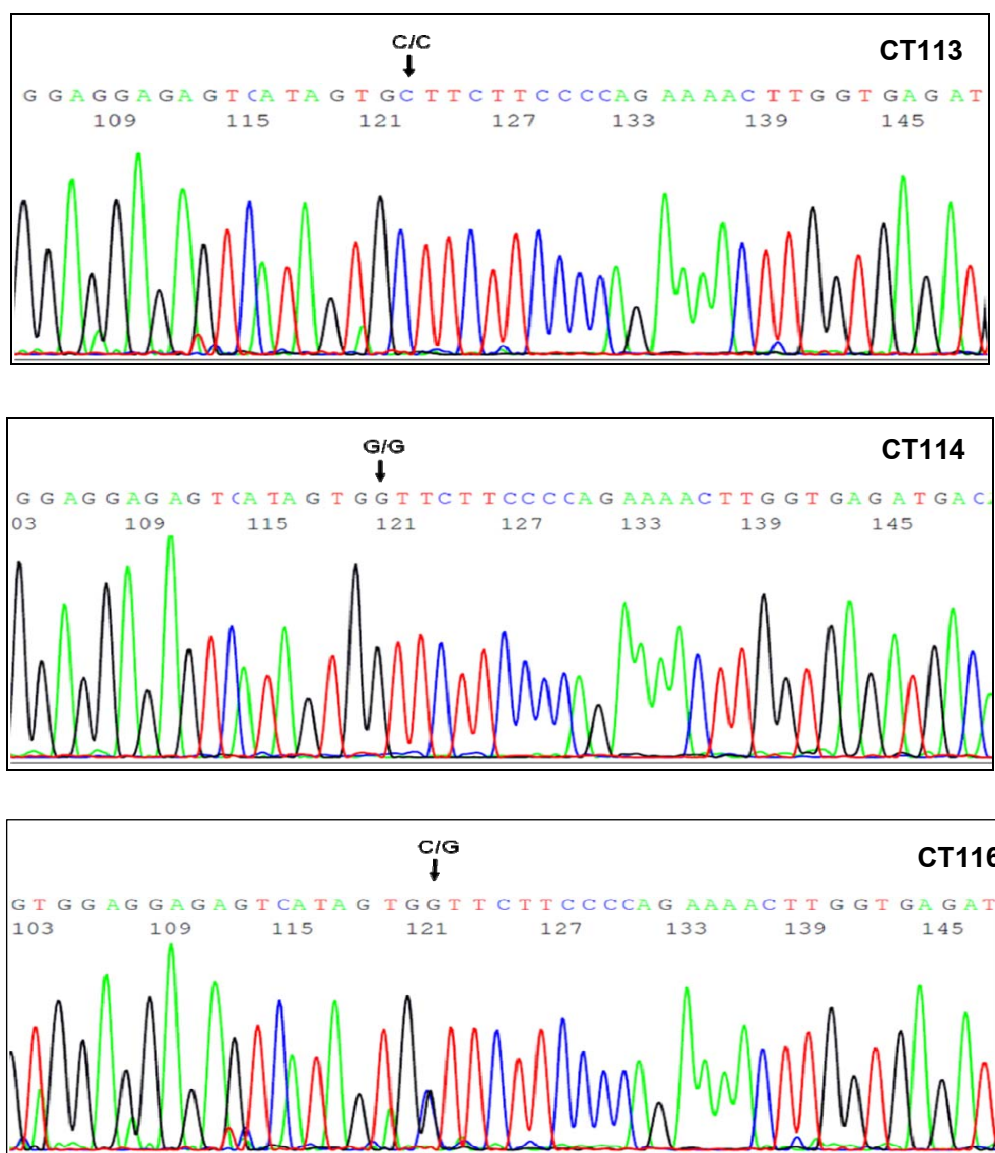
ผลจากการศึกษาการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกของ สนิปส์บนยีน *MET* พบว่า สนิปส์ rs38859 บริเวณอินทรอน 3 และ rs2023748 บริเวณเอกซอน 21 มีการถ่ายทอดแอลลีล T และแอลลีล A จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าอีกแอลลีลหนึ่งด้วยค่า *P* value ใกล้ 0.05 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 61 เมื่อพิจารณา สนิปส์แฮพลไทป์ที่มีการ ถ่ายทอดไปด้วยกันหลายๆ แบบดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 66 พบว่าแฮพลไทป์ของ สนิปส์ rs38859 และ rs2023748 แบบ **TA** (ความถี่ร้อยละ 42.4) มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ ลูกในอัตรา 94.6 : 62.0 ด้วยค่าทางสถิติที่ดีที่สุด ($P = 0.0086$)

การยืนยันผลการศึกษาจีนไทป์ของ สนิปส์แต่ละตำแหน่งบนยีน *RELN* และยีน *MET*

การศึกษาจีนไทป์ของ สนิปส์แต่ละตำแหน่งที่ใช้วิธีแอลลีลลิแกอาร์มพีซีอาร์ เพื่อ ยืนยันความถูกต้องในการอ่านผลจีนไทป์จำทำการทดสอบซ้ำด้วยวิธีการทดสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยเลือกตัวอย่างกลุ่มผู้ป่วยหรือกลุ่มควบคุมที่มีผลจีนไทป์ที่เป็น เฮเทอโรไซกัส และโฮโมไซกัสทั้งสองแบบมาทำการศึกษซ้ำ พบผลการศึกษาจีนไทป์จาก เจลอะครีลาไมด์ตรงกับผลการอ่านลำดับดีเอ็นเอของ สนิปส์ทุกตำแหน่งที่ศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 45 นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบผลการศึกษาสนิปส์แต่ละตำแหน่งที่หาลำดับดีเอ็นเอกับ ฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบผลถูกต้องตรงตาม Accession No. NT_007933.15 ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของโครโมโซม 7

ตารางที่ 66 แสดงสลิปส์แฮพลotype แบบต่างๆ ที่พบการถ่ายทอดสลิปส์แฮพลotype จากพ่อแม่ มาสู่ลูกสูงในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมดบนยีน *MET*

บล็อก	แฮพลotype	ความถี่	ความถี่ของการถ่ายทอด : ไม่ถ่ายทอด	χ^2	P - Value
4 SNPs : rs38859-rs13223756-rs2299439-rs2023748					
	TAGA	0.408	86.4 : 61.4	4.22	0.0400 ***
	CGTG	0.267	60.4 : 60.3	0	0.9958 NS
	CATG	0.22	51.6 : 59.7	0.586	0.4441 NS
	TAGG	0.024	4.0 : 11.0	3.239	0.0719 NS
	CAGA	0.023	4.0 : 10.0	2.548	0.1105 NS
	TATG	0.01	3.0 : 3.0	0	1.0000 NS
3 SNPs : rs38859-rs13223756-rs2023748					
	TAA	0.416	90.3 : 61.4	5.518	0.0188***
	CGG	0.274	60.9 : 63.7	0.062	0.803 NS
	CAG	0.222	50.9 : 61.3	0.968	0.3251 NS
	TAG	0.03	7.1 : 13.5	2.011	0.1561 NS
	CAA	0.028	4.7 : 12.8	3.731	0.0534 NS
	TGG	0.011	2.2 : 4.5	0.838	0.36 NS
3 SNPs : rs38859-rs2299439-rs2023748					
	CTG	0.487	72.0 : 80.0	0.423	0.5155 NS
	TGA	0.417	91.0 : 62.0	5.491	0.0191***
	CGA	0.027	4.0 : 11.0	3.261	0.0709 NS
	TGG	0.025	4.0 : 11.0	3.253	0.0713 NS
	TTG	0.019	5.0 : 7.0	0.332	0.5647 NS
	CTA	0.014	3.0 : 7.0	1.588	0.2076 NS
2 SNPs : rs38859-rs2023748					
	CG	0.496	71.9 : 85.0	1.088	0.2969 NS
	TA	0.424	94.9 : 62.0	6.911	0.0086***
	TG	0.041	9.1 : 18.0	2.948	0.086 NS
	CA	0.038	7.1 : 18.0	4.769	0.029 NS



รูปที่ 45 อิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริเวณสปีส์ตำแหน่ง rs362691 บริเวณเอกซอน 22 ของยีน *RELN* ตัวอย่าง CT113 เป็นตัวอย่างกลุ่มควบคุมที่มีแอลลีลเป็นโฮโมไซกัสแบบ C/C ตัวอย่าง CT114 เป็นตัวอย่างกลุ่มควบคุมที่มีแอลลีลเป็นโฮโมไซกัสแบบ G/G และ ตัวอย่าง CT116 เป็นตัวอย่างกลุ่มควบคุมที่มีแอลลีลเป็นเฮเทอโรไซกัสแบบ C/G (ผลการหาลำดับดีเอ็นเอจากเส้น reverse 5'-3')

บทที่ 4 บทวิจารณ์

การเลือกเครื่องหมายทางพันธุกรรม

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษายีน 2 ยีนบนโครโมโซม 7 แขนข้างยาวที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม (candidate genes) ได้แก่ยีน *RELN* ตำแหน่ง 7q22 และยีน *MET* ตำแหน่ง 7q31.2

การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมบนยีน *RELN* และยีน *MET*

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึม ได้เลือกศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ตามการศึกษาของ Persico และคณะ (2001) ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีจำนวนซ้ำ GGC > 10 ซ้ำสูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC > 10 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าจำนวนซ้ำ GGC < 10 ซ้ำ นอกจากนี้การศึกษาพบว่าจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน *RELN* ลดลง (Persico et al., 2006) การศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาสไนป์ส์อีก 7 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วทั้งยีน คือ rs2299388 บริเวณอินทรอน 2 rs607755 บริเวณอินทรอน 5 (splicing junction) rs2072403 บริเวณเอกซอน 15 rs362691 บริเวณเอกซอน 22 rs2159676 บริเวณอินทรอน 28 rs362746 บริเวณเอกซอน 45 และ rs736707 บริเวณอินทรอน 59 โดยสไนป์ส์ที่เลือกมาศึกษาเป็นสไนป์ส์ที่เคยมีการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *MET* กับภาวะออทิซึม เลือกศึกษาสไนป์ส์ 7 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วยีน ตั้งแต่โปรโมเตอร์จนถึงเอกซอนสุดท้ายของยีน ได้แก่ rs1858830 บริเวณโปรโมเตอร์ rs38845 บริเวณอินทรอน 1 rs10243024 บริเวณอินทรอน 2 rs38859 บริเวณอินทรอน 3 rs13223756 บริเวณเอกซอน 7 rs2299439 บริเวณอินทรอน 15 และ rs2023748 บริเวณเอกซอน 21

วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ (Association study)

การศึกษาคือความสัมพันธ์มีประโยชน์ในการศึกษาโรคที่มีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น โรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการทำงานของยีนหลายยีน หรือโรคที่เกิดจากพันธุกรรมร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาคือความสัมพันธ์จึงเป็นการพิจารณาถึงความสำคัญของการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเครื่องหมายพันธุกรรม เช่น แอลลีล จีโนไทป์ หรือแฮปโลไทป์ ที่มีความสัมพันธ์กับโรคมกกว่าโอกาสการเกิดในกรณีที่ไม่มีความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าว

การศึกษานี้เลือกการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนกับการเกิดภาวะอหิวาต์ 2 แบบ คือ Population based case control และ Family based association ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีประโยชน์ในการศึกษาโรคหรือภาวะที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย

การศึกษารูปแบบ Population based case control เป็นการศึกษาคือความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับโรค โดยการเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีล หรือความถี่จีโนไทป์ ในประชากรที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรปกติ ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ การเลือกกลุ่มคนปกติที่ใช้ในการเปรียบเทียบควรมีความสอดคล้องหรือคล้ายคลึงกันกับกลุ่มประชากรที่เป็นโรค เพื่อป้องกันผลบวกปลอมที่อาจเกิดจากการเลือกกลุ่มประชากรที่ผิด เช่น เพศ ภูมิภาค เชื้อชาติ เป็นต้น ส่วนอายุขึ้นอยู่กับโรคที่ศึกษาเพราะโรคบางโรคมีปัจจัยเรื่องอายุเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย แต่การศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะอหิวาต์สเปคตรัม อายุของกลุ่มประชากรปกติที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมไม่มีผลต่อการทดสอบ เนื่องจากในทางทฤษฎีอายุมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอเล็กน้อย หากผลจากการเปรียบเทียบพบความถี่ของแอลลีลหรือความถี่จีโนไทป์มีความแตกต่างกันระหว่าง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อาจบ่งชี้ว่าตำแหน่งดังกล่าวของเครื่องหมายพันธุกรรมที่เลือกมาศึกษานี้อาจมีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดโรคได้

การศึกษารูปแบบการถ่ายทอดเครื่องหมายพันธุกรรมในครอบครัว Family based association ด้วยวิธี Transmission Disequilibrium Test (TDT) เป็นวิธีการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดรวมไปกับยีนที่อาจก่อให้เกิดโรคจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นโรค โดยคาดว่าหากพบเครื่องหมายพันธุกรรมใดที่มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากอย่างมีนัยสำคัญ อาจกล่าวได้ว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่ลูกได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อแม่เป็นส่วนที่ส่งเสริมหรือทำให้ลูกเกิดความผิดปกติขึ้นได้ และนอกจากนี้วิธีดังกล่าวใช้กลุ่มควบคุมที่เป็นพ่อแม่จึงช่วยลดปัญหาการพบผลบวกปลอมได้ รวมทั้งผลการศึกษานี้สามารถบอกได้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนยีนที่เลือกศึกษานั้นมีความสัมพันธ์และถ่ายทอดไปกับยีนที่ก่อโรคได้

การศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

การศึกษานี้ทดสอบจำนวนซ้ำ GGC ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมในคนไทยปกติ จากภาคกลางและภาคใต้ รวมทั้งสิ้น 272 คน พบการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC ทั้ง 2 ภูมิภาคไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) จึงได้รวบรวมข้อมูลทั้ง 2 กลุ่มเข้าด้วยกัน ผลการศึกษา พบจำนวนซ้ำ GGC ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมตั้งแต่ 6-16 ซ้ำ และในกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ 5-15 ซ้ำ การศึกษาก่อนหน้านี้ในคนยุโรปและคนอเมริกัน พบการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC ตั้งแต่ 3-23 ซ้ำ โดยแต่ละรายงานพบการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC แตกต่างกัน ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 67 (Bonora et al., 2003; Devlin et al., 2004; Kelemenova et al., 2010; Krebs et al., 2002; Li et al., 2004; Persico et al., 2001; Zhang et al., 2002) โดยจำนวนซ้ำ GGC ที่พบมากที่สุดในคนยุโรป คือ 10 และ 8 ซ้ำตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่พบจำนวนซ้ำ GGC 10 ซ้ำมากที่สุดทั้งในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุม โดยพบในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมร้อยละ 75.27 และกลุ่มควบคุมร้อยละ 75.92 จำนวนซ้ำ GGC ที่พบรองลงมาคือ 8 และ 13 ซ้ำตามลำดับ โดยจำนวนซ้ำ GGC 8 และ 13 ซ้ำ มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบการศึกษานี้ในคนไทยกับการศึกษาในคนยุโรป คือ พบจำนวนซ้ำ GGC 8 ซ้ำในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมคนไทยร้อยละ 9.04 และในกลุ่มควบคุมคนไทยพบร้อยละ 8.82 ส่วนในคนยุโรปพบจำนวนซ้ำ GGC 8 ซ้ำสูงถึงร้อยละ 40 ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 67 นอกจากนี้การศึกษานี้พบจำนวนซ้ำ GGC 13 ซ้ำต่างจากการศึกษาในคนยุโรป โดยพบจำนวนซ้ำ GGC 13 ซ้ำสูงถึงร้อยละ 8.24 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และร้อยละ 7.90 ในกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาในคนอินเดียที่พบจำนวนซ้ำ GGC 13 ซ้ำสูงถึงร้อยละ 14 ต่างจากการศึกษาในคนยุโรปที่พบจำนวนซ้ำ GGC 13 ซ้ำเพียงร้อยละ 2.4-5.2 จากการเปรียบเทียบการศึกษาก่อนหน้านี้กับการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า การกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC ในแต่ละชนชาติมีความแตกต่างกัน โดยการศึกษานี้พบจำนวนซ้ำ GGC ใกล้เคียงกับการศึกษาในคนอินเดียมากกว่าการศึกษาในคนยุโรปและคนอเมริกัน ทั้งนี้ผลการศึกษาที่แตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากพื้นฐานทางพันธุกรรมของแต่ละเชื้อชาติที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้มีการศึกษาจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยโรคจิตเภท (schizophrenia) จากการศึกษาในคนจีนพบการกระจายตัวของจำนวนซ้ำ GGC ในผู้ป่วยจิตเภทตั้งแต่ 5-20 ซ้ำ โดยพบจำนวนซ้ำ GGC 8 และ 10 ซ้ำมากที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษานี้และการศึกษาอื่นๆ ในผู้ป่วยออทิซึม และยังพบจำนวนซ้ำ GGC 13 ซ้ำสูงเช่นเดียวกับการศึกษานี้ด้วย (Huang and Chen, 2006)

การศึกษานี้พบจำนวนซ้ำ GGC ในคนยุโรป (Persico et al., 2001; Krebs et al., 2002; Zhang et al., 2002) พบจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC แบบ 8/10 และ 10/10 ซ้ำสูงทั้งในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมและกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่พบจีโนไทป์

แบบ 10/10, 8/10 ซ้ำสูงทั้งในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมและกลุ่มควบคุม แต่ต่างกันที่ การศึกษานี้พบจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC แบบ 10/10 สูงกว่าจีโนไทป์แบบ 8/10 โดยพบ จีโนไทป์แบบ 10/10 สูงถึงร้อยละ 55.3 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมและร้อยละ 59.9 ในกลุ่ม ควบคุม ส่วนจีโนไทป์แบบ 8/10 ซ้ำพบร้อยละ 13.8 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมและร้อยละ 12.9 ในกลุ่มควบคุม ส่วนการศึกษาที่พบจีโนไทป์แบบ 10/13 สูงในคนไทย โดยพบจีโนไทป์ แบบ 10/13 ซ้ำร้อยละ 14.4 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมและร้อยละ 13.6 ในกลุ่มควบคุม ต่างจากการศึกษาในคนยุโรปที่พบจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC แบบ 10/13 ซ้ำน้อยกว่าคือพบ เพียงร้อยละ 3-3.7 (Persico et al., 2001; Kerbs et al., 2002) ซึ่งจีโนไทป์ที่พบบ่อยทั้ง 3 แบบ นี้ ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมและกลุ่มควบคุมคนไทย ส่วน จีโนไทป์ที่พบแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมและกลุ่มควบคุมคือ 10/14, 10/15 และ 10/16 ซ้ำ โดยจีโนไทป์แบบ 10/14 และ 10/16 พบเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม อย่างละ 1 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม จีโนไทป์แบบ 10/15 พบในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม สเปคตรัม 13 รายคิดเป็นร้อยละ 6.91 และในกลุ่มควบคุม 4 รายคิดเป็นร้อยละ 1.47 โดยพบ จีโนไทป์ดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมสูงกว่ากลุ่มควบคุม 4.7 เท่า

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* กับผู้ป่วยออทิซึมในรูปแบบ Population based case control มีการศึกษาน้อย การศึกษาของ Persico และคณะ (2001) พบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำ ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมชาวอิตาลีสูง กว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kelemenova และคณะ (2010) ที่ พบจำนวนซ้ำ 12 และ 13 ซ้ำ ในกลุ่มผู้ป่วยชาวสโลวาเกียสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่พบความถี่แอลลีลของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม สเปคตรัมชาวไทยสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำสูงถึงร้อยละ 5.06 ใน กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมแต่พบในกลุ่มควบคุมเพียงร้อยละ 1.84 เมื่อวิเคราะห์แบบจีโนไทป์ ที่มีจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ อย่างน้อยหนึ่งแอลลีล พบความถี่ของจีโนไทป์ดังกล่าวในผู้ป่วย ออทิซึมสเปคตรัมสูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน โดยพบในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมร้อยละ 9.56 ส่วนในกลุ่มควบคุมพบเพียงร้อยละ 2.95 ซึ่งพบในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมสูงกว่ากลุ่ม ควบคุม 3.2 เท่า

ตารางที่ 67 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ความถี่จำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ในผู้ป่วยอหิวาต์ในภูมิภาคต่างๆ กับการศึกษาอื่น

จำนวนซ้ำ GGC	คอเคเซียน [Persico et al., 2001]		คอเคเซียน [Zhang et al., 2002]		คอเคเซียน [Krebs et al., 2002]		คอเคเซียน [Devlin et al., 2004]	อเมริกัน [Li et al., 2004]		อินเดีย [Dutta et al., 2007]		ไทย การศึกษาครั้งนี้		
	ผู้ป่วย (95 ราย)	กลุ่มควบคุม (186 ราย)	ผู้ป่วย (126 ราย)	กลุ่มควบคุม (437 ราย)	ผู้ป่วย (218 ราย)	พ่อแม่ (436 ราย)	ผู้ป่วย (395 ราย)	ผู้ป่วย (107 ราย)	กลุ่มควบคุม (214 ราย)	ผู้ป่วย (73 ราย)	กลุ่มควบคุม (80 ราย)	ผู้ป่วย (188 ราย)	พ่อแม่ (320 ราย)	กลุ่มควบคุม (272 ราย)
3	-	-	-	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1.05	-	0.4	-	0.5	0.34	0.06	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	0.2	0.11	-	-	-	-	-	0.00	-	0.18
6	-	-	-	0.14	-	-	-	0.2	0.2	-	-	0.27	0.63	0.37
7	-	-	0.4	0.14	0.2	0.11	-	0.4	0.2	-	-	0.53	0.31	2.21
8	44.21	44.3	33.7	39.92	39.2	40.71	42.85	39.0	41.8	11.0	11.25	9.04	7.50	8.82
9	-	-	0.8	0.43	-	-	0.32	0.2	0.2	-	-	0.27	0.16	1.47
10	45.26	51.1	55.6	52.30	54.4	53.56	50.56	54.3	51.7	75.0	72.50	75.27	77.66	75.92
11	-	1.1	1.6	1.01	0.9	0.57	0.52	0.9	0.6	-	-	0.53	0.31	0.55
12	5.80	0.8	2.0	1.73	0.5	0.69	1.38	2.1	1.1	-	1.68	0.80	0.94	0.74
13	3.16	2.4	5.1	3.75	3.7	3.33	3.67	2.5	3.2	14.0	12.50	8.24	7.34	7.90
14	-	0.3	-	0.14	0.2	0.34	0.38	-	0.2	-	0.63	0.27	0.31	0.00
15	-	-	-	0.30	-	-	0.26	0.2	0.6	-	0.63	4.52	4.53	1.84
16	-	-	0.4	-	0.2	0.23	-	0.2	0.2	-	0.63	0.27	0.16	0.00
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	-
23	0.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 68 เปรียบเทียบผลการศึกษารายงานจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออกซิซึมระหว่างการศึกษานี้กับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้า

เปรียบเทียบการศึกษารายงานจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออกซิซึมในแต่ละการศึกษาแบบ Case-Control		
การศึกษานี้	การศึกษาที่สนับสนุน	การศึกษาที่คัดค้าน
<p>พบ ความแตกต่างของความถี่แอลลีลของ GGC ≥ 14 ซ้ำสูงในผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุม</p> <p>พบ ความแตกต่างของจีโนไทป์ที่มีจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำอย่างน้อย 1 แอลลีลในกลุ่มผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุม</p>	<p>Persico et al., 2001</p> <p>พบ ความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำสูงเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม</p>	<p>Zhang et al., 2002</p> <p>ไม่พบ ความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม</p>
	<p>Kelemenova et al., 2010</p> <p>พบ ความแตกต่างของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำในผู้ป่วยสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ</p>	
เปรียบเทียบการศึกษารายงานจำนวนซ้ำ GGC กับภาวะออกซิซึมในแต่ละการศึกษาแบบ TDT		
การศึกษานี้	การศึกษาที่สนับสนุน	การศึกษาที่คัดค้าน
<p>ไม่พบ ความแตกต่างของการถ้อยทอดแอลลีล GGC ≥ 11 หรือ ≥ 14 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออกซิซึมสูง</p>	<p>Persico et al., 2001</p> <p>พบ จำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญ</p>	<p>Krebs et al., 2002</p> <p>ไม่พบ ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำของ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกสูงกว่า GGC < 11 ซ้ำ</p>
	<p>Zhang et al., 2002</p> <p>พบ จำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญ</p>	<p>Bonora et al., 2003</p> <p>ไม่พบ จำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญ</p>
	<p>Skaar et al., 2005</p> <p>พบ จำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญ</p>	<p>Devlin et al., 2004</p> <p>ไม่พบ ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดมาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญกับภาวะพัฒนาการด้านการพูดล่าช้า</p>
	<p>Dutta et al., 2007</p> <p>พบ จำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญ</p>	

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* กับผู้ป่วยอหิวาต์ซีมีในรูปแบบ Family based association มีการศึกษาไม่มากนัก การศึกษาของ Persico และคณะ (2001) พบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 11 ซ้ำมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญในครอบครัวผู้ป่วยชาวอิตาลี เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhang และคณะ (2002) และการศึกษาของ Skaar และคณะ (2005) ในครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรป ต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ พบน้อยส่งผลให้ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงเช่นกันในคนยุโรป (Bonora et al., 2003; Devlin et al., 2004; Krebs et al., 2002)

การศึกษาของ Dutta และคณะ (2007) ในคนอินเดียที่พบจำนวนซ้ำ GGC มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC จากแม่อย่างมีนัยสำคัญ ต่างจากการศึกษานี้ที่พบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำ ได้รับการถ่ายทอดจากพ่อและแม่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยได้รับการถ่ายทอดจากพ่อ 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.8 ได้รับการถ่ายทอดจากแม่ 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 56.2 มี 1 รายที่ได้รับการถ่ายทอดจากทั้งพ่อและแม่ และมี 1 รายไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจากทั้งพ่อและแม่ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 69

การศึกษาสนิปส์แฮพลไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC กับสนิปส์ตำแหน่งอื่นๆบนยีน *RELN* โดย Skaar และคณะ (2005) ในคนยุโรป พบแฮพลไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 10 ซ้ำ กับสนิปส์บริเวณเอกซอน 44 เอกซอน 45 เอกซอน 50 และอินทรอน 59 แบบ (GGC ≥ 10 ซ้ำ A-A-T-T) มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแฮพลไทป์แบบอื่น ($P = 0.002$) โดยแฮพลไทป์ดังกล่าวเป็นแฮพลไทป์ที่พบได้บ่อยซึ่งพบความถี่ของแฮพลไทป์นี้ร้อยละ 33 ต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบสนิปส์แฮพลไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำกับสนิปส์อื่นๆ (GGC, rs2299388, rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs263746, rs736707) แบบใดมีการถ่ายทอดไปด้วยกันสูงทั้งการศึกษาแบบ Population based case control และการศึกษาแบบ Family based association ซึ่งอาจเนื่องมาจากสนิปส์แต่ละตำแหน่งที่เลือกมาศึกษามีระยะห่างกันมากในแต่ละสนิปส์ และจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำพบได้น้อยในผู้ป่วยอหิวาต์ซีมีสเปคตรัม อาจทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ของการศึกษาแฮพลไทป์ของจำนวนซ้ำ GGC กับสนิปส์อื่นๆ บนยีน *RELN*

ตารางที่ 69 แสดงการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำขึ้นไปจากพ่อแม่มาสู่ผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม จำนวน 18 ราย

ผู้ป่วยออทิสซึม สเปกตรัม	เพศ	ข้อวินิจฉัย	จีโนไทป์			ได้รับการถ่ายทอดจาก
			ผู้ป่วย	พ่อ	แม่	
PS30-3	ชาย	PDD-NOS	10 15	10 15	10 10	พ่อ
PS41-3	ชาย	Autism	10 15	10 15	10 10	พ่อ
PS46-3	ชาย	PDD-NOS	10 15	10 13	10 15	แม่
AR1-3	หญิง	Autism	10 15	10 15	10 13	พ่อ
AR12-3	ชาย	Autism	10 14	10 10	10 14	แม่
AR17-3	ชาย	PDD-NOS	10 15	10 10	10 15	แม่
AR42-3	ชาย	PDD-NOS	13 15	13 13	10 15	แม่
AR44-3	ชาย	Autism	10 16	-	-	ไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอพ่อและแม่
AR60-3	ชาย	PDD-NOS	10 15	10 15	10 10	พ่อ
AR62-3	ชาย	Autism	10 15	10 10	13 15	แม่
AR65-3	ชาย	PDD-NOS	15 15	10 15	10 15	พ่อและแม่
AR71-3	ชาย	Autism	10 15	10 13	10 15	แม่
AR93-3	ชาย	Autism	10 15	10 10	10 15	แม่
TM2-3	ชาย	Autism	6 15	6 10	10 15	แม่
TM11-3	ชาย	Autism	10 15	15 15	10 10	พ่อ
TM17-3	ชาย	Autism	10 15	10 15	10 10	พ่อ
TM43.3	ชาย	Autism	10 15	-	10 10	พ่อ*
TM52-3	หญิง	Autism	10 15	10 10	10 15	แม่

