



การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน β -Neurexin 1 (β -NRXN1) ในเด็กไทย
ที่เป็นออทิสซึมสเปกตรัม

**Mutation Screening of the beta-Neurexin 1 (β -NRXN1) Gene in
Thai Children with Autism Spectrum Disorders (ASD)**

อรฎาวรรณ ปลั่งอ่อน
Oradawan Plong-on

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**

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 (β -NRXN1)

ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

ผู้เขียน

นางสาวอรุณวารรณ ปลั่งอ่อน

สาขาวิชา

ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพต ลิ้มประเสริฐ)

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

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

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

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
โมเลกุลและชีวสารสนเทศ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม
ผู้เขียน	นางสาวอรุณวารณ ปลั่งอ่อน
สาขาวิชา	ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

ออทิซึมสเปคตรัมคือกลุ่มอาการความผิดปกติด้านพัฒนาการระบบประสาท มีความรุนแรงแตกต่างกันใน 3 ด้าน คือ ความผิดปกติด้านปฏิสัมพันธ์กับสังคม ความบกพร่องด้านการสื่อสาร และพฤติกรรมความสนใจแบบจำเพาะซ้ำเติม มีหลักฐานชัดเจนว่าเป็นโรคทางพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับหลายยีนร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ยีน beta-Neurexin 1 เป็นยีนหนึ่งที่น่าคิดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เนื่องจากยีน beta-Neurexin 1 สร้างโปรตีนไซแนปส์ของเซลล์ประสาท จากรายงานการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียน พบร้อยละ 2 (4/203) มีความผิดปกติของยีน beta-Neurexin 1 จำนวน 2 แบบ คือ p.S14L และ p.T40S การศึกษานี้เพื่อหาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมตามเกณฑ์วินิจฉัยของ DSM-IV จำนวน 170 ราย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบผู้ป่วยออทิซึม 1 ราย มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.41C>T (p.S14L) ผู้ป่วยรายนี้มีระดับสติปัญญาต่ำ (ไอคิว = 64 แบบไม่ใช้ภาษาตามเกณฑ์แบบทดสอบของ Stanford Binet Intelligence Scale, 5th edition) แต่ไม่มีความผิดปกติของร่างกาย ประวัติครอบครัวผู้ป่วยมีปู่ทวดและยายทวดของผู้ป่วยเป็นพี่น้องกัน นอกจากนี้พอได้ให้ข้อมูลว่าญาติอย่างน้อย 3 คนมีปัญหาในการเรียนหรือพูดช้ากว่าวัย การเปลี่ยนแปลงนี้ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่ที่ไม่มีอาการ แต่การศึกษาในประชากรไทยปกติ 310 คน ด้วยวิธี PCR-RFLP ไม่พบความผิดปกติดังกล่าว การศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ แสดงว่า p.S14L เป็นการเปลี่ยนแปลงพบได้น้อย แต่อยู่ในบริเวณสำคัญที่เรียกว่า signal peptide domain การเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14 เป็นลิวซีน อาจส่งผลกระทบต่อการไซแนปส์ของเซลล์ประสาท ทำให้มีผลต่อการเกิดภาวะออทิซึม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถตัดสาเหตุจากยีนอื่นๆ เนื่องจากมีการแต่งงานในเครือญาติ ควรมีการศึกษาในระดับโปรตีนต่อไป เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

Thesis Title Mutation Screening of the beta-Neurexin 1 (β -*NRXN1*) Gene in Thai Children with Autism Spectrum Disorders (ASD)

Author Miss Oradawan Plong-on

Major Program Molecular Biology and Bioinformatics

Academic Year 2010

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) is a highly heritable complex neurodevelopmental disorder. ASD is characterized by deficits in social interaction and communication along with restricted and stereotypical patterns of behavior. Beta-Neurexin 1 is one of the candidate genes predisposing to ASD because it produces a protein that acts as a neuronal cell surface presynaptic receptor. A previous study reported 2% of autistic Caucasian patients feature two missense variants (p.S14L and p.T40S) of the beta-Neurexin 1 gene. The current study was undertaken to find the frequency of mutation in the beta-Neurexin 1 gene in 170 Thai children with ASD using direct sequencing. We found one variant, c.41C>T or p.S14L, in a boy with autism which fulfilled the DSM-IV criteria. He also had mild mental retardation (non verbal IQ = 64, Stanford Binet Intelligence Scale, 5th edition) and no abnormal physical examination. His paternal grandfather and maternal grandmother were siblings. The p.S14L variant was found in his mother with no autistic symptoms but was not found in his father. Interestingly, his father reported that there were at least three relatives with a learning problem or speech delay. To determine if the p.S14L variant is present in the general Thai population, we screened 310 healthy Thai controls using PCR-RFLP, but we found only the C allele. This finding is consistent with a previous study suggesting that the p.S14L is a rare variant. The amino acid position 14 is located in the signal peptide domain of the beta-Neurexin 1 protein so the alteration (leucine) may effect the synaptic function leading to ASD susceptibility. However, we cannot exclude other genes since this family is consanguineous. Another study utilizing protein functional analysis may give a more definite conclusion.

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	(7)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
เนื้อเรื่อง	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	31
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	32
วัสดุและอุปกรณ์	32
วิธีดำเนินการ	37
บทที่ 3 ผลการวิจัย	62
บทที่ 4 บทวิจารณ์	89
บทที่ 5 บทสรุป	108
รายการเอกสารอ้างอิง	109
ภาคผนวก	118
ประวัติผู้เขียน	162

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้อง (candidate genes) กับการเกิดภาวะออทิซึม	5
2. แสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์ และ alternative splice site ยีน Neurexin 1	7
3. แสดงความหลากหลายของอาร์เอ็นเอส่งข่าวของยีน Neurexin 1 ที่เกิดจาก alternative splicing รายงานในฐานข้อมูล Ensembl	8
4. แสดงชนิดของยีน Neurexins	9
5. แสดงคู่โปรตีนที่มีหน้าที่ควบคุมชนิดไซแนปส์	20
6. ตารางสรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม ด้วยวิธีการตรวจกรองการกลายพันธุ์	21
7. รายงานความผิดปกติของโครโมโซมบนยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม จากการศึกษาด้วยวิธี Molecular Cytogenetics	24
8. สรุปรายงานการศึกษา CNVs ที่เกี่ยวกับความผิดปกติของยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และผู้ป่วยพัฒนาการล่าช้า	25
9. ตารางสรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน Neuroligins ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และผู้ป่วยภาวะปัญญาอ่อน	27
10. สรุปรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ (Association study) ของยีน Neuroligins กับภาวะออทิซึม	30
11. แสดงจำนวนผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมที่ใช้ในการศึกษา	32
12. แสดงจำนวนกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษานี้	33
13. แสดงไพรเมอร์ที่ใช้พีซีอาร์ตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1	40
14. แสดงองค์ประกอบและสภาวะสำหรับทำพีซีอาร์ตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1	44
15. แสดงสภาวะสำหรับทำพีซีอาร์ตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1	44
16. แสดงส่วนประกอบเจลโพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 6	46
17. แสดงองค์ประกอบพีซีอาร์เพื่อติดฉลากสารเรืองแสง	48
18. แสดงสภาวะการทำพีซีอาร์เพื่อติดฉลากสารเรืองแสง	49

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
19. แสดงองค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสง	49
20. แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	59
21. แสดงองค์ประกอบพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC	60
22. แสดงสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์วิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC	61
23. แสดงจำนวนและลักษณะของผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมในการศึกษา	62
24. สรุปการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน beta-Neurexin 1 ในการศึกษานี้	67
25. แสดงจำนวนผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน หรือการเปลี่ยนแปลงแบบใหม่ในการศึกษานี้	69
26. แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนของยีน beta-Neurexin 1	70
27. แสดงชนิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมในการศึกษานี้	72
28. แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวของผู้ป่วยที่พบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 ที่มีลักษณะคล้ายการกลายพันธุ์	79
29. แสดงผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลงแบบ c.41C>T ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเด็กไทย และกลุ่มควบคุม	84
30. แสดงผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.816G>C ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเด็กไทย และกลุ่มควบคุม	85
31. แสดงผลการตรวจสอบจีโนไทป์การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมเด็กไทย และกลุ่มควบคุม	88
32. แสดงการทำนาย signal peptide ด้าน N-terminal ของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบต่างๆ เปรียบเทียบกับแบบทั่วไปด้วยโปรแกรม SignalP 3.0	94

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
33. เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิก และประวัติครอบครัวของผู้ป่วยออทิซึมที่มี การเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ c.41C>T (p.S14L) ในการศึกษานี้กับการศึกษาของ Feng และคณะ (2006)	98
34. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ชาวไทย เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมประชากรปกติ	103
35. แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนแต่ละโดเมน	124
36. แสดงสนิปส์ของยีน beta-Neurexin 1	127

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. โครงสร้างโปรตีน Neurexin	10
2. แสดงการปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน beta-Neurexins และ Neuroligins บริเวณไซแนปส์	19
3. แสดงสรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมจากการศึกษาก่อนหน้า	26
4. แสดงขอบเขตยีน beta-Neurexin 1 ที่ศึกษา	41
5. แสดงบริเวณการเพิ่มยีน beta-Neurexin 1 ด้วยวิธีพีซีอาร์	42
6. รูปจำลองแสดงผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bsp1286I</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี	57
7. รูปจำลองแสดงผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>DdeI</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี	58
8. แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน beta-Neurexin 1 ที่ตรวจสอบผลด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	63
9. แสดงตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1	68
10. แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ C.41C>T (p.S14L) ของยีน beta-Neurexin 1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	73
11. แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ c.816G>C (p.E272D) ของยีน beta-Neurexin 1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	74
12. แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบสลิปส์ rs13413205, (c.50G>T, p.G17V) ยีน beta-Neurexin 1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	75
13. แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบ c.67-78del4GGC ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์	76
14. แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบ c.64-78del5GGC ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์	77
15. แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบ c.78insGGC ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์	78

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
16. แสดงการถ่ายถอดการเปลี่ยนแปลง c.41C>T (p.S14L) ยีน beta-Neurexin 1 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม TM40-3	80
17. แสดงการถ่ายถอดการเปลี่ยนแปลง c.816G>C (p.E272D) ยีน beta-Neurexin 1 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม AR15-3	81
18. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 14 ของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 กับสิ่งมีชีวิตอื่น	82
19. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 272 ของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 กับสิ่งมีชีวิตอื่น	83
20. แสดงการทดสอบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ c.41C>T (p.S14L) ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี	86
21. แสดงการทดสอบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ c.816G>C (p. E272D) ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี	87
22. แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ยีน beta-Neurexin 1	91
23. แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L เปรียบเทียบกับแบบทั่วไป	93
24. แสดงการทำนาย signal peptide ของลำดับกรดอะมิโนด้าน N-terminal บนสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1	95
25. แสดงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ปลายด้าน N-terminal ของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexins	96
26. แสดงประวัติครอบครัวของผู้ป่วยออทิซึม (TM40-3) ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ p.S14L ในการศึกษา	99
27. แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.E272D เปรียบเทียบกับแบบทั่วไป	101
28. แสดงการทำนายโครงสร้าง hairpin และค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ	106
29. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ที่ระบุตำแหน่งไพรมอร์ และตำแหน่งสนิปส์	119
30. แสดงการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน beta-Neurexin 1	122

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ASD	Autism Spectrum Disorders
APS	Ammonium persulfate
AGP	The Autism Genome Project
AR	Androgen receptor
ARX	Aristaless related hemeobox
BLAST	Basic Local Alignment Search Tools
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
CNVs	Copy Number Variants
Conc.	Concentration
CDS	Coding sequence
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
DMSO	Dimethylsulphoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
mg	Milligram
ml	Milliliter
mM	Milimolar
<i>MECP2</i>	Methyl CpG binding protein 2
M	Molar
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

PDDs	Pervasive Developmental Disorders
PDD-NOS	Pervasive Developmental Disorder-Not Otherwise Specified
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAE	Tris-acetate buffer
TBE	Tris-borate buffer
TE	N, N, N, N-Tetramethyl-Ethylenediamine
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
μ l	Microliiter
μ M	Micromolar

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ออทิสซึม (Autism) คือ กลุ่มอาการที่มีความผิดปกติด้านพัฒนาการระบบประสาท (neurodevelopmental disorder) แสดงลักษณะผิดปกติสามด้านหลักที่มักเกิดก่อนอายุ 3 ปี คือ ความบกพร่องด้านสังคม (impairment in social interaction) ความบกพร่องด้านการสื่อสาร (impairment in communication) และมีพฤติกรรมความสนใจแบบจำเพาะซ้ำเดิม (restricted and repetitive patterns of interest or behavior) ลักษณะออทิสซึมมีอาการมากน้อยแตกต่างกัน ปัจจุบันจึงมักเรียกว่า ออทิสซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorders, ASD) โดยรวมกลุ่มอาการ Pervasive developmental disorders not otherwise specified (PDD-NOS) และกลุ่มอาการแอสเพอร์เกอร์ (Asperger disorder) ซึ่งมีพฤติกรรมคล้ายลักษณะออทิสซึมเข้าไว้ด้วย นอกจากนี้อาจพบภาวะปัญญาอ่อนและอาการชักร่วมด้วยในออทิสซึมบางราย ผู้ป่วยออทิสซึมที่ทราบสาเหตุแน่ชัดพบร้อยละ 10 เกิดจาก (1) ความผิดปกติของยีนเดี่ยว เช่น กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ กลุ่มอาการทูเบอร์สเครอโรซิส และกลุ่มอาการเรตต์ เป็นต้น (2) ความผิดปกติของโครโมโซม (3) การได้รับยาบางชนิดขณะตั้งครรภ์ ออทิสซึมส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากหลายปัจจัย (multifactorial inheritance) เกี่ยวข้องกับหลายยีน (polygenic) และร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีรายงานยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิสซึม หรือ candidate genes จำนวนมาก เช่น *MECP2*, *FMR1*, *RELN*, *MET*, *GABRB3*, *SHANK3*, *SLC6A4*, *CNTNAP2*, *NRXN1*, *NLGN3* และ *NLGN4X* เป็นต้น

ยีน Neurexins และยีน Neuroligins เป็นยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิสซึมที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเซลล์ประสาท ยีนทั้งสองผลิตโปรตีนที่เรียกว่า synaptic cell adhesion molecules พบมากบริเวณพรีไซแนปติก (presynaptic) และโพสต์ไซแนปติก (postsynaptic) การปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างโปรตีน beta-Neurexins และโปรตีน Neuroligins เป็นสัญญาณชักนำให้เกิดกระบวนการไซแนปส์ (synaptogenesis) และมีรายงานความผิดปกติระหว่างอัตราส่วนไซแนปส์ชนิดกระตุ้น (excitatory synapses) และยับยั้ง (inhibitory synapses) ในผู้ป่วยออทิสซึมบางราย การศึกษาทางพันธุกรรมในผู้ป่วยออทิสซึมรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน

Neurexin 1 จำนวน 15 แบบ ประกอบด้วย (1) การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน (missense variants) 9 แบบ (2) ความผิดปกติของโครโมโซม 2 แบบ (3) การเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง splicing 1 แบบ (4) Copy Number Variants (CNVs) 3 แบบ โดยการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยอยู่ในบริเวณ signal peptide ซึ่งเป็นโดเมนสำคัญเกี่ยวกับการลำเลียงโปรตีน (proteins localization) สู่ผิวเซลล์ประสาท นอกจากนี้หลายการศึกษายังพบการกลายพันธุ์ของยีน Neuroligin 3 และ Neuroligin 4X ในผู้ป่วยออทิซึม ผู้ป่วยภาวะปัญญาอ่อน และกลุ่มอาการ PDD-NOS หลายตำแหน่งเช่นกัน โดยการกลายพันธุ์ของยีน Neuroligins บางตำแหน่งมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนสนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าว ทำให้การลำเลียงโปรตีนไปยังผิวเซลล์ขาดประสิทธิภาพ ส่งผลให้การปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน beta-Neurexins ลดลง จนนำไปสู่ความผิดปกติของไซแนปส์ รวมถึงมีรายงานในผู้ป่วยออทิซึมบางรายมีลักษณะทางคลินิกที่สอดคล้องกับอาการที่เกิดจากความบกพร่องของไซแนปส์อีกด้วย เช่น ความบกพร่องในการเรียนรู้และการสื่อสาร ด้วยเหตุนี้ยีนทั้งสองมีความน่าสนใจที่จะได้รับคัดเลือกเป็นยีนคาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึมลำดับต้นๆ ที่ต้องตรวจสอบการกลายพันธุ์ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษานี้เลือกศึกษาเฉพาะยีน beta-Neurexin 1 เพื่อหาความถี่การกลายพันธุ์ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเด็กไทย ด้วยเหตุผลว่าบริเวณเอกซอน 1 ของยีน beta-Neurexin 1 พบการเปลี่ยนแปลง 2 แบบ (p.S14L และ p.T40S) ในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเชียน 4 ราย การเปลี่ยนแปลง p.S14L พบซ้ำในผู้ป่วยออทิซึม 3 ราย และผลการถ่ายทอดในครอบครัวของผู้ป่วย 2 ราย พบการเปลี่ยนแปลง p.S14L ในญาติบางคนที่มีอาการในกลุ่มโรคทางระบบประสาท เช่น แอสเพอร์เกอร์และความบกพร่องในการเรียนรู้ (learning disability) คาดว่า p.S14L น่าจะสัมพันธ์กับภาวะออทิซึม ต่างจากยีน alpha-Neurexin 1 พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 7 แบบ แต่พบตำแหน่งละ 1 ราย อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว นอกจากนี้การศึกษาซ้ำในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อชาติอื่นๆ มีความสำคัญ ถ้าพบการกลายพันธุ์แบบใหม่ หรือแบบเดียวกันจะช่วยสนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 อาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดภาวะออทิซึม

การตรวจเอกสาร

ออทิสซึม

ภาวะออทิสซึม หรือ Autism disorder (OMIM 209850) คือ กลุ่มอาการที่มีความผิดปกติด้านพัฒนาการระบบประสาท จัดอยู่ในกลุ่มความบกพร่องของพัฒนาการแบบรอบด้าน (PDD) ภาวะออทิสซึมมีลักษณะทางคลินิกจากน้อยไปมาก ทำให้มีลักษณะทางคลินิกหลากหลาย ด้วยเหตุนี้ออทิสซึมในปัจจุบันมักเรียกว่า ออทิสซึมสเปกตรัม หรือ Autism Spectrum Disorders โดยรวมกลุ่มอาการแอสเพอร์เกอร์ และ PDD-NOS ที่มีพฤติกรรมคล้ายลักษณะออทิสซึม แต่ไม่ครบถ้วนตามเกณฑ์การวินิจฉัยของสมาคมจิตแพทย์ของประเทศสหรัฐอเมริกา (DSM-IV) เข้าไว้ด้วย ออทิสซึมแสดงลักษณะความผิดปกติ 3 ด้านหลัก (นิชรา เรื่องดารกานนท์ และคณะ 2551) ได้แก่

1) ความผิดปกติด้านการปฏิสัมพันธ์กับสังคม (impairment in social interaction) ได้แก่ ไม่สบตาหรือสบตาน้อย มีความบกพร่องในการใช้ภาษาและการแสดงออกของสีหน้า ขาดความสนใจในการสร้างปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่น หรือไม่เข้าร่วมกิจกรรมกับผู้อื่น

2) ความบกพร่องด้านการสื่อสาร (impairment in communication) เช่น มีพัฒนาการทางภาษาที่ล่าช้า เมื่อเปรียบเทียบกับเด็กวัยเดียวกัน เช่น ยังไม่พูดคำเดียวที่มีความหมายเมื่ออายุ 18 เดือน หรือมีการใช้ภาษาในลักษณะที่แปลกๆ

3) มีพฤติกรรมความสนใจแบบจำเพาะซ้ำเดิม (restricted and repetitive patterns of interest or behavior) ได้แก่ หมุนตัว สะบัดมือ โยกตัว ชอบเรียงวัตถุในแนวเส้นตรง มักสนใจแต่วัตถุที่กำลังหมุน และมีพฤติกรรมทำร้ายตนเอง

โดยลักษณะดังกล่าวมักแสดงก่อน 3 ปี รวมถึงมีภาวะปัญญาอ่อน และอาการชักในผู้ป่วยออทิสซึมบางราย ความชุก (prevalence) ของการเกิดออทิสซึม พบประมาณ 13 ถึง 22 คน ในประชากร 10,000 คน กลุ่มอาการ PDD ทั้งหมด พบประมาณ 60 คนในประชากร 10,000 คน ความถี่เพศชายต่อเพศหญิงเป็นอัตราส่วน 4 ต่อ 1 (Chakrabarti and Fombonne, 2005; Fombonne, 2005) ออทิสซึมที่มีสาเหตุแน่ชัดพบร้อยละ 10 เกิดจาก (1) ความผิดปกติของยีนเดี่ยว เช่น กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ กลุ่มอาการทูเบอร์สเครอโรซิส กลุ่มอาการเรตต์ เป็นต้น (2) ความผิดปกติของโครโมโซม (3) การได้รับยาบางชนิดขณะตั้งครรภ์ ออทิสซึมส่วนใหญ่ ร้อยละ 90 เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากหลายปัจจัยเกี่ยวข้องกับหลายยีน และร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Muhle et al., 2004) การศึกษาในคู่แฝดเพื่อหาอิทธิพลของยีนในโรค

พันธุกรรมที่เกิดจากหลายปัจจัย พบว่าภาวะออทิซึมมีอัตราความเหมือนร่วม (concordance rate) ในแฝดร่วมไข่ (monozygotic twins) ร้อยละ 60–91 แต่ในแฝดต่างไข่ (dizygotic twins) พบเพียงร้อยละ 0-10 (Bailey et al., 1995; Steffenburg et al., 1989) และการศึกษาอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคซ้ำในพี่น้อง (sibling recurrence rate) พบร้อยละ 4.5 (Jorde et al., 1991) การถ่ายทอดพันธุกรรมลักษณะนี้จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงขึ้นในญาติลำดับที่ 1 ดังนั้นออทิซึมส่วนใหญ่จึงไม่มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนเดี่ยวในลักษณะยีนเด่นหรือยีนด้อยที่ชัดเจน แต่เป็นการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับหลายยีนที่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

PDD-NOS คือ กลุ่มอาการที่มีความบกพร่องของพัฒนาการแบบรอบด้าน แต่ไม่ครบตามเกณฑ์การวินิจฉัยออทิซึม เช่น อายุเกิน (เริ่มมีอาการเมื่ออายุมากกว่า 3 ปี) อาการไม่ครบตามจำนวนข้อที่กำหนด ความรุนแรงน้อย และมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่าง เป็นต้น

แอสเพอร์เกอร์ คือ กลุ่มอาการความผิดปกติด้านพัฒนาการที่มีลักษณะคล้ายออทิซึม ในด้านการมีปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและพฤติกรรม มีความสนใจสิ่งใดสิ่งหนึ่งซ้ำๆ แต่พัฒนาการทางด้านภาษาเป็นปกติ และไม่พบความบกพร่องทางระดับสติปัญญา หรือมีความสามารถบางด้านสูงกว่าคนทั่วไป มักเรียกกลุ่มนี้ว่า เด็กออทิซึมที่มีสติปัญญาดี (high functioning Autism) (นิชรา เรื่องดารกานนท์และคณะ 2551)

ยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้อง (Candidate genes) ทำให้เกิดภาวะออทิซึม

การศึกษาโรคพันธุกรรมที่เกิดจากหลายปัจจัย หรือปัจจุบันมักเรียกเป็น complex genetic diseases นิยมใช้การศึกษา functional approach ร่วมกับข้อมูล positional approach ในการค้นหายีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (Grice and Buxbaum, 2006; Klauck, 2006) ในปี ค.ศ. 2007 สถาบัน The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC) รายงานยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึมแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ (1) neuronal development (2) transcription factors (3) brain involvement (4) housekeeping (5) neurotransmitter / CNS involvement การรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมโดย Abrahams และคณะ ปี ค.ศ. 2008 รายงานยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะออทิซึมประมาณ 76 ตำแหน่ง มีเพียง 26 ตำแหน่งที่ทราบรายละเอียดยีน เช่น ยีน *MECP2*, *FMR1*, *RELN*, *MET*, *GABRB3*, *SHANK3*, *SLC6A4*, *CNTNAP2*, *NRXN1*, *NLGN4X*, *NLGN3* เป็นต้น สรุปไว้ในตารางที่ 1

การค้นหา ยีนปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดโรคในผู้ป่วยหลายกลุ่มเชื้อชาติมีความสำคัญ เนื่องจากผู้ป่วยต่างเชื้อชาติมีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม การค้นพบ

การกลายพันธุ์แบบใหม่ หรือแบบเดียวกันในต่างกลุ่มเชื้อชาติ จะช่วยสนับสนุนว่าการกลายพันธุ์นั้นๆ เป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดโรค

งานวิจัยนี้เลือกศึกษายีน Neurexin 1 (*NRXN1*) เพราะเป็นยีนในกลุ่มการพัฒนาเซลล์ประสาท มีหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการเกิดไซแนปส์ที่เป็นกลไกหลักในการพัฒนาสมอง พัฒนาการกระบวนการเรียนรู้ การจดจำ การเคลื่อนไหวและการสื่อสาร และมักพบลักษณะผิดปกติเหล่านี้ในผู้ป่วยออทิซึม (Pardo and Eberhart, 2007)

ตารางที่ 1 แสดงยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้อง (candidate genes) กับการเกิดภาวะออทิซึม

ยีน	ชื่อเต็ม	โครโมโซม
<i>DISC1</i>	Disrupted in schizophrenia 1	1q42
<i>NRXN1</i>	Neurexin 1	2p16
<i>SLC25A12</i>	Solute carrier family 25 (Mitochondrial carrier, Aralar), mem 12	2q24
<i>OXTR</i>	Oxytocin receptor	3p25
<i>GRIK2</i>	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	6q21
<i>AHI1</i>	Abelson helper integration site 1	6q23
<i>RELN</i>	Reelin	7q22
<i>MET</i>	Met proto-oncogene hepatocyte growth factor receptor	7q31
<i>CADPS2</i>	Calcium-dependent secretion activator 2	7q31
<i>CNTNAP2</i>	Contactin associated protein-like 2	7q35-7q36
<i>EN2</i>	Engrailed homeobox 2	7q36
<i>TSC1</i>	Tuberous sclerosis 1	9q34
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog	10q23
<i>DHCR7</i>	7-dehydrocholesterol reductase	11q13
<i>CACNA1C</i>	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	12p13
<i>AVPR1A</i>	Arginine vasopressin receptor	12q14-12q15
<i>UBE3A</i>	Ubiquitin protein ligase E3A	15q11
<i>GABRB3</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta	15q12
<i>TSC2</i>	Tuberous sclerosis 2	16p13
<i>SLC6A4</i>	Solute carrier family 6 member 4	17q11
<i>ITGB3</i>	Integrin, beta 3	17q21
<i>SHANK3</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	22q13
<i>NLGN4X</i>	Neuroigin 4	Xp22
<i>NLGN3</i>	Neuroigin 3	Xq13
<i>FMR1</i>	Fragile X mental retardation 1	Xq27
<i>MECP2</i>	Methyl CpG binding protein 2	Xq28

การกลายพันธุ์ (Mutation) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (Polymorphism)

การกลายพันธุ์ คือการเปลี่ยนแปลงอย่างถาวรของดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ ได้แก่

- 1) การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม เช่น การขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของโครโมโซมทั้งแท่ง
- 2) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เช่น การขาดหาย/เพิ่มขึ้นหรือสลับที่กันในบางส่วนของโครโมโซม
- 3) การเปลี่ยนแปลงขนาดเล็กระดับยีน เช่น การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง (single base substitution หรือ point mutation) แบ่งย่อยได้เป็น 1) synonymous หรือ silent mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน 2) missense mutation คือการกลายพันธุ์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน 3) nonsense mutation คือการเปลี่ยนลำดับเบสเป็นรหัสหยุด (stop codon) นอกจากนี้ยังอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีการเพิ่มขึ้น (insertion) หรือการขาดหายของเบส (deletion) ซึ่งอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบเลื่อนกรอบรหัส (frameshift mutation) ที่อาจมีผลต่อกระบวนการ RNA transcription splicing หรือ RNA processing การกลายพันธุ์ดังกล่าวเหล่านี้ อาจก่อให้เกิดการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันจะมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของการกลายพันธุ์นั้นๆ (กนิษฐา ภัทรกุล และคณะ 2546)

การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (pathogenic mutations) หมายถึงการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน เช่น การกลายพันธุ์บริเวณแปลรหัสโปรตีน (coding sequence, CDS) หรือการกลายพันธุ์บริเวณ intragenic หรือ extragenic ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน โดยส่วนใหญ่เป็นแบบ missense, nonsense และ frameshift ที่เกิดจาก insertions/deletions ที่มักพบบ่อยในบริเวณ CpG และตำแหน่ง tandem repeat ของเอกซอน นอกจากนี้การกลายพันธุ์บริเวณที่ไม่แปลรหัสโปรตีน (noncoding) เช่น intragenic splice site, conserved element และบริเวณโปรโมเตอร์ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน (Strachan and Read, 2004)

ส่วนการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่พบลักษณะปรากฏแตกต่างกันตั้งแต่ 2 ลักษณะขึ้นไป โดยถ้าลักษณะที่พบน้อยมีความถี่มากกว่าร้อยละ 1 ในประชากรปกติ เรียกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism)

ในปัจจุบันการตรวจกรองการกลายพันธุ์ต่างๆที่เป็นสาเหตุของโรคมียุคความสำคัญมาก โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ด้วยการวินิจฉัยก่อนคลอดหรือก่อนเกิดอาการ และการตรวจพาหะของโรค โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing), ไมโครอาร์เรย์ (microarrays), พีซีอาร์ (PCR) และการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) (กนิษฐา ภัทรกุล และคณะ 2546)

ยีน Neurexin 1

ยีน Neurexin 1 เป็นหนึ่งในกลุ่มยีน Neurexins (Neurexin 1, 2 และ 3) มีขนาด 1,112,039 bp ประกอบด้วย 24 เอกซอน เอกซอน 1 ถึง 24 ใช้สังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ไอโซฟอร์ม α -Neurexin 1 ด้วยโปรโมเตอร์ที่อยู่ส่วนต้นของเอกซอน 1 ส่วนเอกซอน 18 ถึง 24 ใช้สังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าวไอโซฟอร์ม β -Neurexin 1 ด้วยโปรโมเตอร์ที่อยู่ส่วนปลายของเอกซอน 17 (ดังแสดงในรูปที่ 3) ยีน Neurexin 1, 2 และ 3 มีกลไกสร้างอาร์เอ็นเอส่งข่าวหลายรูปแบบจากหนึ่งยีน ด้วยกระบวนการปรับแต่งโมเลกุลอาร์เอ็นเอ ที่เรียกว่า อัลเทอร์เนทิฟ สไปลซิง (alternative splicing) ซึ่งประกอบด้วย 5 บริเวณ (ตารางที่ 2) ได้แก่

- (1) splice site 1 (SS1) อยู่ที่เอกซอน 2, 3, 4 และ 5
- (2) splice site 2 (SS2) อยู่ที่เอกซอน 7
- (3) splice site 3 (SS3) อยู่ที่เอกซอน 12 และ 13
- (4) splice site 4 (SS4) อยู่ที่เอกซอน 21
- (5) splice site 5 (SS5) อยู่ที่เอกซอน 23