หมายเหตุ * ประเมินจากการถ่ายทอดในครอบครัว

จำนวนซ้ำ GGC กับการแสดงออกของโปรตีน RELN ในผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ซึ่งเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน RELN ทำให้ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวมีเบส CG สูง (CG rich) ส่งผลต่อการควบคุมการถอดรหัสดีเอ็นเอ (Transcriptional regulation) จากการศึกษาของ Persico และคณะ (2006) เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน RELN พบว่าเมื่อมีจำนวนซ้ำ GGC เพิ่มขึ้นการแสดงออกของยีน RELN จะลดลง เมื่อเทียบจำนวนซ้ำ GGC 12 และ 13 ซ้ำที่พบสูงในผู้ป่วยออทิซึมกับจำนวนซ้ำ GGC 8 และ 10 ซ้ำที่พบได้บ่อยในกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อมีจำนวนซ้ำ GGC 12 และ 13 ซ้ำการแสดงออกของยีนลดลงร้อยละ 50-60 (Persico et al., 2006) โดยการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำดังกล่าวส่งผลให้โครงสร้างทุติยภูมิของเอ็มอาร์เอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป เอ็มอาร์เอ็นเอขดตัวเพิ่มขึ้นทำให้การเข้ามาจับของไรโบโซมทำได้ยากขึ้นในกระบวนการแปลรหัสเป็นโปรตีน ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน RELN ลดลง นอกจากนี้ยังพบระดับโปรตีน RELN ในพลาสมาลดลงประมาณร้อยละ 25 เมื่อมีจำนวนซ้ำ GGC มากขึ้น

การมีจำนวนซ้ำ GGC สูงขึ้นส่งผลให้เกิดเมธิลเลชัน (methylation) สูงขึ้น ผลการศึกษาเมธิลเลชันของยีน RELN พบการเกิดเมธิลเลชันบริเวณ 5'UTR ทำให้การแสดงออกของยีน RELN ลดลง (Chen et al., 2002; Tamura et al., 2007) เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีตำแหน่งจับของโปรตีน SP1 ซึ่งเป็น transcription factor เมื่อโปรตีน SP1 จับกับตำแหน่งจำเพาะ (GC box : enhancer-like activity อยู่ถัดจากตำแหน่ง ATG ของยีน RELN ไปทาง upstream -304 ถึง -137 คู่เบส) ส่งผลให้เกิดการป้องกันการเกิดเมธิลเลชัน ของบริเวณดังกล่าวได้ หากจำนวนซ้ำ GGC เพิ่มสูงขึ้นจะไปรบกวนการจับของโปรตีนดังกล่าว ทำให้เกิดเมธิลเลชันสูงได้ นอกจากนี้การศึกษาในผู้ป่วยโรคจิตเภทพบระดับโปรตีน RELN ลดลงเช่นเดียวกัน โรคจิตเภทเป็นโรคที่เกิดจากการทำงานของโปรตีนต่างๆ ในสมองผิดปกติคล้ายคลึงกับกลุ่มอาการออทิซึม (Abdolmaleky et al., 2005; Grayson et al., 2005)

หน้าที่ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน RELN ยังไม่ทราบแน่ชัด โดยหน้าที่หนึ่งที่เป็นไปได้ของจำนวนซ้ำ GGC คือเป็นตำแหน่งจับของโปรตีนควบคุม อย่างเช่น CAGER-1 และ CAGER-2 ซึ่งจะจับกับลำดับดีเอ็นเอที่มีลำดับเป็น GAC และ GGC ตามลำดับ (Yano et al., 1999) โดยจำนวนซ้ำที่เพิ่มมากขึ้นทำให้การเข้าจับของโปรตีนดังกล่าวเกิดได้ยากขึ้นส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีนลดลงร้อยละ 50 (Grayson et al., 2005)

แม้การศึกษาของ Persico และคณะ (2006) จะพบจำนวนซ้ำ GGC 12-13 ซ้ำ ส่งผลให้ luciferase reporter gene แสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับจำนวนซ้ำ GGC น้อย แต่การศึกษานี้พบจำนวนซ้ำที่ต่างออกไป คือพบจำนวนซ้ำ GGC ≥ 14 ซ้ำสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมในเด็กไทย จึงควรมีการศึกษาการแสดงออกของจำนวนซ้ำ GGC เพิ่มเติมในจำนวนซ้ำ

GGC ที่พบต่างจากการศึกษาของ Persico และคณะ (2006) ในคนไทยเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *RELN* ว่ามีการแสดงออกที่เหมือนหรือต่างกันอย่างไร

จำนวนซ้ำ GGC กับความเสถียรในโครงสร้าง hairpin ของ mRNA

การเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ GGC ส่งผลต่อความเสถียรของโครงสร้าง hairpin ของ mRNA โดยจำนวนซ้ำ GGC พบบริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* ก่อนตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัสเป็นโปรตีนบริเวณเอกซอน 1 GGCGCGC(GGC)_nATG โดยจำนวนซ้ำดังกล่าวไม่มีการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนโกลซีน เนื่องจากอยู่ในบริเวณ 5'UTR แต่จะส่งผลต่อโครงสร้างของ mRNA โดยการเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ GGC จะส่งผลให้ค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ลดลง ทำให้โครงสร้าง hairpin ของ mRNA มีความเสถียรมากขึ้น จนส่งผลกระทบต่อกระบวนการแปลรหัสโปรตีน ทำให้ไรโบโซมเข้ามาจับได้ยากมากขึ้นกว่าจำนวนซ้ำ GGC น้อยๆ (Persico et al., 2006) คล้ายกับรายงานจำนวนซ้ำ GGC ของยีน *AR* น้อยทำให้การทำงานของ Androgen สูงขึ้น (Ding et al., 2005)

การศึกษานี้ตรวจสอบค่าพลังงานอิสระของการเกิด hairpin ของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบที่พบในการศึกษาครั้งนี้ (5-16 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม RNA structure, V.5.1, Mathews Lab (<http://rna.urmc.rochester.edu/research.html>) พบว่าค่าพลังงานอิสระลดลงเมื่อจำนวนซ้ำ GGC เพิ่มขึ้น (Mathews et al., 1999) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 70 และรูปที่ 46 โดยลำดับเบสที่ใช้ในการศึกษาค่าพลังงานอิสระดังนี้

GAGCGAGCGCGCGTAGGGCGCGC(GGC)_nATGGAGCGCAGTGGCTGGCCCCGGCAG

โดย n แสดงจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงความเสถียรในโครงสร้าง mRNA จะกระทบต่อการผลิตโปรตีน *RELN* เช่นเดียวกับยีน *AR* หรือไม่ ยังไม่สามารถสรุปได้จากการทำนายนี้นี้ แต่ผลการศึกษาด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ ให้แนวคิดว่าความหลากหลายของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของกระบวนการแปลรหัสโปรตีนที่ส่งผลให้ปริมาณการผลิตโปรตีนต่อหน่วยเปลี่ยนไปจากสัดส่วนเดิม

ตารางที่ 70 แสดงค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN*

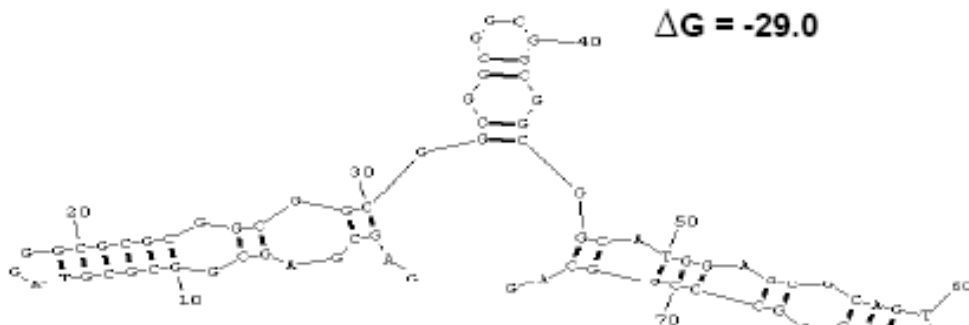
จำนวนซ้ำ GGC	ค่าพลังงานอิสระ (ΔG) (kcal/mol)
5	-29.0
6	-31.3
7	-33.8
8	-36.1
9	-38.6
10	-40.9
11	-43.4
12	-45.7
13	-48.2
14	-50.5
15	-53.0
16	-55.3

จากการคำนวณค่าพลังงานอิสระของจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มสูงขึ้นพบค่าพลังงานอิสระลดลงซึ่งสัมพันธ์แบบผกผันกับจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มขึ้น ทำให้การขดตัวของโครงสร้างทุติยภูมิของจำนวนซ้ำ GGC บริเวณ 5'UTR ของยีน *RELN* มีการขดตัวที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งในการศึกษานี้พบจำนวนซ้ำ GGC สูงสุด 16 ซ้ำ อาจทำให้โครงสร้าง mRNA เสถียรมากกว่าจำนวนซ้ำที่พบโดยทั่วไปทั้งในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุม (GGC 10 ซ้ำ)



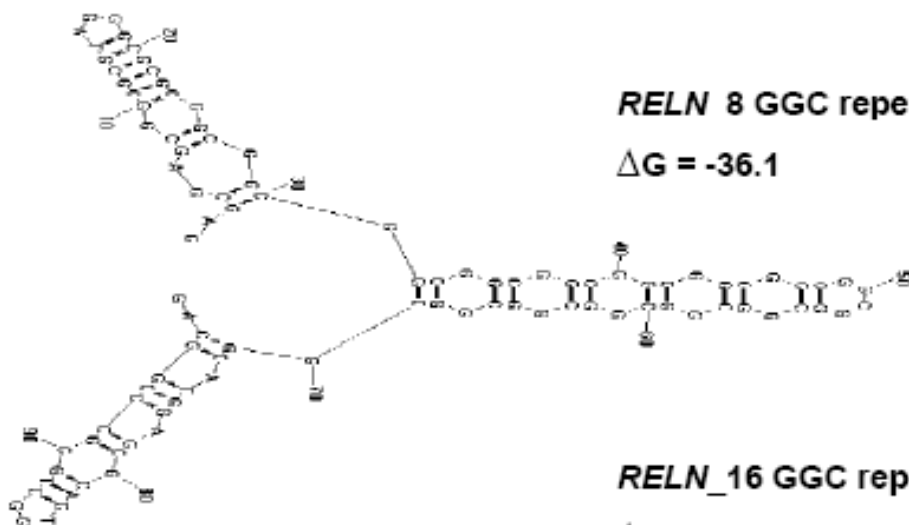
RELN_5 GGC repeats

$$\Delta G = -29.0$$



RELN_8 GGC repeats

$$\Delta G = -36.1$$



RELN_16 GGC repeats

$$\Delta G = -55.3$$

รูปที่ 46 แสดงโครงสร้าง hairpin ของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ (บน) จำนวนซ้ำ GGC 5 ซ้ำ (กลาง) จำนวนซ้ำ GGC 8 ซ้ำ (ล่าง) จำนวนซ้ำ GGC 16 ซ้ำ

การแสดงออกของยีน *RELN* ต่อการทำงานของสมองในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงระดับการทำงานของยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม แต่มีรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการทำงานของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึม พบว่า ปริมาณโปรตีน *RELN* ขนาด 410 กิโลดาลตันลดลงในผู้ป่วยออทิซึมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Fatemi, 2002) ซึ่งส่งผลให้เด็กมีพัฒนาการหลายด้านล่าช้า เช่น การนั่งและการเดินช้ากว่าเด็กที่มีระดับโปรตีน *RELN* เป็นปกติ รวมทั้งส่งผลให้เด็กบางรายมีอาการชักร่วมด้วย (Fatemi et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบระดับโปรตีน *RELN* และ mRNA ที่สร้างจากยีน *RELN* ลดลงในสมองส่วนซีรีเบลลัมและฮิปโปแคมปัสของผู้ป่วยโรคจิตเภท (Schizophrenia) ซึ่งลดลงร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับคนที่ไม่มีปัญหาทางจิตเวช (Impagnatiello et al., 1998)

จากการทราบหน้าที่ของยีน *RELN* ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่และกำหนดตำแหน่งของเซลล์ประสาทให้ถูกต้องเพื่อให้สมองสามารถทำงานได้เป็นปกติ โดยพบว่าการแสดงออกของโปรตีน *RELN* พบได้สูงในเซลล์ Purkinje การศึกษาของ Fatemi และคณะ (2002) พบว่าขนาดของเซลล์ Purkinje บริเวณสมองส่วนซีรีเบลลัมของผู้ป่วยออทิซึมมีขนาดลดลงประมาณร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับเซลล์สมองของคนปกติ (Fatemi et al., 2002) นอกจากนี้การศึกษาของ Yip และคณะ (2000) พบความผิดปกติของยีน *RELN* ส่งผลให้เซลล์ประสาทมีการเคลื่อนที่และขนาดที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติส่งผลให้สมองทำงานผิดปกติ

การศึกษาในหนูทดลองพบว่ายีน *reln* ทำงานร่วมกับยีน disabled 1 (*dab1*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำหนดตำแหน่งของเซลล์ประสาทระหว่างการพัฒนาของสมอง โดยพบว่าโปรตีน *Reln* มีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่โปรตีน *Dab1* ทำให้การควบคุมการกำหนดตำแหน่งของเซลล์ประสาทในสมองอยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้เป็นปกติ (Howell et al., 1999) ดังนั้นความผิดปกติของยีนอื่นๆ ที่อยู่ในวิถีการทำงานของยีน *RELN* เช่น *DAB1* อาจส่งผลให้เกิดภาวะออทิซึมได้ เนื่องจากการเกิดภาวะออทิซึมมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรม (ความผิดปกติของยีนหลายยีน) ร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (multifactorial inheritance)

การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปบนยีน *RELN* กับผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม

การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปบนยีน *RELN* กับผู้ป่วยออทิซึมมีน้อย การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในผู้ป่วยออทิซึมชาวไทย โดยเลือกศึกษาสลิปทั้งหมด 7 ตำแหน่งซึ่งกระจายอยู่ทั่วทั้งยีน โดยเลือกสลิป 3 ตำแหน่งบริเวณเอกซอน ได้แก่ rs2072403 บริเวณเอกซอน 15 rs362691 บริเวณเอกซอน 22 และ rs362746 บริเวณเอกซอน 45 โดยสลิป rs2072403 (C/T) และ rs362746 (A/G) เป็นสลิปที่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (synonymous variant) ส่วนสลิป rs362691 (C/G) เป็นสลิปที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากลิวซีนเป็นวาลีน (L997V) และเลือกสลิป 3 ตำแหน่งบริเวณอินทรอน ได้แก่ rs2299388 บริเวณอินทรอน 2 rs2159676 บริเวณอินทรอน 28 และ rs736707 บริเวณอินทรอน 59 และเลือก 1 สลิปบริเวณ splicing junction บริเวณอินทรอน 5 ได้แก่ rs607755 เนื่องจากยีน *RELN* เป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ (517.7 กิโลเบส) ประกอบด้วย 64 เอกซอน จึงไม่สามารถศึกษาสลิปได้ทุกเอกซอน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้เลือกสลิปทั้ง 7 ตำแหน่งดังกล่าวด้วยหลักการดังนี้ (1) เลือกสลิปที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphic) มีค่าเฮทเทอโรไซโกซิตีไม่ต่ำกว่า 0.3 คือสลิป rs2159676 (2) หรือสลิปที่เป็นเคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ในกลุ่มผู้ป่วยชาวอิตาเลียน กลุ่มผู้ป่วยชาวอเมริกัน กลุ่มผู้ป่วยชาวอินเดีย กลุ่มผู้ป่วยชาวจีน และกลุ่มประชากรญี่ปุ่น (3) หรือสลิปที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสแล้วส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยน คือสลิปตำแหน่ง rs362691 (4) หรือสลิปที่อาจคาดว่าเป็นตำแหน่งที่ส่งผลต่อ splicing junction คือสลิปตำแหน่ง rs607755 บริเวณอินทรอน 5 ผลการศึกษานี้พบความถี่แอลลีลของสลิปแต่ละตำแหน่งที่ศึกษามีค่าความถี่ของแอลลีลที่พบได้น้อย (minor allele frequency) มากกว่า 0.1 (MAF > 0.1) และความถี่แอลลีลของสลิปแต่ละตำแหน่งมีค่าใกล้เคียงกับความถี่แอลลีลในคนจีนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล (NCBI) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 72 ภาคผนวก ก

การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปบนยีน *RELN* ในผู้ป่วยออทิซึมแบบ Population based case control มีไม่มากนัก มีเพียง 1 การศึกษาที่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว คือ การศึกษาของ Li และคณะ (2008) ในผู้ป่วยออทิซึมชาวจีน ที่พบความสัมพันธ์ของสลิป rs736707 เพียงตำแหน่งเดียวจากการศึกษาสลิปทั้งหมด 8 โดยพบความถี่จีโนไทป์แบบ C/C ในผู้ป่วยออทิซึมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทั้งการศึกษาแบบ dominant และ additive ส่วนสลิป rs607755, rs2072403, rs362691 และ rs362746 ที่ศึกษาเหมือนกับการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของสลิปดังกล่าวกับภาวะออทิซึมในคนจีนเช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่ไม่พบสลิปทั้ง 7 ตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมในคนไทย สอดคล้องกับการศึกษาของ Persico และคณะ (2001) ที่ศึกษาสลิป 2 ตำแหน่ง โดยมีสลิป rs607755 เหมือนกับการศึกษานี้ การศึกษาของ Dutta และคณะ (2008) ที่ศึกษา สลิป 6

ตำแหน่งบนยีน *RELN* ในคนอินเดีย โดยมีสปีส์ rs2072403, rs362691 และ rs736707 เหมือนกับการศึกษานี้ และการศึกษาของ He และคณะ (2010) ที่ศึกษาสปีส์ 4 ตำแหน่งบนยีน *RELN* ในคนจีน โดยมีสปีส์ rs362691 และ rs736707 เหมือนกับการศึกษานี้

การศึกษาความสัมพันธ์ของสปีส์บนยีน *RELN* แบบ Family based association ด้วยวิธี TDT มีรายงานพบความสัมพันธ์ดังกล่าวเพียง 1 การศึกษาคือ การศึกษาของ Serajee และคณะ (2006) ที่พบสปีส์ตำแหน่ง rs736707 มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมในครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรป 196 ครอบครัวที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นออทิซึม โดยพบความถี่แอลลีล 0.77/0.23 (T/C) ต่างจากการศึกษานี้และการศึกษาอื่นๆ ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของสปีส์ตำแหน่งอื่นๆ ที่ศึกษาบนยีน *RELN* (Bonora et al., 2003; Dutta et al., 2007; Dutta et al., 2008; He et al., 2010; Persico et al., 2001) โดยการศึกษาที่พบความถี่แอลลีลเป็น 0.58/0.42 (T/C) ซึ่งความถี่แอลลีลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาในคนอินเดียของ Dutta และคณะ (2008) 0.57/0.43 (T/C) และการศึกษาในคนจีนของ Li และคณะ (2008) 0.58/0.42 (T/C) และการศึกษาของ He และคณะ (2010) 0.57/0.43 (T/C) และมีความถี่ใกล้เคียงกับความถี่ของสปีส์ตำแหน่งดังกล่าวที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลสปีส์ของ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งของสปีส์ทั้ง 7 ตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* จากพ่อแม่มาสู่ลูกด้วยวิธี TDT ต่างจากการศึกษาอื่นอาจเนื่องมาจาก (1) กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (คนเอเชียและคนยุโรป) (2) เกณฑ์การวินิจฉัยกลุ่มผู้ป่วยที่แตกต่างกัน โดยการศึกษาของ Serajee และคณะ (2006) พบสปีส์ rs362691 มีการถ่ายทอดแอลลีล G จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแอลลีล C ในกลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นออทิซึมสเปคตรัม (Autism+PDD-NOS) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อศึกษาเฉพาะผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นออทิซึม (Autism only) ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเกิดจากผลบวกปลอมจากการเลือกกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา (3) ลักษณะครอบครัวผู้ป่วย การศึกษานี้ศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยที่มีลูกเป็นออทิซึม 1 ราย (simplex family) เป็นส่วนใหญ่ (151 simplex families+9 multiplex families) และไม่พบความสัมพันธ์จากการศึกษาแบบ TDT ต่างจากการศึกษา Serajee และคณะ (2006) ที่ศึกษาในครอบครัวที่มีลูกเป็นออทิซึมมากกว่า 1 รายรวมด้วย (129 multiplex families+67 simplex families) (4) ขนาดกลุ่มตัวอย่าง (sample size) การศึกษานี้ศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมชาวไทยเพียง 160 ครอบครัว ต่างจากการศึกษาของ Serajee และคณะ (2006) ที่ศึกษาใน 196 ครอบครัว อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาและการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกกลุ่มตัวอย่าง เกณฑ์การวินิจฉัย ลักษณะกลุ่มตัวอย่าง และขนาดกลุ่มตัวอย่างมีผลต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึมในรูปแบบ TDT และข้อจำกัดของการศึกษาแบบ TDT คือจะเลือกเฉพาะพ่อแม่ที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสเท่านั้นมาคำนวณค่าการถ่ายทอด

ส่วนพ่อแม่ที่เป็นโฮโมไซกัสไม่สามารถนำมาคำนวณหาความสัมพันธ์ได้ เพราะไม่สามารถบอกได้ว่าแอลลีลใดถ่ายทอดมาสู่ลูก จึงทำให้จำนวนครอบครัวที่นำมาใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดของแอลลีลในสลิปส์แต่ละตำแหน่งมีจำนวนลดลง

การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์ในรูปแบบแฮพลไทป์มีเพียงการศึกษาของ Skaar และคณะ (2005) ที่พบสลิปส์แฮพลไทป์แบบ A-A-T-T (rs2075043-rs362746-rs2229864-rs736707) มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.002$) ต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์บนยีน *RELN* กับภาวะออทิซึม แต่การศึกษานี้พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ตำแหน่ง rs2072403 และ rs362691 บริเวณเอกซอน 15 ถึงเอกซอน 22 ขนาดประมาณ 41 กิโลเบสสูง ทั้งการศึกษาแบบ population based case control และ Family based association แต่เมื่อพิจารณาสลิปส์แฮพลไทป์ในบล็อกดังกล่าวไม่พบความสัมพันธ์ของสลิปส์แฮพลไทป์แบบใดมีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมในคนไทย สอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะ (2008) ในคนจีน ที่พบสลิปส์ rs2072403 และ rs362691 มีการถ่ายทอดไปด้วยกันสูงแต่ไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์ในบล็อกดังกล่าว ซึ่งสาเหตุที่ทำให้การศึกษานี้ในครอบครัวผู้ป่วยคนไทยต่างจากการศึกษาในคนยุโรปของ Skaar และคณะ (2005) อาจเนื่องมาจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีความแตกต่างกันในเรื่องเชื้อชาติและจำนวนที่ศึกษา โดยการศึกษาของ Skaar และคณะ (2005) ศึกษาในคนยุโรป 371 ครอบครัว ส่วนการศึกษาในคนเอเชียมีจำนวนตัวอย่างน้อยกว่าคือ การศึกษานี้ในคนไทยมี 160 ครอบครัว และการศึกษาของ He และคณะ (2010) ในคนจีน 165 ครอบครัว อาจทำให้ผลการศึกษาแตกต่างกัน และเนื่องมาจากยีน *RELN* เป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ (517.7 กิโลเบส) และระยะห่างของสลิปส์แต่ละตำแหน่งที่เลือกมาศึกษาค่อนข้างห่างกันมาก ทำให้ค่าการถ่ายทอดไปด้วยกัน (LD) ที่ปรากฏต่ำระหว่างสลิปส์แต่ละตำแหน่ง

แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบสลิปส์แฮพลไทป์แบบใดมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่มีภาวะออทิซึมมากกว่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญในคนไทย แต่การศึกษาสลิปส์แฮพลไทป์ยังมีความสำคัญ เนื่องจากการศึกษาสลิปส์หลายๆ ตำแหน่งพร้อมกันทำให้การศึกษาสลิปส์แบบแฮพลไทป์มีความน่าเชื่อถือกว่าการวิเคราะห์สลิปส์เพียงตำแหน่งเดียว นอกจากนี้การศึกษาสลิปส์แฮพลไทป์ในยีนอื่นๆ พบสลิปส์แฮพลไทป์บางแบบส่งผลต่อการแสดงออกของยีน เช่น การศึกษาของ Benayed และคณะ (2009) ในยีน *ENGRAILED 2* (*EN2*) ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซม 7 แขนซ้ายยาว ตำแหน่ง 7q36.2 พบความสัมพันธ์ของสลิปส์ 2 ตำแหน่ง rs1861972 (A/G) and rs1861973 (C/T) มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูงทั้งการศึกษาแบบสลิปส์เดี่ยวและแบบสลิปส์แฮพลไทป์ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 518 ครอบครัว และเมื่อศึกษาการแสดงออกของแฮพลไทป์ แบบ A-C ของสลิปส์ดังกล่าวโดยการสร้างเวคเตอร์ที่มีแฮพลไทป์แบบ A-C แล้วนำเวคเตอร์ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ของมนุษย์และหนูเพื่อดูการแสดงออกของ luciferase reporter gene พบว่า การแสดงออกของยีน

ดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับแฮพลไทป์แบบอื่น (Benayed et al., 2009)

อย่างไรก็ตามการศึกษาสปีส์ไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าสปีส์บนยีน *RELN* เป็นส่วนส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึมขึ้นหรือไม่ เนื่องจากการศึกษานี้เลือกศึกษาสปีส์เพียง 7 ตำแหน่งซึ่งอาจไม่มากพอที่จะพบความสัมพันธ์ของยีน *RELN* กับภาวะออทิซึมได้ เนื่องจากยีน *RELN* มีสปีส์มากกว่า 3,900 ตำแหน่ง นอกจากนี้การศึกษานี้ไม่ครอบคลุมถึงการเกิดการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (microdeletion) การเพิ่มขึ้นของจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นขนาดเล็ก (microduplication) และมิวเทชันในยีน เช่น รายงานพบมิวเทชันในยีน *LAMB1* (I1547T) ยีน *PTPRZ1* (I3S) และยีน *UBE2H* บนโครโมโซม 7 ในผู้ป่วยออทิซึม (Bonora et al., 2005; Vourc'h et al., 2003) ดังนั้นการตรวจกรองมิวเทชันในยีน *RELN* อาจตรวจพบความผิดปกติของยีน *RELN* ได้

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *MET* กับภาวะอหิวาต์ในเด็กไทย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์บนยีน *MET* กับภาวะอหิวาต์สเปคตรัมในคนไทยครั้งแรก โดยเลือกศึกษาสไนป์ 7 ตำแหน่งที่กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งยีน โดยเลือกสไนป์ 1 ตำแหน่งบริเวณโปรโมเตอร์ที่เป็น Functional SNP ได้แก่ rs1858830 เลือกสไนป์ 2 ตำแหน่งบริเวณเอกซอน ได้แก่ rs13223756 บริเวณเอกซอน 7 และ rs 2023748 บริเวณเอกซอน 21 เลือกสไนป์ 4 ตำแหน่งบริเวณอินทรอน ได้แก่ rs38845 บริเวณอินทรอน 1, rs10243024 บริเวณอินทรอน 2, rs38859 บริเวณอินทรอน 3 และ rs2299439 บริเวณอินทรอน 15 ผลการตรวจสอบสมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) พบสไนป์ทั้ง 7 ตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *MET* เข้าสู่สมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์กทุกตำแหน่ง ($P > 0.05$)

ก่อนหน้านี้มีรายงานพบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *MET* กับภาวะอหิวาต์ โดยการศึกษาดังกล่าวพบความสัมพันธ์ของสไนป์ rs1858830 บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *MET* กับภาวะอหิวาต์ในผู้ป่วยชาวอิตาลีและอเมริกัน (Campbell et al., 2006; Jackson et al., 2009) โดยพบแอลลีล C และจีโนไทป์แบบ C/C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างผู้ป่วยอหิวาต์กับกลุ่มควบคุม ในการศึกษาแบบ Population based case control ซึ่งต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของสไนป์ทั้ง 7 ตำแหน่งที่เลือกศึกษา โดยการศึกษาที่พบความถี่แอลลีลของสไนป์ที่ศึกษาในคนไทยมีค่าใกล้เคียงกับความถี่แอลลีลในคนจีนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 72 ภาคผนวกต่างจากรายงานก่อนหน้า โดยการศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) และการศึกษาของ Sousa และคณะ (2008) ในผู้ป่วยอหิวาต์ชาวอิตาลีพบแอลลีล C เป็นแอลลีลที่พบได้บ่อย การศึกษานี้ให้ผลการศึกษาที่สนับสนุนการศึกษาของ Thanseem และคณะ (2010) และการศึกษาของ Jackson และคณะ (2009) ในคนอเมริกัน ที่พบแอลลีล G เป็นแอลลีลที่พบได้บ่อยส่วนแอลลีล C เป็นแอลลีลที่พบได้น้อย ส่งผลให้การศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าที่พบความสัมพันธ์ของสไนป์ดังกล่าวกับภาวะอหิวาต์ นอกจากนี้การศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) พบจีโนไทป์แบบ C/C มีความเสี่ยง (relative risk) ต่อการเกิดภาวะอหิวาต์สูงกว่าจีโนไทป์แบบ G/G ถึง 2.27 เท่า และจีโนไทป์แบบ C/G มีความเสี่ยงสูงกว่าจีโนไทป์แบบ G/G ถึง 1.67 เท่า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Jackson และคณะ (2009) ที่พบความถี่จีโนไทป์แบบ C/C และ C/G ต่างจากจีโนไทป์แบบ G/G อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมชาวอเมริกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของสไนป์ rs1858830 กับภาวะอหิวาต์มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาของ Sousa และคณะ (2008) พบความสัมพันธ์ของสไนป์ rs38845 (A/G) บริเวณอินทรอน 1 กับภาวะอหิวาต์ในผู้ป่วยชาวอิตาลี โดยพบความถี่แอลลีล A ใน