ด้วยเหตุนี้ทำให้ยีน Neurexin 1, 2 และ 3 สร้างโปรตีนได้มากถึง 1,000 ไอโซฟอร์ม (Missler and Sudhof, 1998; Rowen et al., 2002; Tabuchi et al., 2002) ข้อมูลจากเว็บไซต์ Ensembl รายงานอาร์เอ็นเอส่งข่าวที่แปลรหัสโปรตีนที่สร้างจากยีน Neurexin 1 จำนวน 11 ไอโซฟอร์มแสดงในตารางที่ 3 โดยปัจจุบันข้อมูลจากเว็บไซต์ Ensembl UCSC และ NCBI รายงานโปรตีน β -Neurexin 1 ที่พบส่วนใหญ่มีเพียงรูปแบบเดียว ขนาด 442 กรดอะมิโน (GenBank# NP_620072.1) โดยแปลรหัสจากเอ็มอาร์เอ็นเอส่งข่าว GenBank#NM_138735.2 หรือ ENST00000342183 (Ensembl) ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่ไม่ปรากฏลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอกซอน 21 (SS4)

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์และ alternative splice site ยีน Neurexin 1

ยีน	โปรโมเตอร์	เอกซอน	เอกซอนที่เป็น alternative splice site				
			SS1	SS2	SS3	SS4	SS5
α -Neurexin 1	ส่วนต้นของเอกซอน 1	1-24	2, 3, 4, 5	7	12, 13	21	23
β -Neurexin 1	ส่วนปลายของเอกซอน 17	18-24	-	-	-	21	23

ตารางที่ 3 แสดงความหลากหลายของอาร์เอ็นเอส่งขาวของยีน **Neurexin 1** ที่เกิดจาก **alternative splicing** รายงานในฐานข้อมูล **Ensembl** (สืบค้นเมื่อ 7 กรกฎาคม 2553)

ยีน	ชื่อไอโซฟอร์ม/ Transcript ID	จำนวน เอกซอน	อาร์เอ็นเอส่งขาว (bp)	โปรตีน (AA)
α-Neurexin 1	NRXN1-001 ENST00000406316	22	7,505	1,477
	NRXN1-002 ENST00000404971	24	7,578	1,547
	NRXN1-003 ENST00000401669	23	5,816	1,507
	NRXN1-004 ENST00000405581	6	5,494	278
	NRXN1-015 ENST00000401710	9	3,157	495
	NRXN1-16 ENST00000412315	3	2,227	1,083
	NRXN1-17 ENST00000378262	3	2,028	1,477
	NRXN1-201 ENST00000402717	11	2,508	1,499
	NRXN1-202 ENST00000406859	12	2,553	1,477
	NRXN1-006 ENST00000331040	14	3,044	856
β-Neurexin 1	NRXN1-012 ENST00000342183 (GenBank#NM_138735.2)	6	5,573	442

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของยีน Neurexins

ยีน	ชื่อย่อ	ตำแหน่ง	ขนาดยีน (bp)
Neurexin 1	<i>NRXN1</i>	2p16.3	1,112,039
Neurexin 2	<i>NRXN2</i>	11q13.2	117,052
Neurexin 3	<i>NRXN3</i>	14q24.3-14q31.1	1,691,847

โปรตีน Neurexins

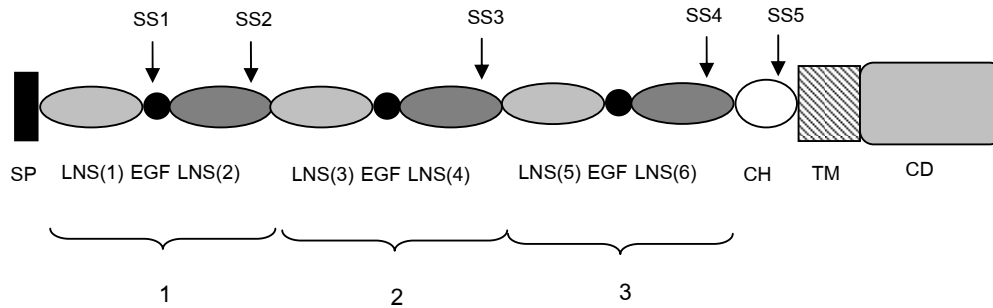
โปรตีน Neurexin 1, 2 และ 3 สร้างจาก 3 ยีน (Neurexin 1, 2 และ 3) แต่ละยีนสร้างโปรตีน 2 ไอโซฟอร์มหลัก คือ alpha-Neurexins และ beta-Neurexins พบมากในสมองของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำหน้าที่เป็น presynaptic cell adhesion molecules อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ประสาทส่วนแอกซอน (axon) โปรตีน alpha-Neurexins แสดงออกทั่วทั้งสมอง ส่วนโปรตีน beta-Neurexins แสดงออกบางพื้นที่ เช่น ชั้นนอกของสมอง cerebral cortex สมองส่วน thalamus และบางส่วนของ hippocampal (Missler and Sudhof, 1998; Ullrich et al., 1995)

โปรตีน alpha-Neurexin 1, 2 และ 3 ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ (1) N-terminal signal peptide (SP) (2) LNS (Laminin, Neurexin, Sex-hormone-binding protein) domain ที่คั่นกลางด้วย EGF (Epidermal Growth-Factor)-link domain 3 ชุด (3) O-glycosylation sequence (CH) (4) transmembrane domain (TM) (5) cytoplasmic domain (CD) รวมถึงมี alternative splice site 5 บริเวณ (SS1-SS5) แสดงดังรูปที่ 1

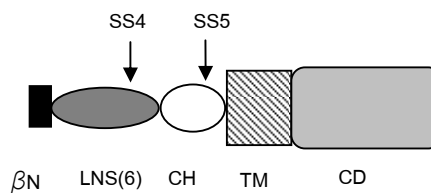
โปรตีน beta-Neurexin 1, 2 และ 3 โครงสร้างคล้ายกับ alpha-Neurexins ต่างกันที่ด้าน N-terminal สันนิษฐานว่า มี N-terminal signal peptide เฉพาะที่เรียกว่า short beta Neurexin specific sequence (β N) ซึ่งประกอบด้วย LNS 1 ชุด, CH, TM และ CD ตามลำดับ โปรตีน beta-Neurexins รวมถึงมี alternative splice site 2 บริเวณ คือ SS4 และ SS5

โปรตีน beta-Neurexin 1 ใช้ LNS domain ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Neuroligins ชักนำไปเกิดกระบวนการไซแนปส์ (Craig and Kang, 2007) แสดงดังรูปที่ 1

alpha - Neurexin



beta - Neurexin



รูปที่ 1 โครงสร้างโปรตีน Neurexin

โปรตีน alpha-Neurexin ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ (1) N-terminal signal peptide (SP) (2) LNS (Laminin, Neurexin, Sex-hormone-binding protein) domain ที่คั่นกลางด้วย EGF (Epidermal Growth Factor)-link domain 3 ชุด (3) O-glycosylation sequence (CH) (4) transmembrane domain (TM) (5) cytoplasmic domain (CD) รวมถึงมี alternative splice site 5 บริเวณ (SS1-SS5) โปรตีน beta-Neurexin มีโครงสร้างคล้ายกับ alpha-Neurexin ต่างกันที่มี Short beta Neurexin specific sequence (β N) แทน N-terminal signal peptide และมี LNS จำนวนน้อยกว่า รวมถึงมี alternative splice site เพียง 2 บริเวณ (SS4 และ SS5) (ดัดแปลงจาก Craig and Kang, 2007)

รายงานความผิดปกติของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ในปี ค.ศ. 2006 Feng และคณะ ตรวจกรองความผิดปกติของยีน beta-Neurexin 1, 2 และ 3 ในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียน 203 ราย พบการเปลี่ยนแปลงเฉพาะยีน beta-Neurexin 1 จำนวน 2 แบบ ได้แก่ c.41C>T (p.S14L) ในผู้ป่วย 3 ราย (ชาย 2 ราย และหญิง 1 ราย) และ c.118A>T (p.T40S) พบในผู้ป่วย 1 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม 535 คน (4/203 vs. 0/535, $P = 0.0056$) การเปลี่ยนแปลงทั้งสองอยู่ในบริเวณ signal peptide ของโปรตีน beta-Neurexin 1 การศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวพบญาติสายตรงของผู้ป่วยบางคนมีความผิดปกติแบบ p.S14L แต่ไม่แสดงลักษณะออทิซึม ซึ่งอาจเกิดจาก incomplete penetrance (Feng et al., 2006) สรุปรายงานความผิดปกติของยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม แสดงดังตารางที่ 6

รายงานความผิดปกติของยีน alpha-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

Kim และคณะ (2008) ตรวจกรองความผิดปกติของยีน alpha-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม 57 ราย และกลุ่มควบคุม 117 ราย ผลการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงของยีนทั้งหมด 9 ตำแหน่ง ได้แก่ แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ c.53T>A (p.L18Q) และ c.2242C>A (p.L748I) แบบไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ c.105C>A, c.912C>T, c.3165C>T, c.3975C>T และ c.4374A>G รวมทั้งพบสนิปส์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลแล้ว 2 ตำแหน่ง โดย p.L18Q พบในผู้ป่วย 1 รายจากทั้งหมด 114 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม 468 คน (1/114 vs 0/468) ส่วน p.L748I พบในผู้ป่วย 1 ราย จากทั้งหมด 114 ราย แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม 476 คน (1/114 vs 0/476) การเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนกรดอะมิโนทั้งสองพบได้น้อยคือ พบในผู้ป่วยเพียง 2 ราย จากทั้งหมด 114 ราย การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดเกิดในบริเวณ signal peptide และ EGF-like domain ของโปรตีน alpha-Neurexin 1 ตามลำดับ และตำแหน่งทั้งสองเป็นกรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ (Kim et al., 2008)

ในปีเดียวกัน Yan และคณะ ตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน alpha-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียน 116 ราย พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ c.23G>C (p.R8P), c.37C>T (p.L13F), c.83G>C (p.G28A), c.1994C>T (p.T665I) และ c.2143G>A (p.E715K) การเปลี่ยนแปลงทั้ง 5 ตำแหน่ง พบได้น้อย เพียง 5 ราย ในผู้ป่วย 116 ราย ส่วน p.G28A พบในกลุ่มควบคุม 1 ราย จากทั้งหมด 192 ราย (5/116 vs. 1/192; $P = 0.03$, Fisher's exact test, one-sided) นอกจากนี้พบการเปลี่ยนแปลงที่ splicing site ในผู้ป่วย 1 ราย คือ c.1024+1G>A แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม

10,000 แอลลีล (pool samples) การเปลี่ยนแปลง p.L13F, p.T665I และ p.E715K อยู่ในบริเวณ signal peptide domain, Laminin G-like 3 และ EGF like 2 ของโปรตีน alpha-Neurexin 1 ตามลำดับ (Yan et al., 2008b) สรุปรายงานความผิดปกติของยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมแสดงดังตารางที่ 6

รายงานความผิดปกติโครโมโซมที่เกี่ยวกับยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม

ปี ค.ศ. 2008 รายงานความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยออทิซึม 2 ราย โดยผู้ป่วยทั้งสองมีความผิดปกติของโครโมโซมแลกเปลี่ยนแบบสมดุล (balance translocation) ผู้ป่วยคนแรกมีคาริโอไทป์แบบ 46,XX,ins(16;2)(q22.1;q16.1p16.3)pat ซึ่งได้รับโครโมโซมผิดปกติจากพ่อ มีจุดแตกหักของยีน Neurexin 1 บริเวณอินทรอน 5 ผู้ป่วยคนที่สองมีคาริโอไทป์แบบ 46,XY,t(1;2)(q31.3;p16.3)dn และพ่อแม่ปกติ มีจุดแตกหักของโครโมโซมห่างจากยีน Neurexin 1 ไปด้าน 5' ประมาณ 750 กิโลเบส แต่ยังไม่ทราบรายละเอียดชัดเจนของจุดแตกหัก สรุปรายงานความผิดปกติโครโมโซมที่เกี่ยวกับยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัมแสดงในตารางที่ 7

รายงานการศึกษา Genome wide scan ที่พบความผิดปกติของยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม

การศึกษาแบบ Genome wide scan เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการค้นหาสาเหตุของโรคทางพันธุกรรมแบบหลายปัจจัย เนื่องจากใช้ตัวอย่างครอบครัวผู้ป่วยจำนวนมาก และให้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ นอกจากนี้สามารถตรวจสอบความผิดปกติได้ทั้งจีโนม โดยการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม เช่น สนิปส์หรือไมโครแซทเทลไลต์

Szatmari และคณะ ปี ค.ศ. 2007 ศึกษา Genome wide scan ในครอบครัวออทิซึม 1,181 ครอบครัว รายงาน CNVs แบบ deletion ขนาด 300 กิโลเบส บนโครโมโซม 2 บริเวณแขนข้างสั้นตำแหน่ง 16 (2p16) ในผู้ป่วยพี่น้องเพศหญิงที่มีพ่อแม่ปกติ โดยตำแหน่งที่ขาดหายเป็นส่วนของยีน Neurexin 1 ต่อมามีการศึกษาที่ให้ผลสอดคล้องกันโดย Marshall และคณะ ปี ค.ศ.2008 โดยศึกษา CNVs ในครอบครัวออทิซึม 427 ครอบครัว พบ CNVs แบบ deletion และ duplication ความถี่สูงในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดส่งผ่านไซแนปส์ จำนวน 3 ยีน ได้แก่ SHANK3, NLGN4X และ NRXN1 รวมถึงพบความผิดปกติในยีนที่เกี่ยวข้องกับ synapse complex อีก 3 ยีน นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบภาวะปัญญาอ่อนที่ไม่ทราบสาเหตุ

100 ราย พบ CNV แบบ deletion 321 กิโลเบส บริเวณเอกซอนของยีน Neurexin 1 เช่นกัน (Friedman et al., 2006) รวมทั้งการศึกษาความผิดปกติของจีโนมด้วยวิธี CGH microarrays ในกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะพัฒนาการล่าช้าทั้งหมด 3,540 ราย พบ deletion ของยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วย 12 ราย ที่มีลักษณะทางคลินิกหลากหลาย ประกอบด้วย ออทิสซึมสเปกตรัม ภาวะปัญญาอ่อน พัฒนาทางภาษาล่าช้า และ hypotonia (Ching et al., 2010) ซึ่งให้เห็นว่า CNVs บนยีน Neurexin 1 อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะออทิสซึมสเปกตรัม สรุปรายงานการศึกษา Genome wide scan ดังแสดงในตารางที่ 8

การกลายพันธุ์ของยีน Neurexins ในโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทอื่นๆ

รายงานการกลายพันธุ์ของยีน Neurexins ในโรคทางระบบประสาทอื่นๆ เช่น โรคจิตเภท (Schizophrenia) และภาวะติดเหล้าหรือติดบุหรี่ ดังนี้ การศึกษา CNVs ในผู้ป่วยจิตเภทชาวยุโรป 2,977 ราย กลุ่มควบคุม 33,746 ราย พบ CNVs ของยีน Neurexin 1 แบบ deletion และ duplication ความถี่ร้อยละ 0.47 ของผู้ป่วย แต่พบในกลุ่มควบคุมเพียงร้อยละ 0.15 อย่างไรก็ตามไม่มีความผิดปกติของยีน Neurexin 2 และ Neurexin 3 ในผู้ป่วยจิตเภท 2,977 ราย การรวบรวมข้อมูลจาก 7 งานวิจัย โดย Kirov และคณะ รายงานว่า deletion ของยีน Neurexin 1 ขนาดมากกว่า 100 กิโลเบส สัมพันธ์กับการเกิดโรคจิตเภท (cases 17/8,798 vs controls 17/42,054, $P=0.000013$) (Kirov et al., 2009)

การศึกษาความสัมพันธ์ พบสไนป์ส 2 ตำแหน่ง บนยีน alpha-Neurexin 1 ได้แก่ rs2193225 และ rs6721498 เกี่ยวข้องกับภาวะติดบุหรี่ของชาวยุโรป และชาวอเมริกัน-แอฟริกัน โดยศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย 602 ครอบครัว (Nussbaum et al., 2008) รวมทั้งรายงานจากญี่ปุ่นพบว่าสไนป์สทั้งสองสัมพันธ์กับภาวะติดบุหรี่ในผู้สูงอายุชาวญี่ปุ่นเช่นกัน (Sato et al., 2010) นอกจากนี้มีรายงานสไนป์สบนยีน alpha-Neurexin 3 สัมพันธ์กับการเกิดโรคติดเหล้า (Hishimoto et al., 2007) การกลายพันธุ์ของยีน Neurexins ในโรคทางระบบประสาทอื่นๆ เป็นข้อมูลสนับสนุนว่ายีนดังกล่าวมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการไซแนปส์ที่เป็นกลไกหลักในการทำงานของระบบประสาท ดังนั้นเมื่อเกิดความผิดปกติของยีนดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางระบบประสาท

รายงานการกลายพันธุ์ของยีน *Neuroligins* ในผู้ป่วยออทิซึม

ยีน *Neuroligins* (*NLGNs*) ผลิตโปรตีนที่เรียกว่า synaptic cell adhesion molecules พบมากบริเวณโพสไซแนปติก ทำงานร่วมกับโปรตีน beta-Neurexins ชักนำให้เกิดกระบวนการไซแนปส์ การศึกษาก่อนหน้ารายงานการกลายพันธุ์ยีน *Neuroligins* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมหลายแบบดังนี้

Jamain และคณะ ปี ค.ศ. 2003 ตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *NLGNs* ในครอบครัวออทิซึมชาวสวีเดน 122 ครอบครัว และพี่น้องออทิซึม 36 คู่ พบการกลายพันธุ์ของยีน *NLGNs* ใน 2 ครอบครัว ได้แก่ กลายพันธุ์ของยีน *NLGN4X* แบบเลื่อนกรอบแปลรหัสที่มีเบส T แทนที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1186 (c.1186insT) พบในพี่น้องออทิซึมเพศชาย การกลายพันธุ์นี้ทำให้สังเคราะห์โปรตีนสั้นลง เนื่องจากเกิดรหัสหยุดในลำดับกรดอะมิโนที่ 396 (p.D396X) ส่วนอีกครอบครัวเป็นพี่น้องออทิซึมเพศชายเช่นกัน พบกลายพันธุ์ของยีน *NLGN3* แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ลำดับที่ 451 (p.R451C) เปลี่ยนจากกรดอะมิโนอาร์จินีนเป็นซิสเตอีน ส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน *Neuroligins* (Jamain et al., 2003)

ต่อมา Laumonier และคณะ รายงานการกลายพันธุ์ของยีน *NLGN4X* แบบเลื่อนกรอบแปลรหัสที่เกิด deletion ของนิวคลีโอไทด์ 2 เบส (c.1253delAG) พบในครอบครัวขนาดใหญ่ชาวฝรั่งเศส ครอบครัวนี้มีผู้ป่วยทั้งหมดเป็นเพศชายจำนวน 13 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยภาวะปัญญาอ่อน 10 ราย (เสียชีวิตแล้ว 1 ราย) กลุ่มอาการ PDD 1 ราย และออทิซึม 2 ราย ผู้ป่วยทุกคนมีการกลายพันธุ์แบบเลื่อนกรอบแปลรหัส c.1253delAG แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้ในกลุ่มควบคุมเพศชาย 200 คน การกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดรหัสหยุดในลำดับกรดอะมิโนที่ 429 (p.E429X) ส่งผลให้โปรตีนบริเวณ transmembrane domain ขนาดสั้นลง (โปรตีนปกติขนาด 816 กรดอะมิโน) ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญต่อการเกิด dimerization ที่จำเป็นต่อการจับกับโปรตีน beta-Neurexins (Laumonier et al., 2004)

ส่วนการศึกษาในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียนจำนวน 148 ราย พบการกลายพันธุ์ของยีน *NLGN4X* แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนในผู้ป่วยออทิซึม 4 ราย ดังนี้ p.G99S, p.K378R, p.V403M และ p.R704C มีความถี่กลายพันธุ์ประมาณร้อยละ 3 (4/148 vs 0/336, $P = 0.009$) แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม 336 คน รวมถึงไม่พบการกลายพันธุ์นี้ในผู้ป่วยโรคทางระบบประสาทอื่นๆ เช่น โรคสมาธิสั้นและซน และโรค Bipolar disorder (Yan et al., 2005)

ต่อมา Ylisaukko-oja และคณะ ปี ค.ศ. 2005 ตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน *NLGNs* ในผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 30 ราย พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน *NLGN1* แบบไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ c.1482G>A (p.K494K, rs7646919) และ

c.2454C>T (p.P818P) การเปลี่ยนแปลงในอินทรอน และ 5'UTR จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ c.492+67A>G, c.493-45A>G (rs3853390), c.1771-45A>G, c.-24C>T และพบการเปลี่ยนแปลงของยีน *NLGN3* แบบไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน คือ c.222C>T (Y74Y) (Ylisaukko-oja et al., 2005)

ปี ค.ศ. 2008 Yan และคณะ ตรวจสอบการกลายพันธุ์ยีน *NLGN4Y* บนโครโมโซมวายในผู้ป่วยชายที่มีภาวะออทิซึมหรือภาวะปัญญาอ่อนจำนวน 335 ราย พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน คือ p.I679V แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุมจำนวน 2,986 คน และมีรายงานว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง 679 เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ (Yan et al., 2008a)

การศึกษาการทำหน้าที่ของโปรตีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์ 3 แบบ ได้แก่ การกลายพันธุ์ของยีน *NLGN4X* แบบ c.1186insT ทำให้โปรตีนสั้นลงเหลือ 396 กรดอะมิโน (p.D396X) และการกลายพันธุ์ของยีน *NLGN3* ของยีน *NLGN3* แบบ p.R451C การกลายพันธุ์ทั้งสองแบบทำให้โปรตีน Neuroligins ผิดปกติกระทบต่อการลำเลียงไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ คงค้างอยู่ภายใน endoplasmic reticulum ส่งผลให้การก่อรูปร่างของไซแนปส์ลดลง (Chih et al., 2004; De Jaco et al., 2006) และการศึกษาของ Yamakawa และคณะ ปี ค.ศ.2007 รายงานว่าการกลายพันธุ์ของยีน *NLGN4X* ตำแหน่ง p.R704C ทำให้โปรตีน Neuroigin 4 ยึดเกาะกับไซแนปส์โปรตีน Syntrophin ลดลง ส่วนการกลายพันธุ์ของยีน *NLGN3*, *NLGN4X* และ *NLGN4Y* ที่มีกรดขาดหายด้านปลาย C บริเวณ PDZ binding motif (PBM) ขาดหาย ส่งผลให้โปรตีน Neuroligins ไม่สามารถยึดเกาะกับโปรตีน Syntrophin ได้ (Yamakawa et al., 2007) โปรตีน Neuroligins และ Neurexins สร้างโปรตีนหลายไอโซฟอร์มด้วยกระบวนการ alternative splicing ทำให้เกิดหน้าที่จำเพาะในเซลล์ประสาทแต่ละชนิด ดังนั้นความผิดปกติที่เกิดจากกระบวนการ alternative splicing อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้โปรตีน Neuroligins และ Neurexins ผิดปกติจนนำไปสู่ความบกพร่องของไซแนปส์ได้เช่นกัน ปี ค.ศ. 2006 Talebizadeh และคณะ ศึกษาความหลากหลายของ cDNA จากอาร์เอ็นเอส่งขาวของยีน *NLGN3* และ *NLGN4X* ในเด็กผู้หญิงออทิซึม 10 ราย และกลุ่มคนปกติ 30 คน พบว่า cDNA ของยีน *NLGN4X* ในผู้หญิงออทิซึมหนึ่งคน ขาดเอกซอน 4 และพบการแสดงออกแบบแอลลีลเดียวของยีน *NLGN4X* ในผู้ป่วยออทิซึมจำนวน 11 ราย จากทั้งหมด 14 ราย รวมถึงผู้ป่วยออทิซึม 9 ราย มี cDNA ของยีน *NLGN3* ไอโซฟอร์มสองแบบรวมกัน คือ แบบมีเอกซอน 7 และไม่มีเอกซอน 7 ผลการตรวจ cDNA ในพ่อแม่ พบ cDNA ไอโซฟอร์มเดียว คือมีเอกซอน 7 การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การขาดหายบางเอกซอน อาจทำให้โปรตีนขาดกรดอะมิโนบางส่วนที่สำคัญต่อการขตรวมตัว ส่งผลให้โปรตีนทำงานไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนปกติ ด้วยเหตุผลนี้อาจเป็นสาเหตุของภาวะออทิซึมเพราะโปรตีน Neuroligins มีหน้าที่สำคัญในการเกิดไซแนปส์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา

ของประสาท (Talebizadeh et al., 2006) สรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงยีน Neuroligins ดังแสดงในตารางที่ 9

การศึกษาแบบ family-based association study ในออทิสซึมชาวฟินแลนด์ 100 ครอบครัว พบความหลากหลายทางพันธุกรรม 3 ตำแหน่ง สัมพันธ์กับภาวะออทิสซึม ได้แก่ สนิปส์ rs1488545 บนยีน *NLGN1* ไมโครแซทเทลไลต์ *DXS7132* บนยีน *NLGN3* และไมโครแซทเทลไลต์ *DXS996* บนยีน *NLGN4X* (Ylisaukko-oja et al., 2005) สรุปรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน Neuroligins กับภาวะออทิสซึม แสดงในตารางที่ 10

อย่างไรก็ตามรายงานอย่างน้อย 4 การศึกษาที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *NLGNs* ในผู้ป่วยออทิสซึม ได้แก่ การศึกษาผู้ป่วยออทิสซึมจากเมืองควิเบค 96 ราย (Gauthier et al., 2005) ผู้ป่วยออทิสซึมจากโตรอนโตประเทศแคนาดา 196 ราย (Vincent et al., 2004) ผู้ป่วยออทิสซึม 124 ราย จากสถาบัน An International Molecular Genetic Study of Autism (Blasi et al., 2006) และการศึกษาในผู้ป่วยแอสเพอร์เกอร์จำนวน 107 ราย (Wermter et al., 2008) รวมถึงรายงานอย่างน้อยหนึ่งครอบครัวที่มี deletion ของยีน *NLGN4* แต่ผู้ป่วยไม่มีอาการที่สัมพันธ์กับภาวะออทิสซึม (Macarov et al., 2007) ผลการศึกษาที่แตกต่างกันข้างต้นชี้ให้เห็นว่า การทำงานบกพร่องของไซแนปส์น่าจะเกิดจากความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไซแนปส์มากกว่าหนึ่งยีน หรือความผิดปกติจากหลายยีนร่วมกัน

ข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน *Neurexin 1* และ *Neuroligins* ข้างต้นมีความน่าเชื่อถือ เพราะรายงานจากการศึกษาหลายวิธี เช่น การศึกษา Genome wide scan การศึกษา Molecular cytogenetics และการศึกษา Mutation screening ทุกวิธีให้ผลไปในทางเดียวกัน คือ พบผู้ป่วยออทิสซึมบางรายมีความผิดปกติของยีน *Neurexin 1* และ *Neuroligins* รวมทั้งการกลายพันธุ์บางแบบมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่สนับสนุนว่ากลายพันธุ์ส่งผลให้ไซแนปส์ทำงานผิดปกติ ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดภาวะออทิสซึม

การศึกษาหน้าที่ของโปรตีน Neurexins

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน alpha-Neurexin 1 ทั้งหมดข้างต้น ยังไม่มีการศึกษาผลกระทบในระดับโปรตีน มีเพียงการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน Neurexins ต่อกระบวนการไซแนปส์ในสัตว์ทดลองดังนี้

การ knock out ยีน alpha-Neurexins (จำนวนหนึ่งยีนหรือมากกว่า) ในหนูทดลอง ทำให้ทราบว่าโปรตีน alpha-Neurexin จำเป็นต่อกระบวนการหลังสารสื่อประสาท โดยการขาดยีน alpha-Neurexins ส่งผลให้ synaptic calcium channel ทำงานบกพร่อง ซึ่งให้เห็นว่ามีการทำงานประสานกันระหว่าง synaptic cell adhesion และ pre-synaptic voltage-gated calcium signaling คาดว่าโปรตีน alpha-Neurexins ทำงานควบคู่กับ calcium channels โดยมีหน้าที่จัดระบบปลายพรีไซแนปติก และควบคุมการหลังสารสื่อประสาทให้เป็นปกติ (Missler et al., 2003) และการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนที่เกิดจากขาดหายของยีน alpha-Neurexins โดย Dudanova และคณะ ปี ค.ศ. 2007 รายงานว่าหนูที่ถูก knock out ยีน alpha-Neurexins จำนวน 2 ใน 3 ยีน มีลักษณะพื้นที่ระหว่างตัวเซลล์ประสาท (neuropil area) ลดลงประมาณร้อยละ 20 ในหลายพื้นที่ของสมอง และทำให้กิ่งของเดนไดรต์สั้นลง รวมถึง spine มีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามพบว่าโครงสร้างของไซแนปส์ชนิดกระตุ้นและชนิดยับยั้งยังเป็นปกติ แต่ความหนาแน่นของไซแนปส์ชนิดยับยั้งลดลงประมาณร้อยละ 30 ในสมองส่วน neocortex ซึ่งให้เห็นว่า alpha-Neurexins ไม่จำเป็นต่อการก่อรูปร่างไซแนปส์ แต่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำหน้าที่ของไซแนปส์มากกว่า (Dudanova et al., 2007)

โปรตีน beta-Neurexins และกระบวนการเกิดไซแนปส์

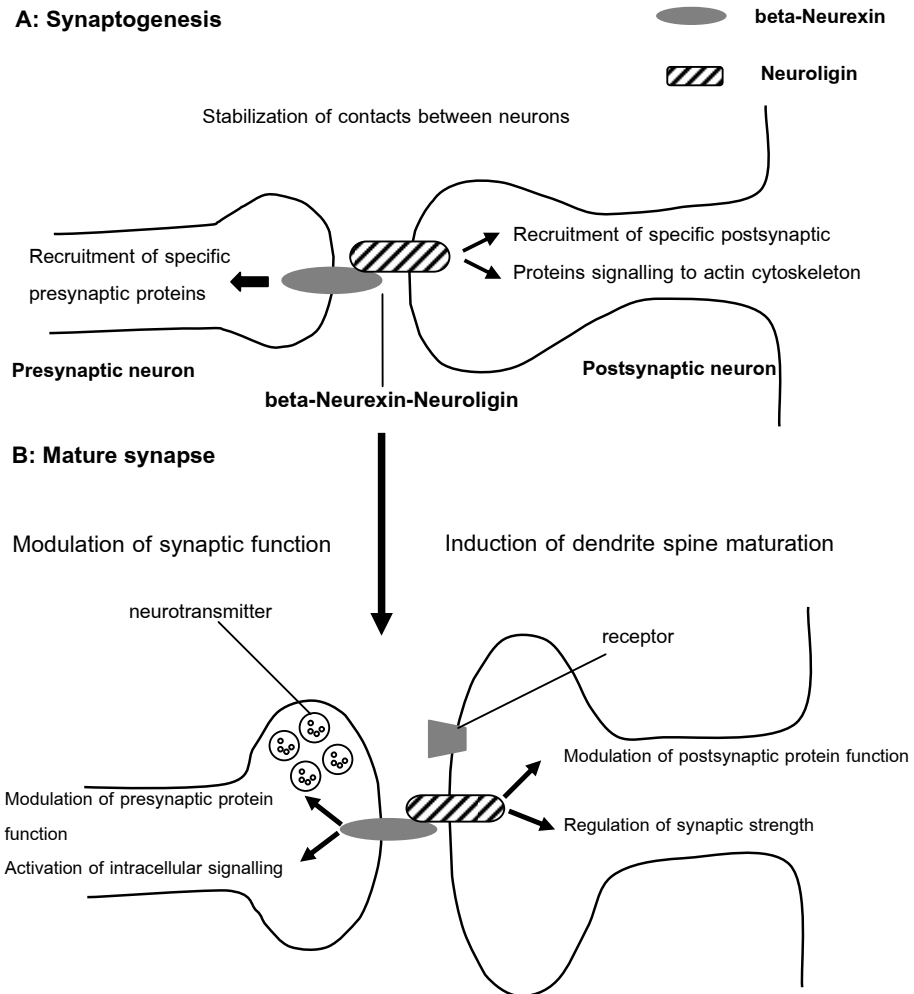
การพัฒนาของสมองและการทำงานของระบบประสาทใช้ไซแนปส์ในการส่งผ่านข้อมูลข่าวสารระหว่างเซลล์ประสาท ทำให้เกิดเป็นวงจรกระแสประสาท นำไปสู่กระบวนการเรียนรู้จดจำ การเคลื่อนไหว และการสื่อสาร ซึ่งมักพบความผิดปกติดังกล่าวในผู้ป่วยออทิซึม การทำงานของไซแนปส์มี 2 ชนิด ได้แก่ ไซแนปส์ชนิดกระตุ้น (excitation synapse) และไซแนปส์ชนิดยับยั้ง (inhibition synapse) โดยความสมดุลของไซแนปส์ทั้งสองชนิดจำเป็นต่อการพัฒนาระบบประสาทส่วนกลางให้เป็นปกติ นอกจากนี้มีรายงานความไม่สมดุลของไซแนปส์ชนิดกระตุ้นและยับยั้งในออทิซึมบางกลุ่ม (Cline, 2005; Rubenstein and Merzenich, 2003)