ผู้ป่วยออทิซึมสูงกว่าแอลลีล G อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาจีโนไทป์พบความถี่จีโนไทป์แบบ A/A และ A/G สูงกว่า G/G อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ซึ่งต่างจากการศึกษานี้และการศึกษาอื่นๆ ที่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว (Campbell et al., 2006; Thanseem et al., 2010) ส่วนการศึกษาสไนป์ส์ rs10243024 (A/G), rs38859 (C/T), rs13223756 (A/G) rs2299439 (G/T) และ rs2023748 (A/G) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของความถี่แอลลีลและ จีโนไทป์ของสไนป์ส์ดังกล่าวระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Campbell et al., 2006; Sousa et al., 2008; Thanseem et al., 2010)

การศึกษาความสัมพันธ์ของสไนป์ส์บนยีน *MET* ในรูปแบบ Family based association ของ Campbell และคณะ (2006) พบสไนป์ส์ rs1858830 มีการถ่ายทอดแอลลีล C และจีโนไทป์แบบ C/C จากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูงอย่างมีนัยสำคัญในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมชาวยุโรปจำนวน 204 ครอบครัว ($P = 0.0005$) และพบการถ่ายทอดแอลลีลและจีโนไทป์ดังกล่าวสูงขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมเป็น 743 ครอบครัว ($P = 0.000005$) ต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งของสไนป์ส์ทั้ง 7 ตำแหน่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงอย่างมีนัยสำคัญในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมชาวไทย สอดคล้องกับการศึกษาของ Thanseem และคณะ (2010) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมชาวญี่ปุ่น (126 ครอบครัว) ที่ไม่พบความสัมพันธ์ของสไนป์ส์ที่ศึกษานบนยีน *MET* มีการถ่ายทอดแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูง นอกจากนี้การศึกษาของ Sousa และคณะ (2008) พบสไนป์ส์ rs38845 บริเวณอินทรอน 1 มีการถ่ายทอดแอลลีล A จากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูงกว่าแอลลีล G อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.0035$) จากการศึกษาสไนป์ส์ทั้งหมด 36 ตำแหน่ง และการศึกษาของ Thanseem และคณะ (2010) ที่ศึกษาสไนป์ส์บนยีน *MET* ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง บริเวณ 5'UTR ถึงอินทรอน 15 (มีสไนป์ส์ rs1858830, rs38845 และ rs10243024 เหมือนกับการศึกษานี้) พบสไนป์ส์ rs38841 บริเวณอินทรอน 1 มีการถ่ายทอดแอลลีล A จากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูงกว่าแอลลีล G อย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.044$) และมีการถ่ายทอดแอลลีลดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อศึกษาซ้ำในคนยุโรปจำนวน 252 ครอบครัว ($P = 0.0006$) ซึ่งต่างจากการศึกษานี้ที่ไม่พบการถ่ายทอดแอลลีลของสไนป์ส์ rs38845 จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมชาวไทย

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมชาวไทยเพียง 160 ครอบครัวที่ส่วนใหญ่มีลูกเป็นออทิซึมสเปคตรัมเพียง 1 ราย (151 simplex families; 9 multiplex families) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thanseem และคณะ (2010) ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมชาวญี่ปุ่น ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่าการศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) ที่ศึกษาในครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรป 743 ครอบครัว (265 simplex families; 478 multiplex families) และการศึกษาของ Sousa และคณะ (2008) ในครอบครัวผู้ป่วยชาวยุโรป 407 ครอบครัว (325 multiplex families; 82 simplex families) จากการศึกษาของ Campbell และ

คณะ (2006) พบความสัมพันธ์ของสลิปส์ rs1858830 กับภาวะออทิซึมในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมที่มีลูกเป็นโรครมากกว่า 1 ราย (multiplex family) แต่เมื่อพิจารณาในครอบครัวที่มีลูกเป็นออทิซึมเพียง 1 ราย (simplex family) กลับไม่พบความสัมพันธ์ของสลิปส์ rs1858830 กับภาวะออทิซึม ($P = 0.202$) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม (sample size) และการเลือกครอบครัวผู้ป่วยที่มีลูกเป็นออทิซึมมากกว่า 1 ราย (multiplex family) อาจทำให้ได้ข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *MET* กับภาวะออทิซึมมากยิ่งขึ้น

การศึกษาที่พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์บนยีน *MET* โดยการศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) ซึ่งเลือกสลิปส์ 9 ตำแหน่งที่กระจายทั่วทั้งยีนตั้งแต่บริเวณโปรโมเตอร์จนถึงเอกซอน 21 มาศึกษาการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์บนยีน *MET* จำนวน 2 บล็อก คือ บล็อกแรกขนาด 17 กิโลเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *MET* ประกอบด้วยสลิปส์ด้วย rs437-rs184953-rs1858830-rs40238 และพบสลิปส์แฮพลotype แบบ G-C-G-C ในบล็อกดังกล่าวมีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสูง ($P = 0.008$) นอกจากนี้การศึกษาของ Sousa และคณะ (2008) ที่ศึกษาสลิปส์ทั้งหมด 36 ตำแหน่งที่กระจายทั่วทั้งยีน *MET* พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ทั้งหมด 4 บล็อก โดยบล็อกแรกประกอบด้วยสลิปส์บริเวณโปรโมเตอร์ขนาด 10 กิโลเบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) บล็อกที่ 2 บริเวณอินทรอน 1 ขนาด 3 กิโลเบส ประกอบด้วยสลิปส์ rs38845 ซึ่งพบว่าสลิปส์ดังกล่าวมีการถ่ายทอดแอลลีล A จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงประกอบอยู่ในบล็อกดังกล่าวด้วย บล็อกที่ 3 บริเวณอินทรอน 1 ถึงอินทรอน 2 ขนาด 37 กิโลเบส และบล็อกที่ 4 บริเวณอินทรอน 3 ถึงเอกซอน 20 ขนาด 56 กิโลเบส ต่างจากการศึกษาที่ไม่พบการถ่ายทอดสลิปส์บริเวณโปรโมเตอร์และบริเวณอินทรอน 1 มีการถ่ายทอดสลิปส์ในรูปแบบแฮพลotype จากพ่อแม่มาสู่ลูก ซึ่งอาจเนื่องมาจากเลือกศึกษาสลิปส์โปรโมเตอร์และบริเวณอินทรอน 1 เพียงตำแหน่งเดียวและบริเวณดังกล่าวมีขนาดใหญ่ทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ของสลิปส์บริเวณดังกล่าวในรูปแบบสลิปส์แฮพลotype

ผลการศึกษาสลิปส์แฮพลotype ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมครั้งนี้ พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสลิปส์ 4 ตำแหน่งจากการศึกษาทั้งหมด 7 ตำแหน่งบนยีน *MET* ($LD > 80$) บริเวณอินทรอน 3 ถึงเอกซอน 21 (rs1858830-rs38845 rs10243024-**rs38859-rs13223756-rs2299439-rs2023748**) ขนาด 56 กิโลเบสมีการถ่ายทอดสลิปส์ไปด้วยกันสูงในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และพบสลิปส์แฮพลotype ของบล็อกดังกล่าวแบบ **T-A-G-A** มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแฮพลotype แบบอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.040$) โดยในบล็อกดังกล่าวประกอบด้วยสลิปส์ rs38859 ที่มีการถ่ายทอดแอลลีล T จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแอลลีล G โดยมีอัตราการถ่ายทอดเป็น (94 : 70, $P = 0.0609$) และสลิปส์ rs2023748 ที่มีการถ่ายทอดแอลลีล A จากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าแอลลีล G โดยมีอัตราการถ่ายทอดเป็น (94 :

72, $P = 0.0877$) แม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในการวิเคราะห์แบบสนิปส์ตำแหน่งเดียว แต่เมื่อพิจารณาสนิปส์แฮโพลไทป์เพียง 2 ตำแหน่ง (rs38859 และ rs2023748) พบสนิปส์แฮโพลไทป์แบบ **T-A** มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (94.9 : 62.0, $P = 0.0086$) โดยพบความถี่ของแฮโพลไทป์ดังกล่าวร้อยละ 42.2 เมื่อเทียบกับสนิปส์แฮโพลไทป์แบบอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 66 โดยสนิปส์แฮโพลไทป์แบบ **T-A** ของสนิปส์ rs38859-rs2023748 ไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าสนิปส์แฮโพลไทป์แบบอื่นในบริเวณอินทรอน 3 ถึงเอกซอน 21 การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่พบความสัมพันธ์ของสนิปส์แฮโพลไทป์ดังกล่าวในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เลือกศึกษาสนิปส์บนยีน *MET* เพียง 7 ตำแหน่งซึ่งถือว่าน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาอื่นๆ มีรายงานสนิปส์บนยีน *MET* ในฐานข้อมูลมากกว่า 585 ตำแหน่ง (www.snpper.chip.org) รวมทั้งการศึกษานี้เลือกสนิปส์แต่ละตำแหน่งที่นำมาศึกษามีระยะห่างกันพอสมควรทำให้พบการถ่ายทอดไปด้วยกันของสนิปส์แต่ละตำแหน่งน้อยต่างจากการศึกษาอื่นก่อนหน้านี้ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนสนิปส์และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาอาจจะช่วยให้ได้ข้อมูลที่มากพอในการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปส์บนยีน *MET* กับภาวะออทิซึมได้

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมชาวไทย แต่มีรายงานการศึกษาการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก G เป็น C ของสโนิปส์ rs1858830 กับการแสดงออกของยีน *MET* ในผู้ป่วยออทิซึม จากการศึกษาของ Campbell และคณะ (2006) ที่พบความแตกต่างของแอลลีล C และจีโนไทป์แบบ C/C สูงในผู้ป่วยเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าแอลลีล C ของสโนิปส์ดังกล่าวส่งผลให้การจับของดีเอ็นเอกับโปรตีนจับได้ลดลง (DNA-protein complex) จึงตั้งสมมุติฐานว่า แอลลีล C น่าจะส่งผลให้เกิดภาวะออทิซึมขึ้น Campbell และคณะ (2006) ได้ทดสอบสมมุติฐานโดยสร้าง *MET* promoter 2 แบบขนาด 726 คู่เบส ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบส C และ G ของสโนิปส์ rs1858830 เข้าสู่ pGL4.10(luc2) luciferase reporter vector จากนั้นทำการ transfect เข้าสู่เซลล์ประสาทของหนู (N2A และ SN56) และ HEK cell line พบว่าการแสดงออกของ luciferase ลดลงกว่าครึ่งเมื่อมีแอลลีล C เทียบกับแอลลีล G ซึ่งการลดลงนี้ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของสโนิปส์ rs1858830 แบบแอลลีล C มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม รวมทั้งคาดการณ์ได้ว่าสโนิปส์ rs1858830 เป็นตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *MET* นอกจากนี้ยังพบว่าสโนิปส์ rs1858830 แบบแอลลีล C ส่งผลให้การจับกับ transcription factor protein (SP1 และ AP2) ลดลงเมื่อเทียบกับแอลลีล G

ต่อมา Campbell และคณะ (2007) ศึกษาการแสดงออกของยีน *MET* ในสมองส่วน Cerebral cortex ในผู้ป่วยออทิซึม โดยเลือกศึกษาในผู้ป่วยออทิซึม 7 รายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 8 คนที่มีความสอดคล้องกันในเรื่อง อายุ เพศ และส่วนของสมองที่ศึกษา พบระดับการแสดงออกของโปรตีน *MET* ลดลง 2 เท่าในผู้ป่วยออทิซึมเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบผู้ป่วยออทิซึมมีจีโนไทป์แบบ C/C สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (5 ต่อ 1 ราย) นอกจากนี้ Campbell และคณะยังพบ transcription signal อื่นๆ ที่ทำงานร่วมกับยีน *MET* มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม เช่น *HGF* (เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า) *PLAU* (เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า) *PLAUR* (เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า) *SERPINE1* (เพิ่มขึ้น 1.8 เท่า) และ *CD44* (เพิ่มขึ้น 7.7 เท่า) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในการควบคุมการแสดงออกของยีน *MET* ให้เป็นปกติ โปรตีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องจะต้องมีปริมาณที่ปกติไม่เพิ่มขึ้นเหมือนในผู้ป่วยออทิซึม

ดังนั้นการศึกษางานหรือการแสดงออกของยีน *MET* จึงมีความสำคัญและควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *RELN* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัม พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่แอลลีลและจีโนไทป์ของจำนวนซ้ำ $GGC \geq 14$ ซ้ำ บริเวณ 5'UTR สูงในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ควบคุมโดยการทดสอบ ไคสแควร์ แต่ไม่พบการถ่ายทอดจำนวนซ้ำ $GGC \geq 14$ ซ้ำจากพ่อแม่มาสู่ลูกสูงกว่าจำนวนซ้ำ $GGC < 14$ ซ้ำ และไม่พบแฮพลอไทป์ของจำนวนซ้ำ $GGC \geq 14$ ซ้ำกับสลิปส์ตำแหน่งอื่นที่ศึกษาบนยีน *RELN* มีความสัมพันธ์กับภาวะออทิซึมในรูปแบบสลิปส์แฮพลอไทป์ รายงานก่อนหน้านี้พบว่าจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลง ดังนั้นจำนวนซ้ำ GGC ที่พบสูงขึ้นในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมอาจเป็นปัจจัยหนึ่งส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึมสเปกตรัมขึ้นในคนไทย การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งบนยีน *RELN* (rs2299388, rs607755, rs2072403, rs362691, rs2159676, rs362746, rs736707) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่แอลลีล ความถี่จีโนไทป์และสลิปส์แฮพลอไทป์ของสลิปส์ทุกตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *RELN* ทั้งการศึกษาแบบ Population based case control และการศึกษาแบบ Family based association

การศึกษาความสัมพันธ์ของสลิปส์บนยีน *MET* กับเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัมไม่พบความสัมพันธ์ของสลิปส์ทั้ง 7 ตำแหน่งที่ศึกษาบนยีน *MET* กับภาวะออทิซึม (rs1858830, rs38845, rs10243024, rs38859, rs13223756, rs2299439, rs2023748) ทั้งการศึกษาแบบ Population based case control และแบบ Family based association แต่การศึกษาแฮพลอไทป์ของสลิปส์พบการถ่ายทอดสลิปส์แฮพลอไทป์ของสลิปส์ 4 ตำแหน่งแบบ T-A-G-A บริเวณอินทรอน 3 ถึงเอกซอน 21 (rs38859 rs13223756 rs2299439 rs2023748) โดยพบความถี่ของแฮพลอไทป์ดังกล่าวร้อยละ 40 มีการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมสูงกว่าแฮพลอไทป์แบบอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.040$)