โปรตีน Neurexins และ Neuroligins พบมากที่ตำแหน่งไซแนปส์ภายในเซลล์ประสาทบริเวณพรีไซแนปติก (ส่วน axons) และโพสต์ไซแนปติก (ส่วน dendrites) ตามลำดับ

โปรตีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างโครงสร้างพรีไซแนปติก และโพสต์ไซแนปติก นำไปสู่กระบวนการเกิดไซแนปส์ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (1) การก่อรูปร่าง (formation) (2) การเติบโตเต็มที่ (maturation) (3) การทำหน้าที่ (function) (4) การเปลี่ยนรูปร่างของไซแนปส์ (plasticity) ในขั้นตอนการก่อรูปร่างไซแนปส์ มีการรวมกลุ่มโปรตีนอย่างเป็นระบบที่ประกอบด้วยโปรตีน 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) receptors 2) signaling molecules (การปฏิสัมพันธ์ระหว่าง synaptic adhesion molecules) 3) กลุ่มโปรตีน Scaffolding โดยกระบวนการเกิดไซแนปส์ชักนำโดยการจับกันระหว่างโปรตีน beta-Neurexins และโปรตีน Neuroligins และอาศัยแคลเซียมไอออนในการเกิดปฏิกิริยา การปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองกลายเป็นสัญญาณต่อเนื่อง (signaling cascades) ชักนำให้เกิดการก่อรูปร่างไซแนปส์ และไปกระตุ้นให้ไซแนปส์โปรตีนอื่นๆ มารวมตัวที่ตำแหน่งไซแนปส์ทั้งสองด้านจนเกิดเป็นโครงสร้างไซแนปส์ที่เจริญเต็มที่พร้อมที่จะทำหน้าที่หลังสารสื่อประสาท (Dalva et al., 2007; Ichtchenko et al., 1995; Nguyen and Sudhof, 1997) (ดังแสดงในรูปที่ 2)

ชนิดของไซแนปส์ (กระตุ้นหรือยับยั้ง) ถูกควบคุมด้วยคู่โปรตีน Neurexins-Neuroligins ที่ต่างไอโซฟอร์มกัน

ไอโซฟอร์มที่หลากหลายของโปรตีน Neurexins และ Neuroligins เกิดจากกระบวนการ alternative splicing โดย alternative splice site ตำแหน่ง SS4 ของโปรตีน beta-Neurexins และตำแหน่ง SSB ของโปรตีน Neuroligins มีบทบาทสำคัญในการควบคุมชนิดของไซแนปส์ โปรตีน Neurexins มี SS4 อยู่ในตำแหน่งเอกซอน 21 แพลรหัสเป็นกรดอะมิโน 30 ตัว ส่วน SSB แพลรหัสเป็นกรดอะมิโน 9 ตัว โดยไซแนปส์ชนิดกระตุ้นเกิดจากการทำงานของโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่ขาด SS4 (-SS4) จับกับโปรตีน Neuroligin 1, 3 และ 4 ทำให้เกิดการชักนำโปรตีน Neuroligin 1, 3 และ 4 มารวมตัวที่โพสต์ไซแนปติกเพิ่มมากขึ้น จนเกิดเป็นไซแนปส์ชนิดกระตุ้น แต่เมื่อโปรตีน beta-Neurexins ที่มี SS4 (+SS4) ปรากฏขึ้น จะส่งผลให้การจับกับโปรตีน Neuroligin 1 ลดลง เป็นสัญญาณให้ลดการรวมกลุ่มของโปรตีน Neuroligin 1, 3 และ 4 แต่จะมีโปรตีน Neuroligin 2 ปรากฏขึ้น และสามารถจับกับโปรตีน beta-Neurexins ที่มี SS4 (+SS4) ได้เป็นอย่างดี จนชักนำให้เกิดไซแนปส์ชนิดยับยั้ง สรุปว่าการมีตำแหน่ง +SS4 ในโปรตีน beta-Neurexins สนับสนุนให้เกิดการทำหน้าที่ไซแนปส์ชนิดยับยั้ง ส่วนโปรตีน Neuroligin 1 ที่มี SSB (+SSB) กระตุ้นให้เกิดการทำหน้าที่ไซแนปส์ชนิดกระตุ้น (Boucard et al., 2005; Craig and Kang, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 2 แสดงการปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน **beta-Neurexins** และ **Neuroigins** บริเวณไซแนปส์ (A) ไซแนปส์ คือ บริเวณที่มีเชื่อมต่อกันของปลายเซลล์ประสาท axon และแขนงประสาท dendrite โดยการจับกันระหว่างโปรตีน beta-Neurexins และ Neuroigins เป็นสัญญาณชักนำให้ไซแนปส์โปรตีนอื่นๆ (เช่นโปรตีน receptor และ scaffolding) มารวมตัวทั้งสองด้านเกิดเป็นโครงสร้างฟรี้ไซแนปติกและโพสดีไซแนปติก โดยมีการชักนำ actin cytoskeleton ทำให้เกิดการยืดขยายออกของ dendrite เรียกว่า dendrite spine (B) เมื่อโครงสร้างไซแนปส์เจริญเต็มที่พร้อมที่จะทำงาน โปรตีน beta-Neurexins และ Neuroigins ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์มีการปฏิสัมพันธ์กับ channels และไซแนปส์โปรตีนอื่นๆ กระตุ้นให้เกิดการทำงานของไซแนปส์ นอกจากนี้ยังชักนำให้เกิดการเพิ่มหรือลดปริมาณไซแนปส์ได้อีกด้วย (ดัดแปลงจาก Dalva et al., 2007)

ตารางที่ 5 แสดงคู่โปรตีนที่มีหน้าที่ควบคุมชนิดไซแนปส์

โปรตีนไซแนปส์		ชนิดไซแนปส์
beta-Neurexins (+SS4) (มี SS4 หรือเอกซอน 21, 30 กรดอะมิโน)	Neuroigin 2 (-SSB) (ไม่มี SSB หรือ ขาด 9 กรดอะมิโน)	ยับยั้ง
beta-Neurexins (-SS4) (ไม่มี SS4 หรือไม่มีเอกซอน 21, ขาด 30 กรดอะมิโน)	Neuroigin 1, 3, 4 (+SSB) (มี SSB , 9 กรดอะมิโน)	กระตุ้น

ออทิซึมและความไม่สมดุลระหว่างไซแนปส์ชนิดกระตุ้นและยับยั้ง (E/I ratio)

กลุ่มอาการออทิซึมมีลักษณะทางคลินิกที่หลากหลายและอาการร่วมที่พบได้บ่อย ได้แก่ ภาวะปัญญาอ่อน ประมาณร้อยละ 70 และอาการชักประมาณร้อยละ 30 มีรายงานว่ากลุ่มความผิดปกติของพัฒนาการระบบประสาท เช่น กลุ่มอาการชักและภาวะออทิซึม มักพบความไม่สมดุลระหว่างอัตราของไซแนปส์ชนิดกระตุ้นและชนิดยับยั้ง (E/I ration) การกวดการทำงานของระบบประสาทชนิดยับยั้ง (GABAergic) เป็นสาเหตุของการเกิดอาการ hyperexcitability ที่มักพบได้บ่อยในผู้ป่วยออทิซึม (Rubenstein and Merzenich, 2003) ผลการศึกษาพบว่าการหยุดการทำงานของโปรตีน Neuroligins ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของสมดุลระหว่างไซแนปส์ชนิดกระตุ้นและชนิดยับยั้ง ซึ่งส่วนใหญ่ความผิดปกติเกิดจากการสูญเสียไซแนปส์ชนิดยับยั้งมากกว่าสูญเสียชนิดกระตุ้น (Chih et al., 2005) ดังนั้นความผิดปกติของโปรตีน Neurexins และ Neuroligins อาจทำลายการก่อรูปร่างและความมีเสถียรภาพของไซแนปส์ รวมถึงทำให้เกิดความไม่สมดุลชนิดของไซแนปส์

ตารางที่ 6 ตารางสรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน **Neurexin 1** ในผู้ป่วยออทิซึม ด้วยวิธีการตรวจกรองการกลายพันธุ์

ยีน	การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนกรดอะมิโน	ลักษณะหรือโดเมนที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
beta-Neurexin 1	c.41C>T	p.S14L	signal peptide	3 ราย	<p>1) ไม่พบในคนปกติ 535 คน</p> <p>2) รายที่ 1: (#8139) -พ่อเป็นเฮเทอโรไซกัส c.41C>T เก่งคณิตศาสตร์ -น้องสาวเป็นเฮเทอโรไซกัส c.41C>T มีภาวะแอสเพอร์เกอร์ -แม่เป็นปกติ แต่พูดติดอ่างตอนเด็ก และมีประวัติครอบครัวฝ่ายพ่อมีปัญหาทางการเรียนรู้</p> <p>รายที่ 2: (#15107) -พี่ชายเป็นเฮเทอโรไซกัส c.41C>T มีปัญหาทางการเรียนรู้ และ hyperactivity -พ่อเป็นเฮเทอโรไซกัส c.41C>T มีลักษณะ hyperactivity -พี่ชายเป็นปกติ (เรียนกฎหมาย) -แม่เป็นปกติ แต่มีประวัติครอบครัวมีภาวะปัญญาอ่อน</p> <p>รายที่ 3: ไม่มีข้อมูล</p> <p>3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน</p>	ยังสรุปไม่ได้	ออทิซึม คอเคเซียน 203 ราย	Feng et al., 2006 GenBank# NM_004801.2

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ยีน	การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนกรดอะมิโน	ลักษณะหรือโดเมนที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
beta-Neurexin 1	c.118A>T	p.T40S	signal peptide	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 535 คน 2) -น้องสาวที่ปกติเป็นเฮเทอโรไซกัส c.118A>T -พบในแม่เป็นเฮเทอโรไซกัส c.118A>T มีปัญหาด้านการเรียนรู้และมีภาวะซึมเศร้า 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังไม่สรุป	ออทิซึม ชาวคอเคเชียน 203 ราย	Feng et al., 2006
alpha-Neurexin1	c.23G>C	p.R8P	signal peptide	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 10,000 แอลลีล (gene pool analysis) 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังไม่สรุป	ออทิซึม ชาวคอเคเชียน	Yan et al., 2008b
alpha-Neurexin 1	c.37C>T	p.L13F	signal peptide	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 10,000 แอลลีล (gene pool analysis) 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังไม่สรุป	116 ราย	
alpha-Neurexin 1	c.83G>C	p.G28A	signal peptide	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 10,000 แอลลีล (gene pool analysis) 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังไม่สรุป		
alpha-Neurexin 1	c.1994C>T	p.T665I	lamininG-like 3	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 10,000 แอลลีล (gene pool analysis) 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังไม่สรุป		

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ยีน	การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนกรดอะมิโน	ลักษณะหรือโดเมนที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	อ้างอิง
alpha-Neurexin 1	c.2143G>A	p.E715K	EFG-like 2	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 10,000 แอลลีล (gene pool analysis) 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังสรุปไม่ได้	ออทิซึม คอเคเซียน 116 ราย	Yan et al., 2008b
alpha-Neurexin 1	c.53T>A	p.L18Q	signal peptide	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 468 แอลลีล 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังสรุปไม่ได้	ออทิซึม คอเคเซียน 57 ราย	Kim et al., 2008 GenBank# EF539882 หรือ NM_001135659 .1
alpha-Neurexin 1	c.2242C>A	p.L748I	laminin G-like 4	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 476 แอลลีล 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังสรุปไม่ได้		
alpha-Neurexin 1	ตำแหน่ง splicing c.1024+1G>A อินทรอน 4	-	-	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 10,000 แอลลีล (gene pool analysis) 2) ไม่มีการศึกษาในครอบครัว 3) ไม่มีการศึกษาหน้าที่โปรตีน	ยังสรุปไม่ได้	ออทิซึม คอเคเซียน 116 ราย	Yan et al., 2008b

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ยีน	การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนกรดอะมิโน	ลักษณะหรือโดเมนที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	อ้างอิง
alpha-Neurexin 1	c.105C>A c.912C>T c.3165C>T c.3975C>T c.4374A>G	-	-	1 ราย 1 ราย 1 ราย 1 ราย 1 ราย	1) ทุกตำแหน่งไม่พบในคนปกติ 462 แอลลีล	ความหลากหลายทางพันธุกรรม	ออทิซึม คอเคเซียน 57 ราย	Kim et al., 2008

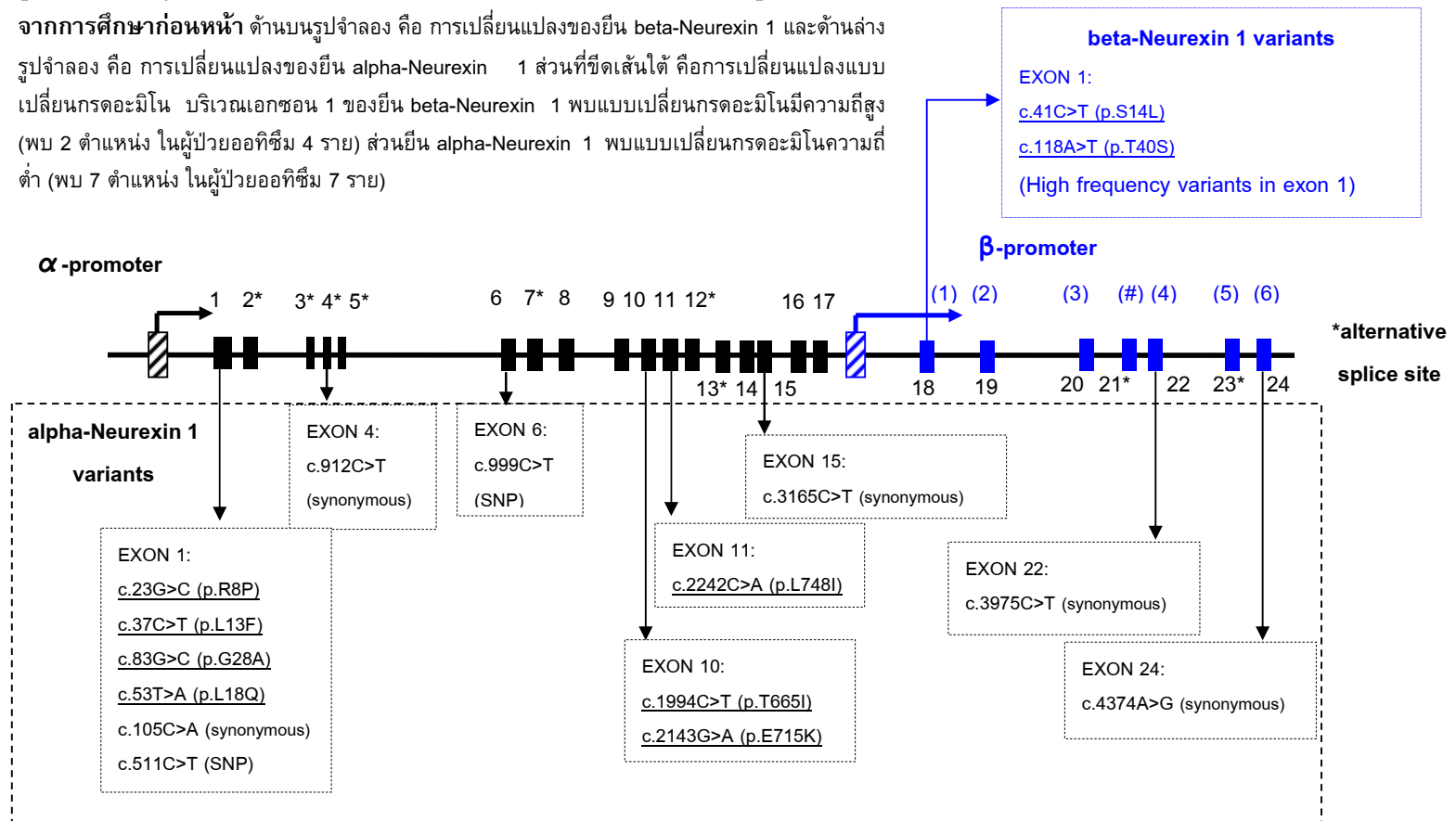
ตารางที่ 7 รายงานความผิดปกติของโครโมโซมบนยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม จากการศึกษาด้วยวิธี Molecular Cytogenetics