จากข้อมูลการศึกษาค้างนี้สรุปได้ว่ายีน *RELN* และยีน *MET* อาจเป็นยีนที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึมสเปกตรัมในเด็กไทย เนื่องจากการศึกษาค้างนี้เป็นรายงานการพบความสัมพันธ์ดังกล่าวครั้งแรกในคนไทย การพบความสัมพันธ์แบบ case control อาจเกิดขึ้นโดยบังเอิญ ดังนั้นควรมีการศึกษาซ้ำในกลุ่มประชากรไทยในกลุ่มอื่นเพื่อยืนยันผลการศึกษาต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

- กนิษฐา ภัทรกุล, จินตนา จิรถาวร และ ณีฎฐิยา หิรัญกาญจน์. 2546. เวชศาสตร์โมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. Text and Journal Publication Co., Ltd: กรุงเทพมหานคร.
- จุฬามาส วิโรจน์อนันต์, จตุรพร แสงกุล และ พรพรด ลี้มประเสริฐ. 2549. ออทิสซึม. สงขลา นครินทร์เวชสาร. 24, 4(ก.ค.-ส.ค.): 325-332.
- นิชรา เรืองดารกานนท์. 2551. เด็กออทิสติก-เด็กสมาธิสั้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด. กรุงเทพมหานคร.
- A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. 1998. Human Molecular Genetics. 7(3): 571-578.
- Abdolmaleky, H. M., Cheng, K. H., Russo, A., Smith, C. L., Faraone, S. V., Wilcox, M., Shafa, R., Glatt, S. J., Nguyen, G., Ponte, J. F., Thiagalingam, S. and Tsuang, M. T. 2005. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. 134B(1): 60-66.
- Abrahams, B. S. and Geschwind, D. H. 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. Nature Reviews Genetics. 9(5): 341-355.
- Alarcon, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H., Nelson, S. F., Cantor, R. M. and Geschwind, D. H. 2008. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. American Journal of Human Genetics. 82(1): 150-159.
- Arking, D. E., Cutler, D. J., Brune, C. W., Teslovich, T. M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E. H. and Chakravarti, A. 2008. A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. American Journal of Human Genetics. 82(1): 160-164.
- Ashley-Koch, A. E., Jaworski, J., Ma de, Q., Mei, H., Ritchie, M. D., Skaar, D. A., Robert-Delong, G., Worley, G., Abramson, R. K., Wright, H. H., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., Martin, E. R. and Pericak-Vance, M. A. 2007. Investigation of

- potential gene-gene interactions between APOE and RELN contributing to autism risk. *Psychiatric Genetics*. 17(4): 221-226.
- 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. *Molecular Psychiatry*. 5(3): 320-322.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E. and Rutter, M. 1995. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological Medicine*. 25(1): 63-77.
- Bailey, A., Palferman, S., Heavey, L. and Le Couteur, A. 1998. Autism: the phenotype in relatives. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(5): 369-392.
- Baker, P., Piven, J. and Sato, Y. 1998. Autism and tuberous sclerosis complex: prevalence and clinical features. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(4): 279-285.
- Bakkaloglu, B., O'Roak, B. J., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A. G., Stillman, A. A., Tanriver, G., Abrahams, B. S., Duvall, J. A., Robbins, E. M., Geschwind, D. H., Biederer, T., Gunel, M., Lifton, R. P. and State, M. W. 2008. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*. 82(1): 165-173.
- 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. and Slager, S. 1999. An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 88B(6): 609-615.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M. J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21(2): 263-265.
- Behjati, F., Shafaghati, Y., Firouzabadi, S. G., Kahrizi, K., Bagherizadeh, I., Najmabadi, H., Bint, S. and Ogilvie, C. 2008. M-banding characterization of a 16p11.2p13.1

- tandem duplication in a child with autism, neurodevelopmental delay and dysmorphism. *European Journal of Medical Genetics*. 51(6): 608-614.
- Betancur, C. 2010. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research*. 36: 4C:3
- Borgatti, R., Piccinelli, P., Passoni, D., Raggi, E. and Ferrarese, C. 2001. Pervasive developmental disorders and GABAergic system in patients with inverted duplicated chromosome 15. *Journal of Child Neurology*. 16(12): 911-914.
- Benayed, R., Choi, J., Matteson, P. G., Gharani, N., Kamdar, S., Brzustowicz, L. M. and Millonig, J. H. 2009. Autism-associated haplotype affects the regulation of the homeobox gene, ENGRAILED2. *Biological Psychiatry*. 66(10): 911-917.
- Bonora, E., Beyer, K. S., Lamb, J. A., Parr, J. R., Klauck, S. M., Benner, A., Paolucci, M., Abbott, A., Ragoussis, I., Poustka, A., Bailey, A. J. and Monaco, A. P. 2003. Analysis of reelin as a candidate gene for autism. *Molecular Psychiatry*. 8(10): 885-892.
- Bonora, E., Lamb, J. A., Barnby, G., Sykes, N., Moberly, T., Beyer, K. S., Klauck, S. M., Poustka, F., Bacchelli, E., Blasi, F., Maestrini, E., Battaglia, A., Haracopos, D., Pedersen, L., Isager, T., Eriksen, G., Viskum, B., Sorensen, E. U., Brondum-Nielsen, K., Cotterill, R., Engeland, H., Jonge, M., Kemner, C., Steggehuis, K., Scherpenisse, M., Rutter, M., Bolton, P. F., Parr, J. R., Poustka, A., Bailey, A. J. and Monaco, A. P. 2005. Mutation screening and association analysis of six candidate genes for autism on chromosome 7q. *European Journal of Human Genetics*. 13(2): 198-207.
- Borgatti, R., Piccinelli, P., Passoni, D., Raggi, E. and Ferrarese, C. 2001. Pervasive developmental disorders and GABAergic system in patients with inverted duplicated chromosome 15. *Journal of Child Neurology*. 16(12): 911-914.
- Botella-Lopez, A., Burgaya, F., Gavin, R., Garcia-Ayllon, M. S., Gomez-Tortosa, E., Pena-Casanova, J., Urena, J. M., Del Rio, J. A., Blesa, R., Soriano, E. and Saez-Valero, J. 2006. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(14): 5573-5578.
- Brightwell, G., Wycherley, R. and Waghorn, A. 2002. SNP genotyping using a simple and rapid single-tube modification of ARMS illustrated by analysis of 6 SNPs in

- a population of males with FRAXA repeat expansions. *Molecular and Cellular Probes*. 16(4): 297-305.
- Butler, M. G., Dasouki, M. J., Zhou, X. P., Talebizadeh, Z., Brown, M., Takahashi, T. N., Miles, J. H., Wang, C. H., Stratton, R., Pilarski, R. and Eng, C. 2005. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *Journal of Medical Genetics*. 42(4): 318-321.
- Buxbaum, J. D., Silverman, J. M., Smith, C. J., Greenberg, D. A., Kilifarski, M., Reichert, J., Cook, E. H., Fang, Jr. Y., Song, C. Y. and Vitale, R. 2002. Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Molecular Psychiatry*. 7(3): 311-316.
- Campbell, D. B., D'Oronzio, R., Garbett, K., Ebert, P. J., Mirnics, K., Levitt, P. and Persico, A. M. 2007. Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Annals of Neurology*. 62(3): 243-250.
- Campbell, D. B., Li, C., Sutcliffe, J. S., Persico, A. M. and Levitt, P. 2008. Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Research*. 1(3): 159-168.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(45): 16834-16839.
- Cardon, L. R. and Bell, J. I. 2001. Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics*. 2(2): 91-99.
- Carney, R. M., Wolpert, C. M., Ravan, S. A., Shahbazian, M., Ashley-Koch, A., Cuccaro, M. L., Vance, J. M. and Pericak-Vance, M. A. 2003. Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatric Neurology*. 28(3): 205-211.
- Chen, M. L., Chen, S. Y., Huang, C. H. and Chen, C. H. 2002. Identification of a single nucleotide polymorphism at the 5' promoter region of human reelin gene and association study with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 7(5): 447-448.

- Chen, Y., Sharma, R. P., Costa, R. H., Costa, E. and Grayson, D. R. 2002. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Research*. 30(13): 2930-2939.
- Comoglio, P. M. and Boccaccio, C. 2001. Scatter factors and invasive growth. *Seminars in Cancer Biology*. 11(2): 153-165.
- Conciatori, M., Stodgell, C. J., Hyman, S. L., O'Bara, M., Militerni, R., Bravaccio, C., Trillo, S., Montecchi, F., Schneider, C., Melmed, R., Elia, M., Crawford, L., Spence, S. J., Muscarella, L., Guarnieri, V., D'Agruma, L., Quattrone, A., Zelante, L., Rabinowitz, D., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Reichelt, K. L., Rodier, P. M. and Persico, A. M. 2004. Association between the HOXA1 A218G polymorphism and increased head circumference in patients with autism. *Biology Psychiatry*. 55(4): 413-419.
- Conroy, J., Meally, E., Kearney, G., Fitzgerald, M., Gill, M. and Gallagher, L. 2004. Serotonin transporter gene and autism: a haplotype analysis in an Irish autistic population. *Molecular Psychiatry*. 9(6): 587-593.
- Cook, Jr. E. H. 2001. Genetics of autism. *Child & Adolescent Psychiatric Clinics of North America*. 10(2): 333-350.
- Cordell, H. J. and Clayton, D. G. 2005. Genetic association studies. *Lancet*. 366(9491): 1121-1131.
- Cornish, K., Burack, J. A., Rahman, A., Munir, F., Russo, N. and Grant, C. 2005. Theory of mind deficits in children with fragile X syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*. 49(Pt5): 372-378.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I. and Curran, T. 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 374(6524): 719-723.
- D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K. and Curran, T. 1997. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *Journal of Neuroscience*. 17(1): 23-31.
- Dawn Teare, M. and Barrett, J. H. 2005. Genetic linkage studies. *Lancet*. 366(9490): 1036-1044.

- DeSilva, U., D'Arcangelo, G., Braden, V., Chen, J., Miao, G. G., Curran, T. and Green, E. D. 1997. The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. *Genome Research*. 7(2): 157-164.
- Devlin, B., Bennett, P., Dawson, G., Figlewicz, D. A., Grigorenko, E. L., McMahon, W., Minschew, N., Pauls, D., Smith, M., Spence, M. A., Rodier, P. M., Stodgell, C. and Schellenberg, G. D. 2004. Alleles of a reelin CGG repeat do not convey liability to autism in a sample from the CPEA network. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 126B(1): 46-50.
- Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G. P. and Barrack, E. R. 2005. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate*. 62(2): 133-139.
- Dutta, S., Gangopadhyay, P. K., Sinha, S., Chatterjee, A., Ghosh, S. and Rajamma, U. 2010. An Association Analysis of Reelin Gene (RELN) Polymorphisms with Childhood Epilepsy in Eastern Indian Population from West Bengal. *Cellular and Molecular Neurobiology*. (Accepted 23 July 2010)
- Dutta, S., Guhathakurta, S., Sinha, S., Chatterjee, A., Ahmed, S., Ghosh, S., Gangopadhyay, P. K., Singh, M. and Usha, R. 2007. Reelin gene polymorphisms in the Indian population: a possible paternal 5'UTR-CGG-repeat-allele effect on autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 144B(1): 106-112.
- Dutta, S., Sinha, S., Ghosh, S., Chatterjee, A., Ahmed, S. and Usha, R. 2008. Genetic analysis of reelin gene (RELN) SNPs: no association with autism spectrum disorder in the Indian population. *Neuroscience Letters*. 441(1): 56-60.
- Duvall, J. A., Lu, A., Cantor, R. M., Todd, R. D., Constantino, J. N. and Geschwind, D. H. 2007. A quantitative trait locus analysis of social responsiveness in multiplex autism families. *American Journal of Psychiatry*. 164(4): 656-662.
- Dykens, E. M., Sutcliffe, J. S. and Levitt, P. 2004. Autism and 15q11-q13 disorders: behavioral, genetic, and pathophysiological issues. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. 10(4): 284-291.
- Espinosa de los Monteros, L. E., Galan, J. C., Gutierrez, M., Samper, S., Garcia Marin, J. F., Martin, C., Dominguez, L., de Rafael, L., Baquero, F., Gomez-Mampaso, E. and Blazquez, J. 1998. Allele-specific PCR method based on pncA and oxyR

- sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis* *pncA* sequence polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(1): 239-242.
- Fatemi, S. H. 2002. The role of Reelin in pathology of autism. *Molecular Psychiatry*. 7(9): 919-920.
- Fatemi, S. H., Earle, J., Kanodia, R., Kist, D., Emamian, E. S., Patterson, P. H., Shi, L. and Sidwell, R. 2002. Prenatal viral infection leads to pyramidal cell atrophy and macrocephaly in adulthood: implications for genesis of autism and schizophrenia. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 22(1): 25-33.
- Fatemi, S. H., Halt, A. R., Realmuto, G., Earle, J., Kist, D. A., Thuras, P. and Merz, A. 2002. Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 22(2): 171-175.
- Fatemi, S. H., Stary, J. M. and Egan, E. A. 2002. Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 22(2): 139-152.
- Ferrie, R. M., Schwarz, M. J., Robertson, N. H., Vaudin, S., Super, M., Malone, G. and Little, S. 1992. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *American Journal of Human Genetics*. 51(2): 251-262.
- Fombonne, E. 2002. Epidemiological trends in rates of autism. *Molecular Psychiatry*. 7(Suppl2): S4-S6.
- Fombonne, E. 2003. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 33(4): 365-382.
- Freitag, C. M. 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Molecular Psychiatry*. 12(1): 2-22.
- Furge, K. A., Zhang, Y. W. and Vande Woude, G. F. 2000. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*. 19(49): 5582-5589.
- Gharani, N., Benayed, R., Mancuso, V., Brzustowicz, L. M. and Millonig, J. H. 2004. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*. 9(5): 474-484.