ยีน	ความผิดปกติโครโมโซม	คาริโอไทป์	จำนวน	ลักษณะของยีน	อ้างอิง
alpha-Neurexin 1	balanced chromosomal abnormality involving 2p16.3	46,XX,ins(16;2)(q22.1;p16.1p16.3)pat	ออทิซึม 1 ราย	อินทรอน 5 ของยีน <i>NRXN1</i> ขาดหาย ได้รับการถ่ายทอดจากพ่อที่ไม่มีภาวะออทิซึม	Kim et al., 2008
alpha-Neurexin 1	balanced chromosomal abnormality involving 2p16.3	46,XY,t(1;2)(q31.3;p16.3)dn	ออทิซึม 1 ราย	จุดแตกหักอยู่ด้าน 5' ห่างไปประมาณ 750 กิโลเบส	

ตารางที่ 8 สรุปรายงานการศึกษา CNVs ที่เกี่ยวกับความผิดปกติของยีน *Neurexin 1* ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และผู้ป่วยพัฒนาการล่าช้า

วิธีการ	กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา		จำนวน	ผลการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
	แหล่ง	จำนวน			
SNPs microarrays	ชาวยุโรป	ASD 427 ครอบครัว กลุ่มควบคุม 1,652 คน	1 ราย 1 ครอบครัว 4 ราย	deletion ยีน <i>Neurologigin 4X</i> deletion และ duplication ยีน <i>Neurexin 1</i> deletion และ duplication ยีน <i>SHANK3</i>	Marshall et al., 2008
SNPs microarrays	สถาบัน AGP	ASD 1,181 ครอบครัว กลุ่มควบคุม 1,152 คน	พี่น้อง 2 ราย (เพศหญิง)	deletion 300 Kb บริเวณเอกซอนของยีน <i>Neurexin 1</i>	Szatmari et al., 2007
SNPs microarrays	ชาวยุโรป	ผู้ป่วยภาวะปัญญาอ่อนที่ไม่ ทราบสาเหตุ 100 ราย	1 ราย	deletion 321 Kb บริเวณเอกซอนของยีน <i>Neurexin 1</i>	Friedman et al., 2006
CGH microarrays	ตัวอย่างจาก โรงพยาบาล บอสตัน	ผู้ป่วยพัฒนาการล่าช้า 3,540 ราย	12 ราย มีอาการหลากหลาย ประกอบด้วย ASD, ปัญญาอ่อน, พัฒนาการ ภาษาล่าช้า และ hypotonia	deletion ในยีน <i>Neurexin 1</i> จำนวน 12 แบบ ดังนี้ 1) 5,077 kb ,ทุกเอกซอน 2) 3,923 kb ,ทุกเอกซอน ยกเว้น 2 เอกซอนสุดท้าย 3) 315 kb , เอกซอน 1-5, บางส่วนของอินทรอน 5 4) 231 kb , เอกซอน 1-5, บางส่วนของอินทรอน 5 5) 139 kb , เอกซอน 3,4,5, บางส่วนของอินทรอน 2 และ 5 6) 257 kb , เอกซอน 1 และ 2 ,บางส่วนของอินทรอน 2 7) 122 kb , เอกซอน 1-3, บางส่วนของอินทรอน 3 8) 305 kb , เอกซอน 6-17 ,บางส่วนของอินทรอน 5และ 17 9) 164 kb , เอกซอน 6-8, บางส่วนของอินทรอน 5 และ 8 10) 139 kb, อินทรอน 5 11) 76 kb, อินทรอน 5 12) 66 kb, อินทรอน 5	Ching et al., 2010

รูปที่ 3 แสดงสรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ยีน Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม จากการศึกษาที่ผ่านมา ด้านบนรูปจำลอง คือ การเปลี่ยนแปลงของยีน beta-Neurexin 1 และด้านล่างรูปจำลอง คือ การเปลี่ยนแปลงของยีน alpha-Neurexin 1 ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือการเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนกรดอะมิโน บริเวณเอกซอน 1 ของยีน beta-Neurexin 1 พบแบบเปลี่ยนกรดอะมิโนมีความถี่สูง (พบ 2 ตำแหน่ง ในผู้ป่วยออทิซึม 4 ราย) ส่วนยีน alpha-Neurexin 1 พบแบบเปลี่ยนกรดอะมิโนความถี่ต่ำ (พบ 7 ตำแหน่ง ในผู้ป่วยออทิซึม 7 ราย)



ตารางที่ 9 ตารางสรุปรายงานการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน **Neuroligins** ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และผู้ป่วยภาวะปัญญาอ่อน

ยีน	การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนกรดอะมิโน	ลักษณะหรือโดเมนที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>NLGN3</i>	C>T	p.R451C	esterase domain	2 ราย (พี่น้องเพศชาย)	1) ไม่พบในกลุ่มควบคุม 200 คน 2) ถ่ายทอดจากแม่ 3) การศึกษาหน้าที่โปรตีน พบว่าโปรตีนไม่สามารถลำเลียงมาที่ผิวเซลล์ ลดการจับโปรตีน beta-Neurexin 1 ส่งผลให้ไซแนปส์ทำงานบกพร่อง	การกลายพันธุ์	ออทิซึม ชาวสวีเดน 158 ครอบครัว	Jamain et al., 2003 Comoletti et al., 2004 De Jaco et al., 2006
<i>NLGN3</i>	ตำแหน่ง splicing	-	มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอส่งข้างทั้งสองไอโซฟอร์ม คือ มีและไม่มีเอกซอน 7 อยู่ด้วยกัน	9 ราย	1) ไม่พบในกลุ่มคนปกติ 30 คน 2) พ่อและแม่มีการแสดงออกของอาร์เอ็นเอส่งข้างไอโซฟอร์มเดียว (มีเอกซอน 7)	ยังสรุปไม่ได้	ออทิซึมเพศหญิงจากสถาบัน AGRE* 10 ราย	Talebizadeh et al., 2006
<i>NLGN4X</i>	ตำแหน่ง splicing	-	อาร์เอ็นเอส่งข้างขาดเอกซอน 4	1 ราย	1) ไม่พบในกลุ่มควบคุม 30 คน และพบการแสดงออกแบบแอลลีลเดียวในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นออทิซึม จำนวน 11 ราย จากทั้งหมด 14 ราย 2) ไม่พบในพ่อและแม่	ยังสรุปไม่ได้	ออทิซึมเพศหญิงจากสถาบัน AGRE* 10 ราย	Talebizadeh et al., 2006

*AGRE: Autism Genetics Resource Exchange

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ยีน	การเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน	ลักษณะ หรือโดเมนที่ ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>NLGN4X</i>	frameshift 1186ins	D396X* stop codon	บริเวณก่อน transmembrane domain	2 ราย (พี่น้อง เพศชาย)	1) ไม่พบในคนปกติ 350 คน 2) แบบ de novo 3) การศึกษาหน้าที่ พบว่าส่งผลให้โปรตีน คงค้างในเซลล์ และนำไปสู่ความผิดปกติ ของไซแนปส์	การ กลายพันธุ์	ออทิซึมชาว สวีเดน 158 ครอบครัว	Jamain et al., 2003
<i>NLGN4X</i>	759G>A 1597A>G 1671G>A 2574C>T	p.G99S p.K378R p.V403M p.R704C	esterase domain esterase domain esterase domain cytoplasmic domain	1 ราย 1 ราย 1 ราย 1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติ 336 คน 2) การถ่ายทอดในครอบครัว - p.G99S ถ่ายทอดจากแม่ที่มีปัญหาด้าน การเรียนรู้ และพบในพี่ชายที่มีปัญหาด้าน ภาษา - p.K378R พบแม่เป็นเฮทเทอโรไซกัส สุขภาพปกติ แต่มีประวัติครอบครัวเป็นโรค ทางระบบประสาท - p.V403M ถ่ายทอดจากแม่เป็นเฮทเทอ โรไซกัส สุขภาพปกติ พบในพี่ชายที่เป็น ออทิซึม - p.R704C ถ่ายทอดจากแม่ที่ปกติ พบใน พี่สาวที่ปกติ แต่ไม่พบในพี่สาวที่เป็น PDD-NOS 3) การศึกษาหน้าที่ พบว่า p.R704C ส่งผลเสียต่อการจับกับโปรตีน SNTG2	p.G99S ยังสรุป ไม่ได้ p.K378R ยังสรุป ไม่ได้ p.V403M ยังสรุป ไม่ได้ p.R704C การกลาย พันธุ์	ออทิซึม คอเคเซียน 148 ราย	Yan et al., 2005 Yamakawa et al., 2007

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ยีน	การเปลี่ยน นิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยน กรดอะมิโน	ลักษณะ หรือโดเมน ที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
NLGN4X	frameshift c.1253del(AG)	D418X stop codon	ขาด C-terminal transmembrane domain	พี่น้อง เพศชาย 12 ราย, MR* 8, ออทิซึม 2, PDD 1	1) ไม่พบในคนปกติเพศชาย 200 คน 2) ผู้หญิงเป็นเฮเทอโรไซกัส แต่ไม่พบในพี่น้องเพศชายที่เป็นปกติ	การ กลายพันธุ์	ครอบครัวใหญ่ ชาวฝรั่งเศส ขนาดใหญ่	Laumonier et al., 2004
NLGN4X	deletion ขนาดใหญ่ ตำแหน่ง Xp22.2-22.3	-	ยีนขาดหายทั้งหมด 27 ยีน รวมยีน NLGN4X ด้วย	2 ราย (พี่น้อง)	ไม่มีข้อมูล ถ่ายทอดจากแม่ที่ไม่มีอาการ	การ กลายพันธุ์	ผู้ป่วย พัฒนาการ ล่าช้ารุนแรง พูดไม่ได้ และมี พฤติกรรม ออทิซึม	Chocholska et al., 2006
NLGN4X	deletion เอกซอน 4, 5, 6 ขนาด 756.79 kb	-	โปรตีนสั้นลง	พี่น้อง 2 ราย (ออทิซึม , น้องชาย เป็นโรค Tourette และสมาธิ สั้น)	1) ไม่พบในคนปกติ 384 คน 2) แม่เป็นเฮเทอโรไซกัส มีปัญหาด้านการเรียนรู้ มีภาวะซึมเศร้า และวิตกกังวล	การ กลายพันธุ์	ครอบครัวที่มี ความผิดปกติ ทางระบบ ประสาท	Lawson-Yuen et al., 2008
MR* คือภาวะปัญญาอ่อน								

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ยีน	การเปลี่ยน นิวคลีโอ ไทด์	การเปลี่ยน กรดอะมิโน	ลักษณะหรือโดเมน ที่ผิดปกติ	จำนวน	การพิสูจน์การกลายพันธุ์	สรุปผล	กลุ่มตัวอย่าง	เอกสารอ้างอิง
<i>NLGN4Y</i>	c.2035A>G	p.I679V	ตำแหน่งอนุรักษ พบในทุกสปีชีส์ของ โปรตีน <i>NLGN1</i> , <i>NLGN3</i> , <i>NLGN4X</i> และ <i>NLGN4Y</i>	1 ราย	1) ไม่พบในคนปกติเพศชาย 2,986 คน 2) พบในพ่อที่มีปัญหาทางการเรียนรู้	ยังสรุป ไม่ได้	ออทิซึมเพศ ชาย 290 ราย และภาวะ ปัญญาอ่อน ชาย 45 ราย ชาวคอ เคเซียน	Yan et al., 2008a

ตารางที่ 10 สรุปรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ (Association study) ของยีน *Neuroligins* กับภาวะออทิซึม

ยีน	ผลการศึกษา	กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา		วิธีการ	เครื่องหมาย พันธุกรรม	เอกสารอ้างอิง
		เชื้อชาติ	จำนวน			
<i>Neuroigin 1</i>	พบความสัมพันธ์ ที่ตำแหน่ง rs1488545 ($P = 0.0002$)	ชาวฟินแลนด์	100 ครอบครัว	family-based association analysis	สลิปส์ และ ไมโครแซทเทลไลท์	Ylisaukko-oja et al., 2005
<i>Neuroigin 3</i>	พบความสัมพันธ์ที่ตำแหน่ง DXS7132 ($P = 0.014$)					
<i>Neuroigin 4X</i>	พบความสัมพันธ์ที่ตำแหน่ง DXS996 ($P = 0.031$)					

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

ตัวอย่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเด็กไทย 170 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยออทิซึม 135 ราย และผู้ป่วย PDD-NOS 35 ราย เพศชาย 140 ราย และเพศหญิง 30 ราย จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ 48 ราย โรงพยาบาลรามาริบัติ 85 ราย โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ 37 ราย โครงการนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมสามสถาบัน โดยมีเกณฑ์เลือกผู้ป่วย ดังนี้ 1) ผ่านการตรวจวินิจฉัยตามเกณฑ์ DSM-IV 2) มีระดับสติปัญญาต่ำ (ไอคิวไม่เกิน 80) หรือมีพี่น้องเป็นผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม หรือมีประวัติครอบครัวสัมพันธ์กับโรกระบบประสาทและพัฒนาการบกพร่อง 3) ไม่มีประวัติการคลอดผิดปกติหรือมีการติดเชื้อทางสมอง 4) ไม่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับกลุ่มอาการที่ชัดเจน เช่น กลุ่มอาการทูเบอร์รัสครอโรซิส และกลุ่มอาการเพดเดอร์วิลลี เป็นต้น 5)ทุกรายมีผลการตรวจโครโมโซมและดีเอ็นเอของกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะเป็นปกติ 6) เพศชายมีผลการตรวจการกลายพันธุ์เอกซอน 2 ของยีน ARX เป็นปกติ 7) เพศหญิงมีผลการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน MECP2 เป็นปกติ 8) ผู้ปกครองลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ (แสดงดังตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ใช้ในการศึกษา

โรงพยาบาล	กลุ่มผู้ป่วย		จำนวนทั้งหมด (ราย)
	Autism	PDD-NOS	
รพ.สงขลานครินทร์	31	6	37
รพ.รามาริบัติ	60	25	85
รพ.ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ	44	4	48
รวม	135	35	170

ตัวอย่างกลุ่มควบคุม

ตัวอย่างกลุ่มควบคุมได้จากผู้บริจาคโลหิตที่คลังเลือดของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยซักประวัติว่าไม่มีปัญหาทางจิตเวช และปัญหาพัฒนาการผิดปกติที่ชัดเจนใน 3 รุ่น ไม่มีประวัติการรักษาตัวในโรงพยาบาลอย่างต่อเนื่อง หรือต้องรับประทานยาเพื่อลดปัญหาสุขภาพจิต และลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ นอกจากนี้มีการเก็บข้อมูล วันเดือน ปีเกิด ศาสนา โรคประจำตัว ประวัติการใช้ยา หรือสารเสพติด ประวัติภูมิลำเนา และเชื้อชาติของบรรพบุรุษ (ในรุ่นปู่ย่า ตายายลงมา) เพื่อให้ได้กลุ่มควบคุมที่มีพื้นฐานใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยมากที่สุด การเลือกจำนวนกลุ่มควบคุมต้องมีจำนวนไม่น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วย และต้องมีอัตราส่วนระหว่างผู้ชายต่อผู้หญิงเป็นสัดส่วนใกล้เคียงกัน เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงของยีน beta-Neurexin 1 ที่ส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง จะทดสอบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในกลุ่มควบคุม โดยเลือกตัวอย่างกลุ่มควบคุมตามหลักข้างต้น แสดงจำนวนดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มควบคุม	เพศชาย	เพศหญิง	รวม
กลุ่มควบคุมภาคกลาง	193	85	278
กลุ่มควบคุมภาคใต้	140	76	216
รวม	333	161	494

สารเคมี

Absolute ethanol
Acrylamide / Bis solution
Ammonium acetate
Ammonium persulfate
Betaine
BigDye Terminator v1.1 (ABI)
BigDye sequencing buffer
Boric acid
Bovine serum albumin (BSA)
Bromophenol blue
Chloroform
dNTP
Dimethylsulfoxide
Deionized water
Distilled water
EDTA
Ethidium bromide
Glycerol
Hidi-formamide
Isoamyl alcohol
Leader ,DNA marker
LIZ500, DNA marker
MgCl₂ (Invitrogen)
NP-40
PCR buffer 10X (Invitrogen)
Phenol, saturated
POP4 Polymer
Proteinase K

สารเคมี (ต่อ)

Restriction enzyme buffer 3 (NEB)
Restriction enzyme buffer 4 (NEB)
Restriction enzyme, *Bsp1286I* (NEB)
Restriction enzyme, *Ddel* (NEB)
Sodium acetate
SDS
Taq DNA polymerase (Invitrogen)
TEMED
Tris base

สารเคมีอื่นๆ

รายละเอียดการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข
25% Ammonium persulfate
10 M Ammonium acetate
2.5 mM dNTP Mix
Elution buffer
70 % ethanol
Loading dye
Lysis buffer
10% SDS
3 M Sodium acetate
10X TBE buffer
TE buffer

อุปกรณ์

เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) บริษัท Applied Biosystem

เครื่องถ่ายภาพยวี่ (Bioimaging system SynGene)

เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (PTC200, MJ Research)

เครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler)

อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวตั้งพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Protean II Xi cell, 20X20 cm, Biorad)

Autoclave

Autto pittette

Centrifuge

Heat box

Hot air oven

Incubator

Microcentrifuge

Spin down

Spectrophotometer

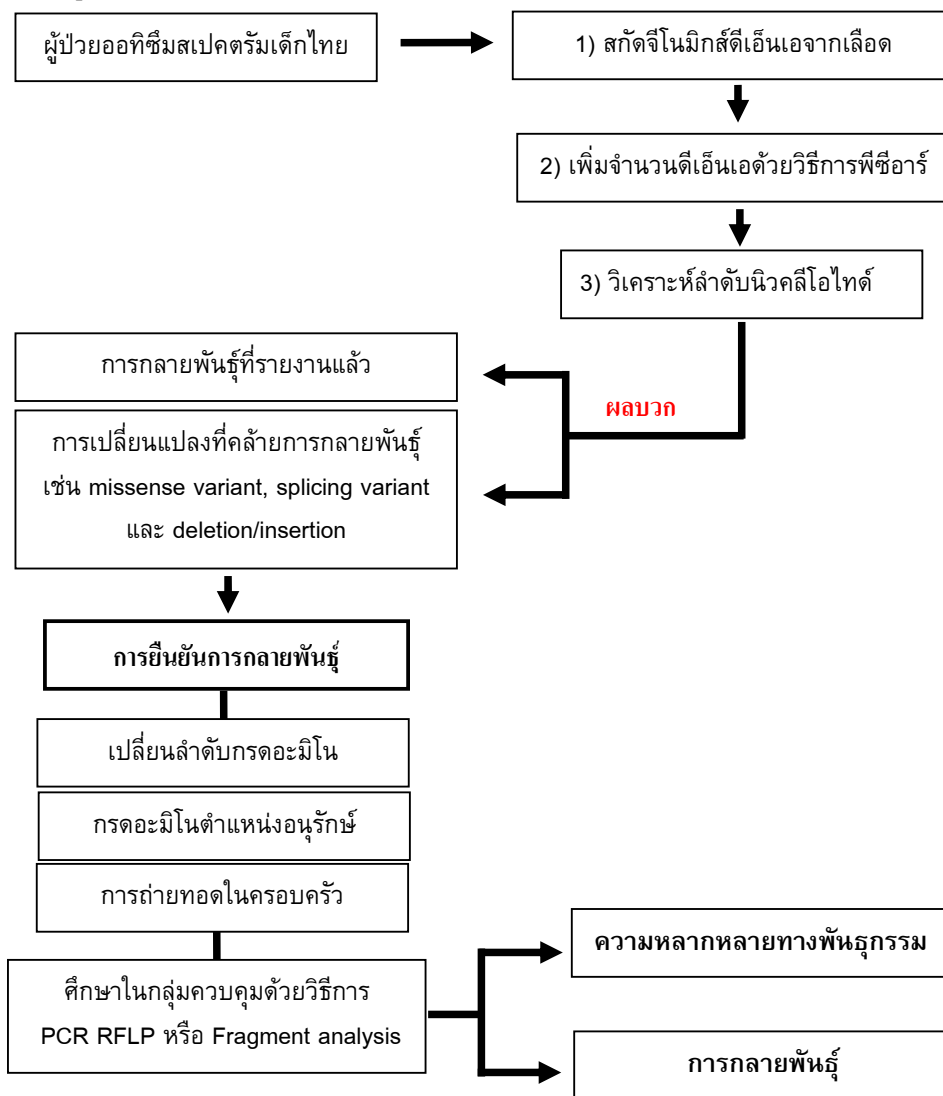
Vortex

Water bath

วิธีดำเนินการ

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากเลือดตามวิธีมาตรฐานฟีโนล-คลอโรฟอร์ม (2) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (3) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของยีน (GenBank) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอ



แผนผังแสดงขั้นตอนการตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม

การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียมจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

เก็บเลือดจากผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร) นำเลือดมาล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยสารละลาย TE buffer (ประกอบด้วย Tris-HCL pH 8.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA pH 8.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เม็ดเลือดแดงกระจายตัว และหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้ง (เซลล์เม็ดเลือดขาวตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด) ทำการล้างด้วย TE buffer ซ้ำ 3 ครั้ง จนกว่าได้เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตะกอนสีขาว หรือจนกว่าสารละลาย TE buffer มีลักษณะใส นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาทำให้เซลล์แตก ด้วยการเติมสารละลาย SDS (ความเข้มข้นร้อยละ 10) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร สารละลาย lysis buffer ปริมาตร 2,375 ไมโครลิตร (lysis buffer ประกอบด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.14 โมลาร์ Tris-HCL ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ และ NP40 ร้อยละ 0.1) จากนั้นย่อยเซลล์ด้วยการเติมสารละลาย Proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15-20 ไมโครลิตร และบ่มใน water bath แบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงหรือจนกว่าย่อยหมด นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (Ausubel et al., 2000) และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ โดยใช้ปริมาตรสองเท่าของปริมาตรรวม เขี่ยตะกอนดีเอ็นเอใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายทิ้ง รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ประมาณ 100-300 ไมโครลิตร (ขึ้นกับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอ) เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

ขอบเขตยีนที่ศึกษา

การศึกษานี้ตรวจการกระจายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ในส่วน coding region และรอยต่อ intron-exon boundary จำนวน 6 เอกซอน รวมถึงบริเวณ 5' UTR โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงยีน beta-Neurexin 1 จากฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ GenBank รหัส NT_022184.15 สำหรับอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิกส์ และรหัส NM_138735.2 สำหรับอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอส่งข่าวไอโซฟอร์ม beta-Neurexin 1 และการนับลำดับเอกซอนเรียกตาม NM_138735.2 ดังแสดงในรูปที่ 4

การออกแบบไพรเมอร์

ยีน beta-Neurexin 1 ทั้ง 6 เอกซอน แบ่งเป็น 8 ส่วน เพื่อให้ขนาดเหมาะสมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ การออกแบบตำแหน่งไพรเมอร์ใช้หลักการดังนี้ (PREMIER Biosoft International, 2010)

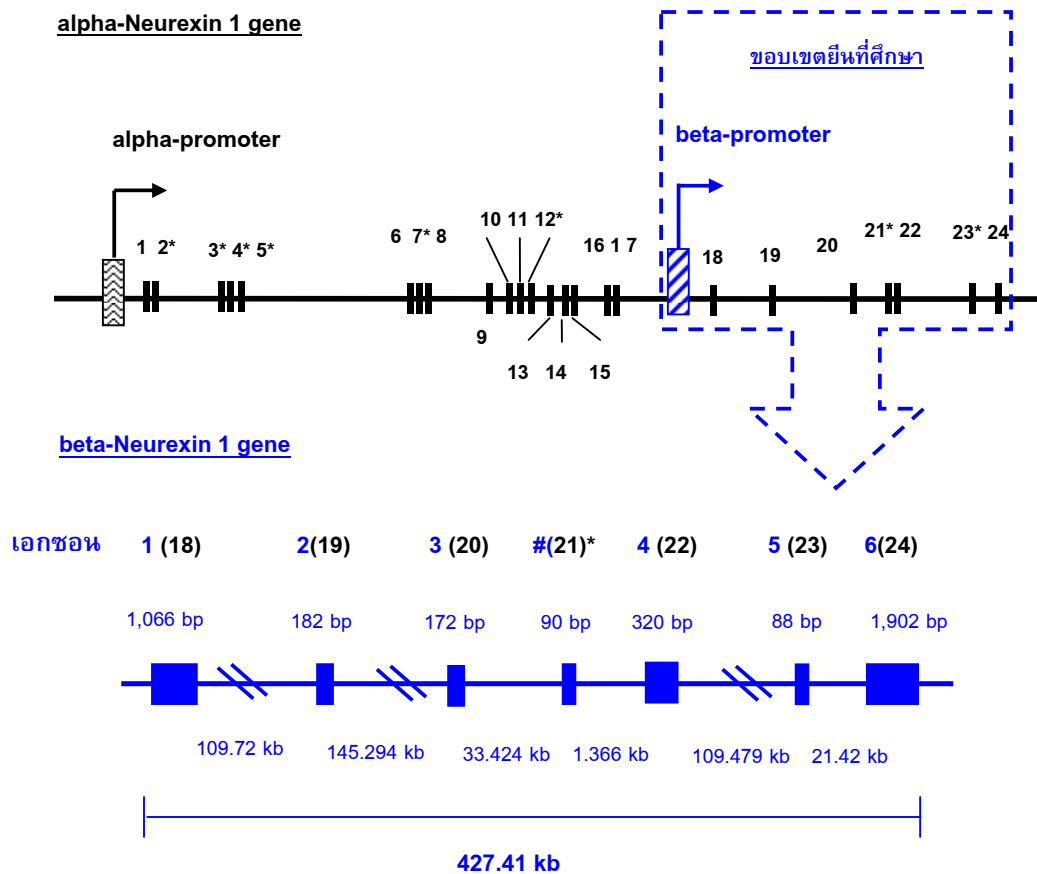
- 1) ความยาวของไพรเมอร์ ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์
- 2) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายตัวเบสอย่างสม่ำเสมอ ไม่ควรใช้ลำดับเบสที่เรียงตัวไม่ปกติ และพยายามหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurine หรือ polypyrimidine หรือเรียงตัวของเบสซ้ำๆ
- 3) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี GC content อยู่ระหว่าง 40-60 % ไม่ควรเลือกที่มี GC content สูงเกินไป
- 4) ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายในดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นก็คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ
- 5) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure คือ ต้องไม่จับกับลำดับเบสของตนเอง (self complementary) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีการเกิด hairpin loop ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์
- 6) ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์เป็นคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเข้าคู่กันเองกับไพรเมอร์อีกสายหนึ่ง (cross complementary) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3' overlap ในคู่ไพรเมอร์ เพื่อช่วยลดการเกิด primer dimer
- 7) ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน (ไม่ควรแตกต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส) โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม Primer 3 เลือกตำแหน่งไพรเมอร์ที่คาดว่าเหมาะสม และตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์แต่ละคู่ด้วยโปรแกรม Vector NTI ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ ที่ใช้ในการศึกษานี้แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ทำพีซีอาร์ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1

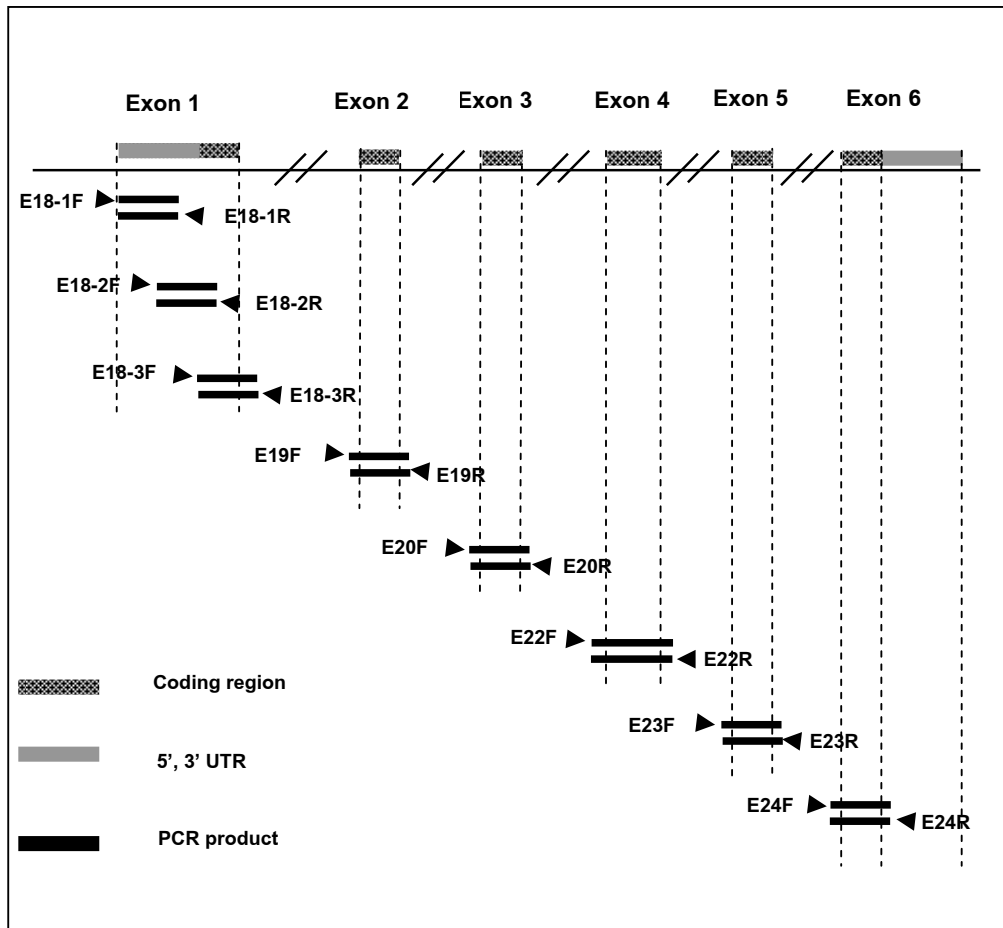
ลำดับเอกซอน ยีน Neurexin 1		ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	ขนาด (bp)
Beta	Alpha			
5'UTR	_	NRXN1_E18-1	F: CCAGCCTCCCTCGTTACATAG R: CCATTTAGCTTTGTGTGCGGG	21 21
5'UTR	_	NRXN1_E18-2	F: TGGGGTCTGCTTCTGTCTTG R: AGCATCCTCTGGTACATGGC	20 20
1	18	NRXN1_E18-3	F: CGAAGGAGGGAGAGGATG R: GGTAGAAAGAGGGGAGCGAG	18 20
2	19	NRXN1_E19	F: GGTCCACTTTCTTGAGCAC R: CTGGTTTCTGGGGAAGG	19 18
3	20	NRXN1_E20	F: CAGAAGTAAAATTGGAGGAAAGCAG R: GACAGCATTACATTACATGACTC	25 24
4	22	NRXN1_E22	F: CATCCATTGTAGATATAGAGTTCAC R: AAGCTGTAGTGCCTAAGATCAG	25 22
5	23	NRXN1_E23	F: GAGTGGATGGGTATCTACAAG R: GAGGGTAGCCTTCTATACATG	21 21
6	24	NRXN1_E24	F: CTCTGGTATTCAGTGAACCTCAATG R: CCCTGTCTTCTTTTGTATGTGC	24 22