- Ghaziuddin, M. and Burmeister, M. 1999. Deletion of chromosome 2q37 and autism: a distinct subtype?. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 29(3): 259-263.
- Gillberg, C. 1998. Chromosomal disorders and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 28(5): 415-425.
- Gillberg, I. C., Gillberg, C. and Ahlsen, G. 1994. Autistic behaviour and attention deficits in tuberous sclerosis: a population-based study. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 36(1): 50-56.
- Gong, X., Jia, M., Ruan, Y., Shuang, M., Liu, J., Wu, S., Guo, Y., Yang, J., Ling, Y., Yang, X. and Zhang, D. 2004. Association between the FOXP2 gene and autistic disorder in Chinese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 127B(1): 113-116.
- Goodlin-Jones, B. L., Tassone, F., Gane, L. W. and Hagerman, R. J. 2004. Autistic spectrum disorder and the fragile X premutation. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 25(6): 392-398.
- Grayson, D. R., Jia, X., Chen, Y., Sharma, R. P., Mitchell, C. P., Guidotti, A. and Costa, E. 2005. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(26): 9341-9346.
- Hatton, D. D., Sideris, J., Skinner, M., Mankowski, J., Bailey, D. B., Roberts, J. and Mirrett, P. 2006. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 140A(17): 1804-1813.
- Herault, J., Petit, E., Martineau, J., Perrot, A., Lenoir, P., Cherpi, C., Barthelemy, C., Sauvage, D., Mallet, J. and Muh, J. P. 1995. Autism and genetics: clinical approach and association study with two markers of HRAS gene. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 60B(4): 276-281.
- He, Y., Xun, G., Xia, K., Hu, Z., Lv, L., Deng, Z. and Zhao, J. 2010. No significant association between RELN polymorphism and autism in case-control and family-based association study in Chinese Han population. *Psychiatry Research*. (Accepted 24 April 2010)
- Holt, R., Barnby, G., Maestrini, E., Bacchelli, E., Brocklebank, D., Sousa, I., Mulder, E. J., Kantojarvi, K., Jarvela, I., Klauck, S. M., Poustka, F., Bailey, A. J. and

- Monaco, A. P. 2010. Linkage and candidate gene studies of autism spectrum disorders in European populations. *European Journal of Human Genetics*. 18(9): 1013-1019.
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. A., Grant, P. E., Hourihane, J. O., Martin, N. D. and Walsh, C. A. 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics*. 26(1): 93-96.
- Howell, B. W., Herrick, T. M. and Cooper, J. A. 1999. Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes and Development*. 13(6): 643-648.
- Huang, C. H. and Chen, C. H. 2006. Absence of association of a polymorphic GGC repeat at the 5' untranslated region of the reelin gene with schizophrenia. *Psychiatry Research*. 142(1): 89-92.
- Huang, M. M., Arnheim, N. and Goodman, M. F. 1992. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Research*. 20(17): 4567-4573.
- Hughes, J. R. 2008. A review of recent reports on autism: 1000 studies published in 2007. *Epilepsy & Behavior*. 13(3): 425-437.
- Hughes, J. R. 2009. Update on autism: a review of 1300 reports published in 2008. *Epilepsy & Behavior*. 16(4): 569-589.
- Hutcherson, H. B., Olson, L. M., Bradford, Y., Folstein, S. E., Santangelo, S. L., Sutcliffe, J. S. and Haines, J. L. 2004. Examination of NRCAM, LRRN3, KIAA0716, and LAMB1 as autism candidate genes. *BMC Medical Genetics*. 5:12.
- Impagnatiello, F., Guidotti, A. R., Pesold, R. C., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Smalheiser, N. R., Davis, J. M., Pandey, G. N., Pappas, G. D., Tueting, P., Sharma, R. P. and Costa, E. 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(26): 15718-15723.
- Ingram, J. L., Stodgell, C. J., Hyman, S. L., Figlewicz, D.A., Weitkamp, L. R. and Rodier, P. M. 2000. Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: genetic susceptibility to autism spectrum disorders. *Teratology*. 62(6): 393-405.

- Jackson, P. B., Boccuto, L., Skinner, C., Collins, J. S., Neri, G., Gurrieri, F. and Schwartz, C. E. 2009. Further evidence that the rs1858830 C variant in the promoter region of the MET gene is associated with autistic disorder. *Autism Research*. 2(4): 232-236.
- Jamain, S., Betancur, C., Quach, H., Philippe, A., Fellous, M., Giros, B., Gillberg, C., Leboyer, M. and Bourgeron, T. 2002. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Molecular Psychiatry*. 7(3): 302-310.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C. and Bourgeron, T. 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*. 34(1): 27-29.
- Jiang, Y. H., Sahoo, T., Michaelis, R. C., Bercovich, D., Bressler, J., Kashork, C. D., Liu, Q., Shaffer, L. G., Schroer, R. J., Stockton, D. W., Spielman, R. S., Stevenson, R. E. and Beaudet, A. L. 2004. A mixed epigenetic/genetic model for oligogenic inheritance of autism with a limited role for UBE3A. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 131A(1): 1-10.
- Jin, P. and Warren, S. T. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics*. 9(6): 901-908.
- Junaid, M. A., Kowal, D., Barua, M., Pullarkat, P. S., Sklower Brooks, S. and Pullarkat, R. K. 2004. Proteomic studies identified a single nucleotide polymorphism in glyoxalase I as autism susceptibility factor. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 131A(1): 11-17.
- Kelemenova, S., Schmidtova, E., Ficek, A., Celec, P., Kubranska, A. and Ostatnikova, D. 2010. Polymorphisms of candidate genes in Slovak autistic patients. *Psychiatric Genetics*. 20(4): 137-139.
- Kent, L., Evans, J., Paul, M. and Sharp, M. 1999. Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 41(3): 153-158.
- Kim, S. J., Young, I. j., Gonen, D., Veenstra-VanderWeele, J., Courchesne, R., Courchesne, E., Lord, C., Leventhal, B. L., Cook, Jr. E. H. and Insel, T. R.

2002. Transmission disequilibrium testing of arginine vasopressin receptor 1A (AVPR1A) polymorphisms in autism. *Molecular Psychiatry*. 7(5): 503-507.
- Krebs, M. O., Betancur, C., Leroy, S., Bourdel, M. C., Gillberg, C. and Leboyer, M. 2002. Absence of association between a polymorphic GGC repeat in the 5' untranslated region of the reelin gene and autism. *Molecular Psychiatry*. 7(7): 801-804.
- Kumar, R. A., KaraMohamed, S., Sudi, J., Conrad, D. F., Brune, C., Badner, J. A., Gilliam, T. C., Nowak, N. J., Cook, E. H., Dobyns, Jr. W. B. and Christian, S. L. 2008. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics*. 17(4): 628-638.
- Lam, C. W., Yeung, W. L., Ko, C. H., Poon, P. M., Tong, S. F., Chan, K. Y., Lo, I F., Chan, L. Y., Hui, J., Wong, V., Pang, C. P., Lo, Y. M. and Fok, T. F. 2000. Spectrum of mutations in the MECP2 gene in patients with infantile autism and Rett syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 37(12): E41.
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M. P., Raynaud, M., Ronce, N., Lemonnier, E., Calvas, P., Laudier, B., Chelly, J., Fryns, J. P., Ropers, H. H., Hamel, B. C., Andres, C., Barthelemy, C., Moraine, C. and Briault, S. 2004. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 74B(3): 552-557.
- Le Couteur, A., Bailey, A., Goode, S., Pickles, A., Robertson, S., Gottesman, I. and Rutter, M. 1996. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 37(7): 785-801.
- Li, H., Yamagata, T., Mori, M. and Momoi, M. Y. 2005. Absence of causative mutations and presence of autism-related allele in FOXP2 in Japanese autistic patients. *Brain Development*. 27(3): 207-210.
- Li, H., Li, Y., Shao, J., Li, R., Qin, Y., Xie, C. and Zhao, Z. 2008. The association analysis of RELN and GRM8 genes with autistic spectrum disorder in Chinese Han population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 147B(2): 194-200.

- Li, J., Nguyen, L., Gleason, C., Lotspeich, L., Spiker, D., Risch, N. and Myers, R. M. 2004. Lack of evidence for an association between WNT2 and RELN polymorphisms and autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 126B(1): 51-57.
- Li, L. B. and Bonini, N. M. 2010. Roles of trinucleotide-repeat RNA in neurological disease and degeneration. *Trends in Neurosciences*. 33(6): 292-298.
- Limprasert, P. 2008. Genetics of Autism. *Sirijaj Medical Journal*. 60(5): 305-309.
- Liu, J., Nyholt, D. R., Magnussen, P., Parano, E., Pavone, P., Geschwind, D., Lord, D., Iversen, P., Hoh, J., Ott, J. and Gilliam, T. C. 2001. A genomewide screen for autism susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics*. 69(2): 327-340.
- Lobo-Menendez, F., Sossey-Alaoui, K., Bell, J. M., Copeland-Yates, S. A., Plank, A. M., Sanford, S. O., Skinner, C., Simensen, R. J., Schroer, R. J. and Michaelis, R. C. 2003. Absence of MeCP2 mutations in patients from the South Carolina autism project. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 117B(1): 97-101.
- Marui, T., Hashimoto, O., Nanba, E., Kato, C., Tochigi, M., Umekage, T., Ishijima, M., Kohda, K., Kato, N. and Sasaki, T. 2004. Association between the neurofibromatosis-1 (NF1) locus and autism in the Japanese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 131B(1): 43-47.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal of Molecular Biology*. 288(5): 911-940.
- 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. E. 2004. A linkage disequilibrium map of the 1-Mb 15q12 GABA(A) receptor subunit cluster and association to autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 131B(1): 51-59.
- McCauley, J. L., Olson, L. M., Dowd, M., Amin, T., Steele, A., Blakely, R. D., Folstein, S. E., Haines, J. L. and Sutcliffe, J. S. 2004. Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism.

- American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. 127B(1): 104-112.
- Miles, J. H. and Mccathren, R. B. [Last Update December 1, 2005]. Autism overview. In: GeneReviews at Gene Tests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. <http://www.genetests.org>. (Accessed 09/15/08)
- Muhle, R., Trentacoste, S. V. and Rapin, I. 2004. The genetics of autism. *Pediatrics*. 113 (5): e472-486.
- Newton, C. R., Heptinstall, L. E., Summers, C., Super, M., Schwarz, M., Anwar, R., Graham, A., Smith, J. C. and Markham, A. F. 1989. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet*. 2(8678-8679): 1481-1483.
- Nurmi, E. L., Bradford, Y., Chen, Y., Hall, J., Arnone, B., Gardiner, M. B., Hutcheson, H. B., Gilbert, J. R., Pericak-Vance, M. A., Copeland-Yates, S. A., Michaelis, R. C., Wassink, T. H., Santangelo, S. L., Sheffield, V. C., Piven, J., Folstein, S. E., Haines, J. L. and Sutcliffe, J. S. 2001. Linkage disequilibrium at the Angelman syndrome gene UBE3A in autism families. *Genomics*. 77(1-2): 105-113.
- Odell, D., Maciulis, A., Cutler, A., Warren, L., McMahon, W. M., Coon, H., Stubbs, G., Henley, K. and Torres, A. 2005. Confirmation of the association of the C4B null allele in autism. *Human Immunology*. 66(2): 140-145.
- Oostra, B. A. and Willemsen, R. 2001. Diagnostic tests for fragile X syndrome. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 1(2): 226-232.
- Perez-Garcia, C. G., Tissir, F., Goffinet, A. M. and Meyer, G. 2004. Reelin receptors in developing laminated brain structures of mouse and human. *European Journal of Neuroscience*. 20(10): 2827-2832.
- Persico, A. M., D'Agruma, L., Maiorano, N., Totaro, A., Militerni, R., Bravaccio, C., Wassink, T. H., Schneider, C., Melmed, R., Trillo, S., Montecchi, F., Palermo, M., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Reichelt, K. L., Conciatori, M., Marino, R., Quattrocchi, C. C., Baldi, A., Zelante, L., Gasparini, P. and Keller, F. 2001. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular Psychiatry*. 6(2): 150-159.

- Persico, A. M., Levitt, P. and Pimenta, A. F. 2006. Polymorphic GGC repeat differentially regulates human reelin gene expression levels. *Journal of Neural Transmission*. 113(10): 1373-1382.
- 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. Paris Autism Research International Sibpair Study. *Human Molecular Genetics*. 8(5): 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): 10-16.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J. and Sham, P. C. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*. 81(3): 559-575.
- Quattrocchi, C. C., Wannenes, F., Persico, A. M., Ciafre, S. A., D'Arcangelo, G., Farace, M. G. and Keller, F. 2002. Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*. 277(1): 303-309.
- Ramoz, N., Reichert, J. G., Smith, C. J., Silverman, J. M., Beshpalova, I. N., Davis, K. L. and Buxbaum, J. D. 2004. Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene with autism. *American Journal of Psychiatry*. 161(4): 662-669.
- Rapin, I. 1997. Autism. *New England Journal of Medicine*. 337(2): 97-104.
- Reddy, K. S. 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Medical Genetics*. 6(3): 1-16.
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., McCague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J., Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wieser-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P. B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D. L., Cavalli-Sforza, L. L., Kraemer, H. C. and Myers, R. M. 1999. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *American Journal of Human Genetics*. 65(2): 493-507.

- Rogers, S. J., Wehner, D. E. and Hagerman, R. 2001. The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 22(6): 409-417.
- Russo, A. J., Krigsman, A., Jepson, B. and Wakefield, A. 2009. Decreased Serum Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Autistic Children with Severe Gastrointestinal Disease. *Biomark Insights*. 4: 181-190.
- Serajee, F. J., Zhong, H. and Mahbulul Huq, A. H. 2006. Association of Reelin gene polymorphisms with autism. *Genomics*. 87(1): 75-83.
- Seripa, D., Matera, M. G., Franceschi, M., Daniele, A., Bizzarro, A., Rinaldi, M., Panza, F., Fazio, V. M., Gravina, C., D'Onofrio, G., Solfrizzi, V., Masullo, C. and Pilotto, A. 2008. The RELN locus in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 14(3): 335-344.
- Shao, Y., Wolpert, C. M., Raiford, K. L., Menold, M. M., Donnelly, S. L., Ravan, S. A., Bass, M. P., McClain, C., von Wendt, L., Vance, J. M., Abramson, R. H., Wright, H. H., Ashley-Koch, A., Gilbert, J. R., DeLong, R. G., Cuccaro, M. L. and Pericak-Vance, M. A. 2002. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder. *American Journal of Medical Genetics*. 114(1): 99-105.
- Sheth, P. R. and Watowich, S. J. 2005. Oligomerization-induced differential dephosphorylation of c-Met receptor tyrosine kinase. *Biochemistry*. 44(33): 10984-10993.
- Shuang, M., Liu, J., Jia, M. X., Yang, J. Z., Wu, S. P., Gong, X. H., Ling, Y. S., Ruan, Y., Yang, X. L. and Zhang, D. 2004. Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 131B(1): 48-50.
- Simonoff, E., Bolton, P. and Rutter, M. 1996. Mental retardation: genetic findings, clinical implications and research agenda. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 37(3): 259-280.
- Skaar, D. A., Shao, Y., Haines, J. L., Stenger, J. E., Jaworski, J., Martin, E. R., DeLong, G. R., Moore, J. H., McCauley, J. L., Sutcliffe, J. S., Ashley-Koch, A. E., Cuccaro, M. L., Folstein, S. E., Gilbert, J. R. and Pericak-Vance, M. A. 2005.

- Analysis of the RELN gene as a genetic risk factor for autism. *Molecular Psychiatry*. 10(6): 563-571.
- Smalheiser, N. R., Costa, E., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Auta, J., Lacor, P., Kriho, V. and Pappas, G. D. 2000. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(3): 1281-1286.
- Smalley, S. L., Tanguay, P. E., Smith, M. and Gutierrez, G. 1992. Autism and tuberous sclerosis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 22(3): 339-355.
- Sousa, I., Clark, T. G., Toma, C., Kobayashi, K., Choma, M., Holt, R., Sykes, N. H., Lamb, J. A., Bailey, A. J., Battaglia, A., Maestrini, E. and Monaco, A. P. 2009. MET and autism susceptibility: family and case-control studies. *European Journal of Human Genetics*. 17(6): 749-758.
- State, M. W. 2006. A surprising MET amorphosis: autism genetics finds a common functional variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(45): 16621-16622.
- Steffenburg, S., Gillberg, C., Hellgren, L., Andersson, L., Gillberg, I. C., Jakobsson, G. and Bohman, M. 1989. A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 30(3): 405-416.
- Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Huentelman, M. J., Gottlieb, S., Dobrin, S. E., Parod, J. M., Stephan, D. A. and Morton, D. H. 2006. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *New England Journal of Medicine*. 354(13): 1370-1377.
- Tamura, Y., Kunugi, H., Ohashi, J. and Hohjoh, H. 2007. Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*. 12(6): 593-600.
- Thanseem, I., Nakamura, K., Miyachi, T., Toyota, T., Yamada, S., Tsujii, M., Tsuchiya, K.J., Anitha, A., Iwayama, Y., Yamada, K., Hattori, E., Matsuzaki, H., Matsumoto, K., Iwata, Y., Suzuki, K., Suda, S., Kawai, M., Sugihara, G., Takebayashi, K., Takei, N., Ichikawa, H., Sugiyama, T., Yoshikawa, T. and Mori, N. 2010. Further evidence for the role of MET in autism susceptibility. *Neuroscience Research*. 68(2): 137-141.

- Tissir, F. and Goffinet, A. M. 2003. Reelin and brain development. *Nature Reviews Neuroscience*. 4(6): 496-505.
- Veenstra-VanderWeele, J. and Cook, Jr. E. H. 2004. Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*. 9(9): 819-832.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F. and Zhang, F. P. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 65(5): 905-914.
- Vincent, J. B., Melmer, G., Bolton, P. F., Hodgkinson, S., Holmes, D., Curtis, D. and Gurling, H. M. 2005. Genetic linkage analysis of the X chromosome in autism, with emphasis on the fragile X region. *Psychiatric Genetics*. 15(2): 83-90.
- Vourc'h, P., Bienvenu, T., Beldjord, C., Chelly, J., Barthelemy, C., Muh, J. P. and Andres, C. 2001. No mutations in the coding region of the Rett syndrome gene MECP2 in 59 autistic patients. *European Journal of Human Genetics*. 9(7): 556-558.
- Vourc'h, P., Martin, I., Bonnet-Brilhault, F., Marouillat, S., Barthelemy, C., Pierre Muh, J. and Andres, C. 2003. Mutation screening and association study of the UBE2H gene on chromosome 7q32 in autistic disorder. *Psychiatric Genetics*. 13(4): 221-225.
- Wassink, T. H., Brzustowicz, L. M., Bartlett, C. W. and Szatmari, P. 2004. The search for autism disease genes. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research*. 10(4): 272-283.
- Wassink, T. H., Piven, J. and Patil, S. R. 2001. Chromosomal abnormalities in a clinic sample of individuals with autistic disorder. *Psychiatric Genetics*. 11(2): 57-63.
- Wassink, T. H., Piven, J., Vieland, V. J., Huang, J., Swiderski, R. E., Pietila, J., Braun, T., Beck, G., Folstein, S. E., Haines, J. L. and Sheffield, V. C. 2001. Evidence supporting WNT2 as an autism susceptibility gene. *American Journal of Medical Genetics*. 105(5): 406-413.
- Wassink, T. H., Piven, J., Vieland, V. J., Pietila, J., Goedken, R. J., Folstein, S. E. and Sheffield, V. C. 2002. Evaluation of FOXP2 as an autism susceptibility gene. *American Journal of Medical Genetics*. 114(5): 566-569.

- Williams, G., King, J., Cunningham, M., Stephan, M., Kerr, B. and Hersh, J. H. 2001. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 43(3): 202-206.
- Wolff, D. J., Clifton, K., Karr, C. and Charles, J. 2002. Pilot assessment of the subtelomeric regions of children with autism: detection of a 2q deletion. *Journal of Medical Genetics*. 4(1): 10-14.
- Yano, H., Wang, B. E., Ahmad, I., Zhang, J., Abo, T., Nakayama, J., Krempen, K. and Kohwi, Y. 1999. Identification of (CAG)(n) and (CGG)(n) repeat-binding proteins, CAGERS expressed in mature neurons of the mouse brain. *Expression Cell Research*. 251(2): 388-400.
- Yip, J. W., Yip, Y. P., Nakajima, K. and Capriotti, C. 2000. Reelin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(15): 8612-8616.
- Yirmiya, N., Pilowsky, T., Nemanov, L., Arbelle, S., Feinsilver, T., Fried, I. and Ebstein, R. P. 2001. Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 105A(4): 381-386.
- Yonan, A. L., Alarcon, M., Cheng, R., Magnusson, P. K., Spence, S. J., Palmer, A. A., Grunn, A., Juo, S. H., Terwilliger, J. D., Liu, J., Cantor, R. M., Geschwind, D. H. and Gilliam, T. C. 2003. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics*. 73(4): 886-897.
- Youngs, S. A., Murray, A., Dennis, N., Ennis, E., Lewis, C., McKechnie, N., Pound, M., Sharrock, A. and Jacobs, P. 2000. FRAXA and FRAXE: the results of a five year survey. *Journal of Medical Genetics*. 37(6): 415-421.
- Zhang, H., Liu, X., Zhang, C., Mundo, E., Macciardi, F., Grayson, D. R., Guidotti, A. R. and Holden, J. J. 2002. Reelin gene alleles and susceptibility to autism spectrum disorders. *Molecular Psychiatry*. 7(9): 1012-1017.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 71 แสดงผลการสำรวจความชุกของการเกิดภาวะออทิซึมในแต่ละประเทศ (ดัดแปลงจาก Fombonne, 2003)

ปีที่ตีพิมพ์ (ค.ศ.)	ผู้แต่ง	ประเทศ	ขนาดกลุ่ม ตัวอย่าง	จำนวนผู้ป่วย ออทิซึม	เกณฑ์วินิจฉัย	อัตราส่วนเพศ (ชาย : หญิง)	ความชุกต่อ 10,000 คน
1966	Lotter, V.	UK	78,000	32	Rating scale	2.6 (23/9)	4.1
1970	Brask, B. H.	Denmark	46,500	20	Clinical	1.4 (12/7)	4.3
1970	Treffert, D. A.	USA	899,750	69	Kanner	3.06 (52/17)	0.7
1976	Wing et al	UK	25,000	17	24 Items rating scale of Lotter	16 (16/1)	4.8
1982	Hoshino et al	Japan	609,848	142	Kanner's criteria	9.9 (129/13)	2.33
1983	Bohman et al	Sweden	69,000	39	Rutter criteria	1.6 (24/15)	5.6
1984	McCarthy et al	Ireland	65,000	28	Kanner	1.33 (16/12)	4.3
1986	Steinhausen et al	Germany	279,616	52	Rutter	2.25 (36/16)	1.9
1987	Burd et al	USA	180,986	59	DSM-III	2.7 (43/16)	3.26
1987	Matsuishi et al	Japan	32,834	51	DSM-III	4.7 (42/9)	15.5
1988	Tanous et al	Japan	95,394	132	DSM-III	4.07 (106/26)	13.8
1988	Bryson et al	Canada	20,800	21	New RDC	2.5 (15/6)	10.1
1989	Sugiyama, T. and Abe, T.	Japan	12,263	16	DSM-III	-	13.0
1989	Cialdella, Ph. and Mabelle, N.	France	135,180	61	DSM-III like	2.3	4.5
1989	Ritvo et al	USA	769,620	241	DSM-III	3.73 (190/51)	2.47
1991	Gillberg et al	Sweden	78,106	74	DSM-III	2.7 (54/20)	9.5

ตารางที่ 71 แสดงผลการสำรวจความชุกของการเกิดภาวะออทิซึมในแต่ละประเทศ (ต่อ)

ปีที่ตีพิมพ์ (ค.ศ.)	ผู้แต่ง	ประเทศ	ขนาดกลุ่ม ตัวอย่าง	จำนวนผู้ป่วย ออทิซึม	เกณฑ์วินิจฉัย	อัตราส่วนเพศ (ชาย : หญิง)	ความชุกต่อ 10,000 คน
1992	Fombonne E. and Mazaubrun, C.	France	274,816	154	Clinical-ICD-10 like	2.1 (105/49)	4.9
1992	Wignyosumarto et al	Indonesia	5,120	6	CARS	2.0 (4/2)	11.7
1996	Honda et al	Japan	8,537	18	ICD-10	2.6 (13/5)	21.08
1997	Fombonne et al	France	325,347	174	Clinical-ICD-10 like	1.81 (112/62)	7.2
1997	Webb et al	UK	73,301	53	DSM-III_R	6.57 (46/7)	7.2
1997	Arvidsson et al	Sweden	1,941	9	ICD-10	3.5 (7/2)	46.4
1998	Sponheim, E. and Skjeldal, O.	Norway	65,688	34	ICD-10	2.09 (23/11)	5.2
1999	Taylor et al	UK	490,000	427	ICD-10	-	8.7
1999	Kadesjo et al	Sweden	826	6	DSM-III-R/ICD-10	5.0 (5/1)	72.6
2000	Baird et al	UK	16,235	50	ICD-10	15.7 (47/3)	30.8
2000	Powell et al	UK	25,377	62	Clinical/ICD-10/DSM-IV	-	7.8
2000	Kielinen et al	Finland	152,732	187	ICD-8/ICD-9/ICD-10	4.12 (156/50)	12.2
2001	Bertrand et al	USA	8,896	36	DSM-IV	2.2 (25/11)	40.5
2001	Fombonne et al	UK	10,438	27	DSM-IV/ICD-10	8.0 (24/3)	26.1
2001	Magnusson, P. and Saemundsen, E.	Iceland	43,153	57	Mostly ICD-10	4.2 (46/11)	13.2
2001	Chakrabarti, S. and Fombonne, E.	UK	15,500	26	ICD-10/DSM-IV	3.3 (20/6)	16.8

ตารางที่ 72 แสดงการเปรียบเทียบความถี่แอลลีลของสลิปส์บนยีน *RELN* ในแต่ละเชื้อชาติ

กลุ่มประชากร	rs2299388		rs607755		rs2072403		rs362691		rs2159676		rs362746		rs736707	
	C	T	A	G	C	T	C	G	A	C	A	G	C	T
คนไทย (2011) การศึกษาครั้งนี้	0.274	0.726	0.676	0.324	0.154	0.846	0.200	0.800	0.504	0.496	0.852	0.148	0.464	0.536
คนจีน	0.389	0.611	0.593	0.407	0.136	0.864	0.122	0.878	0.512	0.488	0.800	0.200	0.405	0.595
คนญี่ปุ่น	0.389	0.611	0.552	0.448	0.080	0.920	0.091	0.909	0.553	0.447	0.878	0.122	0.558	0.442
คนยุโรป	0.085	0.915	0.456	0.544	0.050	0.950	0.133	0.867	0.703	0.297	0.975	0.025	0.261	0.739
คนแอฟริกา (Sub-Saharan)	0.033	0.967	0.580	0.402	0.283	0.717	0.083	0.917	0.658	0.342	1.000	0.000	0.487	0.513

ฐานข้อมูลจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> สืบค้นข้อมูล April 5, 2011

ตารางที่ 73 แสดงการเปรียบเทียบความถี่แอลลีลของสโนิปส์บนยีน *MET* ในแต่ละเชื้อชาติ

กลุ่มประชากร	rs1858830		rs38845		rs10243024		rs38859		rs13223756		rs2299349		rs2023748	
	C	G	A	G	A	G	C	T	A	G	G	T	A	G
คนไทย (2011) การศึกษาครั้งนี้	0.298	0.702	0.480	0.520	0.372	0.628	0.556	0.444	0.666	0.334	0.442	0.558	0.454	0.546
คนจีน	-	-	0.390	0.610	0.209	0.791	0.430	0.570	0.802	0.198	0.558	0.442	0.558	0.442
คนญี่ปุ่น	-	-	0.411	0.589	0.262	0.738	0.435	0.565	0.762	0.238	0.560	0.440	0.559	0.441
คนยุโรป	0.500	0.500	0.383	0.617	0.196	0.804	0.531	0.469	0.836	0.164	0.464	0.536	0.465	0.535
คนแอฟริกา (Sub-Saharan)	-	-	0.303	0.697	0.535	0.465	0.987	0.013	0.885	0.115	0.022	0.978	0.013	0.987

ฐานข้อมูลจาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> สืบค้นข้อมูล April 5, 2011

ภาคผนวก ข

25% Ammonium persulfate (1 ml)

APS	0.25	g
Deionized distilled water	1	ml

6% denatured polyacrylamide gel solution

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

2.5 mM 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		

2.5 mM 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		

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

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

Loading dye (for denature gel electrophoresis)

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

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

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

6% Polyacrylamide gel (30 ml)

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

10X TBE (1,000 ml)

Tris base	109.03	g
Boric acid	55.65	g
EDTA	7.45	g
Deionized distilled water up to 1,000 ml, store at room temperature		

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายเชษฐตุพล พูลจันทร์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5010220213	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

กองทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 ทุนหลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
 ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาภายในประเทศ วิทยาเขตหาดใหญ่
 ทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BT-B-01-MG-18-4814)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Chettupon Pooljun, Nichara Ruangdaraganon, Tippawan Hansakunachai, Rawiwan Roongpraiwan, Tasawat Somboontham, Thanya Sripo, Pornprot Limprasert. 2009. Association study of 5'UTR-GGC repeats allele of the *RELN* gene in Thai children with autism spectrum disorders. 4th BUU Grad. Research Conference, March 13, 2009, Burapha University, Chon Buri, Thailand.

Chettupon Pooljun, Tippawan Hansakunachai, Rawiwan Roongpraiwan, Tasawat Somboontham, Nichara Ruangdaraganon, Worathai Maisrikhaw, Thanya Sripo, Pornprot Limprasert. 2009. A highly significant association between the GGC repeat numbers in the *RELN* gene and Thai children with autism spectrum disorder. 25th Faculty of Medicine, Research Conference "A 36-year journey of success in quality and excellence", August 5-7, 2009, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

นำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 4 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรี
วันที่ 13 มีนาคม 2552 ได้รับรางวัลดีเด่น ในการเสนอผลงานแบบปากเปล่า
นำเสนอผลงานวิจัยในงานการประชุมวิชาการประจำปี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ครั้งที่ 25 “36 ปี บนเส้นทางคุณภาพและความ
เป็นเลิศ” วันที่ 7 สิงหาคม 2552 ได้รับรางวัลที่ 2 ในการนำเสนอผลงานแบบ
ปากเปล่า