หมายเหตุ : การศึกษานี้ไม่ตรวจการกลายพันธุ์เอกซอน 21 (alpha-Neurexin 1) เนื่องจากเป็น alternative splice site ที่ไม่แปลรหัสโปรตีน beta-Neurexin 1 (NM_138735.2)



รูปที่ 4 แสดงขอบเขตยีน **beta-Neurexin 1** ที่ศึกษา

โครงสร้างยีน alpha-Neurexin 1 ตามศึกษาของ Tabuchi และ Sudhof (2002) รายงาน ยีน beta-Neurexin 1 ประกอบด้วย 7 เอกซอน คือเอกซอน 18-24 แต่ปัจจุบัน ข้อมูล transcript variant จากฐานข้อมูล EMBL และ NCBI รายงานโปรตีน beta-Neurexin 1 มีเพียงไอโซฟอร์มเดียว คือ NM_138735.2 ซึ่งไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เอกซอน 21 เพราะเป็นตำแหน่ง alternative splice site การศึกษานี้จึงตรวจสอบ การกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 เฉพาะเอกซอนที่แปลรหัสโปรตีน (coding exon) จำนวน 6 เอกซอน และเรียกลำดับเอกซอนตามยีน beta-Neurexin 1 รหัส NM_138735.2 ส่วนตัวเลขในวงเล็บ คือลำดับเอกซอนเรียกตามโครงสร้างยีน alpha-Neurexin 1



รูปที่ 5 แสดงบริเวณการเพิ่มจำนวนยีน beta-Neurexin 1 ด้วยวิธีพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reaction)

การศึกษานี้ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 50-100 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1X (Invitrogen) สารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.75-2.0 มิลลิโมลาร์ (แต่ละเอกซอนต่างกันแสดงดังตารางที่ 14) ไพรมเมอร์ forward ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และไพรมเมอร์ reverse ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) 0.1 ยูนิต พีซีอาร์บางตำแหน่งมีการเติม adjuvant เพิ่ม (แต่ละเอกซอนต่างกันแสดงดังตารางที่ 14) เพื่อช่วยเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ หรือช่วยลด non specificities เช่น การใช้ DMSO เพื่อช่วยลด secondary structure ของดีเอ็นเอ การใช้ betaine หรือ BSA เพื่อช่วยคงสภาพของ เอนไซม์ *Taq* polymerase และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้

- 1) Initiation denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
 - 2) Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
 - 3) Primer annealing อุณหภูมิ 58-64 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
 - 4) Primer extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 - 5) Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- ขั้นตอน 2 ถึง 5 จำนวน 35 รอบ มีขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิต่างกันแสดงไว้ในตารางที่ 14 และแสดงสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในตารางที่ 15

ตารางที่ 14 แสดงองค์ประกอบและสภาวะสำหรับทำพีซีอาร์ตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน **beta-Neurexin 1**

beta Exon	alpha Exon	Primer (Conc. 0.5 uM)	MgCl ₂ Conc. (mM)	Adjuvant	Annealing	Product size (bp)
5'UTR	_	NRXN1_E18-1F NRXN1_E18-1R	1.5	_	64	482
5'UTR	_	NRXN1_E18-2F NRXN1_E18-2R	2.0	betaine 1M	62	542
1	18	NRXN1_E18-3F NRXN1_E18-3R	1.5	betaine 1M	60	463
2	19	NRXN1_E19F NRXN1_E19R	2.0	_	59	445
3	20	NRXN1_E20F NRXN1_E20R	1.5	_	56	451
4	22	NRXN1_E22F NRXN1_E22R	1.25	5% DMSO	58	502
5	23	NRXN1_E23F NRXN1_E23R	0.75	_	58	443
6	24	NRXN1_E24F NRXN1_E24R	1.5	_	58	479

ตารางที่ 15 แสดงสภาวะสำหรับทำพีซีอาร์ตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน **beta-Neurexin 1**

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	95	5 นาที	35 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	56-64	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final Extension	72	10 นาที	

การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน beta-Neurexin 1 ตรวจสอบผลด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส การศึกษานี้ใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบ slab gel ขนาด 10 X 10 เซนติเมตร หน้า 2 มิลลิเมตร เริ่มจากการเตรียมกระจกให้สะอาด นำกระจกประกบกัน กั้นด้วย spacer และยึดทั้งสองด้านด้วยตัวหนีบ จัดวางกระจกอยู่ในระนาบเดียวกันทั้งแผ่น จากนั้นเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6 ส่วนประกอบ แสดงดังตารางที่ 16 ผสมส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้น TEMED คนเบาๆให้เป็นเนื้อเดียวกัน ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเติม TEMED เป็นลำดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากัน นำไปเทในกระจกที่เตรียมไว้ ควรระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ และสอด comb เพื่อทำให้เกิดหลุมขนาด 25 ไมโครลิตร รอให้เจล polymerize ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ ควรคลุมด้วยแผ่นพลาสติก เพื่อลดการสัมผัสกับอากาศที่ทำให้เจลแห้งและหดตัว

การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำเจลที่พร้อมใช้งานประกบกับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวตั้ง ยึดน็อตทั้งสองด้านให้สมดุลกัน เพื่อให้แรงกดทับเจลสองด้านสม่ำเสมอและป้องกันไม่ให้เกิดรอยแตก นำเจลไปวางใน chamber อิเล็กโทรโฟรีซิส และเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ให้ท่วมขดลวดนำไฟฟ้า จากนั้นทำความสะอาดหลุมสำหรับโหลดตัวอย่าง ด้วยเข็มฉีดยาเป่า 1-2 ครั้ง โหลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผสมกับ loading dye อัตราส่วน 5:1 ลงในหลุม ระวังไม่ให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย เมื่อโหลดตัวอย่างเสร็จควรตรวจสอบระดับบัฟเฟอร์ให้อยู่ในระดับที่ทำให้กระแสไฟฟ้าครบวงจร จากนั้นประกอบสายไฟเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ตั้งค่าความต่างศักย์ 150 โวลต์ เวลา 90 นาที เมื่อครบเวลาย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลที่มีแหล่งกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจลด้วยโปรแกรม Gel image systems with UV transilluminator

ตารางที่ 16 แสดงส่วนประกอบเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 6

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มิลลิลิตร) (สำหรับเตรียม 1 เจล)
40% Acrylamide / Bis solution	1.5
10X TBE buffer	1
Glycerol	1
Distilled water	6.5
25% APS	0.02
TEMED (เติมลำดับสุดท้าย)	0.02

การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากเจลให้บริสุทธิ์

หลังจากทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อแยกดีเอ็นเอตามขนาดแล้ว นำเจลไปตัดเอาเฉพาะส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่ไหลอดปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร การศึกษานี้แยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกจากเจลด้วยวิธี Crush and Soak (Sambrook, J. et al., 1989) โดยการเติม elution buffer (ส่วนประกอบแสดงในภาคผนวก ข) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีชิ้นเจล บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง elution buffer จะช่วยละลายดีเอ็นเอออกจากเจล จากนั้นถ่าย elution buffer ที่มีสารละลายดีเอ็นเอใส่หลอดใหม่ และเติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดเดิม เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ยังตกค้างอยู่ เขย่าด้วย vortex และนำไปบ่มใน incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นถ่าย elution buffer ที่มีสารละลายดีเอ็นเอ 100 ไมโครลิตร ใส่รวมกับหลอดเดิมที่มีอยู่แล้ว 300 ไมโครลิตร และทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิต่ำกว่า -70 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายทิ้งด้วย autopipette ขนาด P200 และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายทิ้ง และรอให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ deionization ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 6-10 ไมโครลิตร (ขึ้นกับปริมาณตะกอนที่ได้) นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้นร้อยละ 6

โพลติเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้วหนึ่งหลุมต่อหนึ่งเจล เพื่อใช้ในการประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่าง ทำโพสอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจสอบผ่านกล้องที่มีแหล่งกำเนิดแสงเป็น UV โดยแถบดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และความเข้มข้นเพียงพอในการนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ต้องปรากฏเป็นแถบเดี่ยว และมีความเข้มข้นประมาณ 3-10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อติดตามการเรียงแสง

การศึกษานี้ตรวจการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำบริสุทธิ์แล้วทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อติดตามการเรียงแสง และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) ใช้องค์ประกอบพีซีอาร์ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งดัดแปลงมาจาก protocol ของบริษัท ABI ประกอบด้วย 1) PCR product 2) sequencing buffer 3) ไพโรเมอร์ 4) น้ำ deionization ที่ปลอดเชื้อ 5) Big dye terminator V1.1 ปริมาณการใช้แสดงดังตารางที่ 17 และแสดงสภาวะในการทำปฏิกิริยาในตารางที่ 18 Big dye terminator V1.1 เป็นสารเคมีสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมของ 1) เอนไซม์ (*Taq* polymerase) 2) dNTP แบบทั่วไป 3) ddNTP ที่ติดตามการเรียงแสง 4) และองค์ประกอบอื่นที่ช่วยการการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ส่วนไพโรเมอร์สำหรับการทำพีซีอาร์การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้ไพโรเมอร์ชุดเดียวกับการทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากยีน beta-Neurexin 1 โดยเลือกใช้ข้างใดข้างหนึ่ง (forward หรือ reverse) ที่ทำให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ครอบคลุมส่วนที่ต้องการ ควรหลีกเลี่ยงไพโรเมอร์ด้านที่อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงต้นเป็นแบบ repeat sequence เพราะลำดับเบสซ้ำๆจะรบกวนการแปลผลของเครื่อง ทำให้มีสัญญาณอื่นรบกวนจนแปลผลไม่ได้

การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสง

หลังจากได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสงแล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยถ่ายลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร เติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 31.25 ไมโครลิตร และน้ำ deionization ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 7.25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวทิ้งด้วย autopipette ขนาด P200 จากนั้นล้างตะกอนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น ร้อย ละ 70 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวทิ้ง และระเหยตะกอนให้แห้งด้วย heat box ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที วางทิ้งให้อุณหภูมิลดประมาณ 2 นาที เติม Hidi formamide ปริมาตร 12 ไมโครลิตร ผสมเบาๆให้ตะกอนละลาย และนำไปแยกให้เป็นสายเดี่ยวด้วย heat box ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ลดอุณหภูมิทันทีด้วยการแช่น้ำแข็งอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นโหลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ลงใช้ 96 well plate ที่ใช้สำหรับการทำ sequencing และนำไปตรวจสอบผล ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม Sequencing analysis ใช้เวลาประมาณ 45 นาทีในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 1 RUN (4 ตัวอย่าง) การแสดงผลมี 2 รูปแบบ คือ อิเล็กโตรเฟอโรแกรม และผลของลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 17 แสดงองค์ประกอบพีซีอาร์เพื่อติดฉลากสารเรืองแสง

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Big dye terminator V1.1 (BDT ready reaction mix)	–	1
Sequencing buffer	5X	1.5
Primer (forward or reverse)	10 uM	0.16
PCR product	3-10 ng/ul	1
Deionization water	–	6.34
ปริมาตรรวม	–	10

ข้อควรระวัง ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสงแล้ว ควรเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส และเก็บในที่มืดพ้นแสง

ตารางที่ 18 แสดงสภาวะการทำพีซีอาร์เพื่อตัดฉลากสารเรืองแสง

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	96	1 นาที	25 รอบ
Denaturation	96	10 วินาที	
Annealing	50	5 วินาที	
Extension	60	4 นาที	
Hold	4	forever	

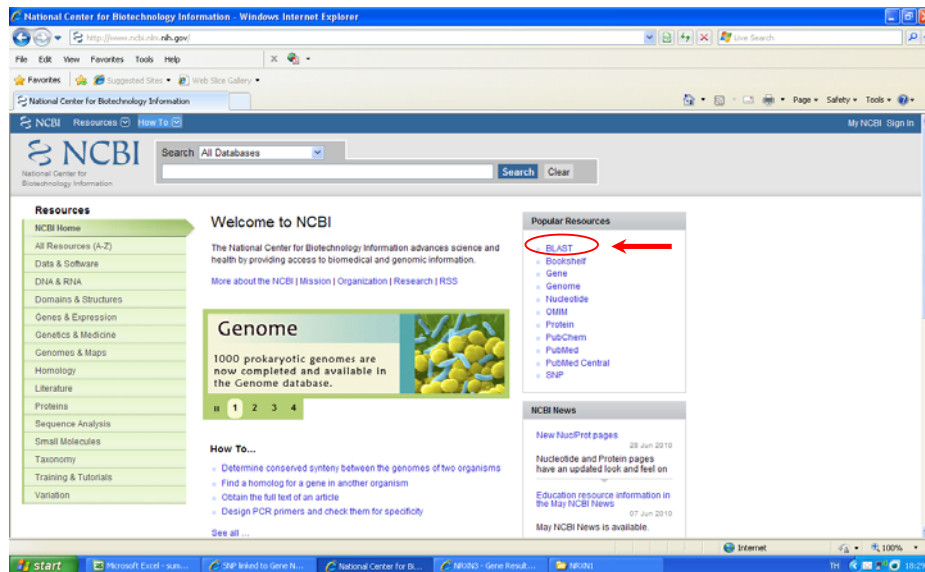
ตารางที่ 19 แสดงองค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำวิธีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตัดฉลากสารเรืองแสง

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PCR product	10
3 M Sodium acetate	1.5
Deionzed water	7.25
Absolute ethanol	31.25

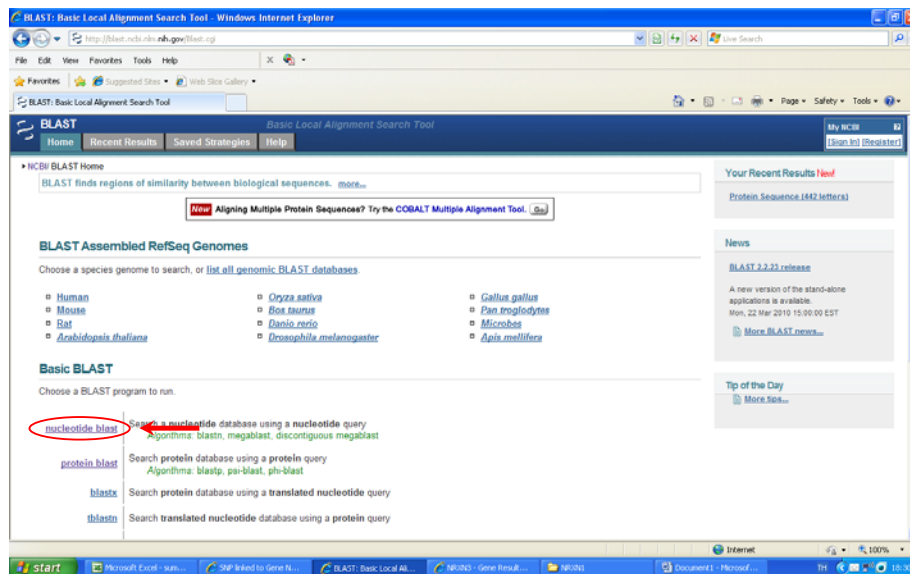
การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลยีน (GenBank)

นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST เว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> โปรแกรม BLAST จะเปรียบเทียบความเหมือนหรือความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราสนใจเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลยีน (GenBank) ขั้นตอนใช้งานดังนี้

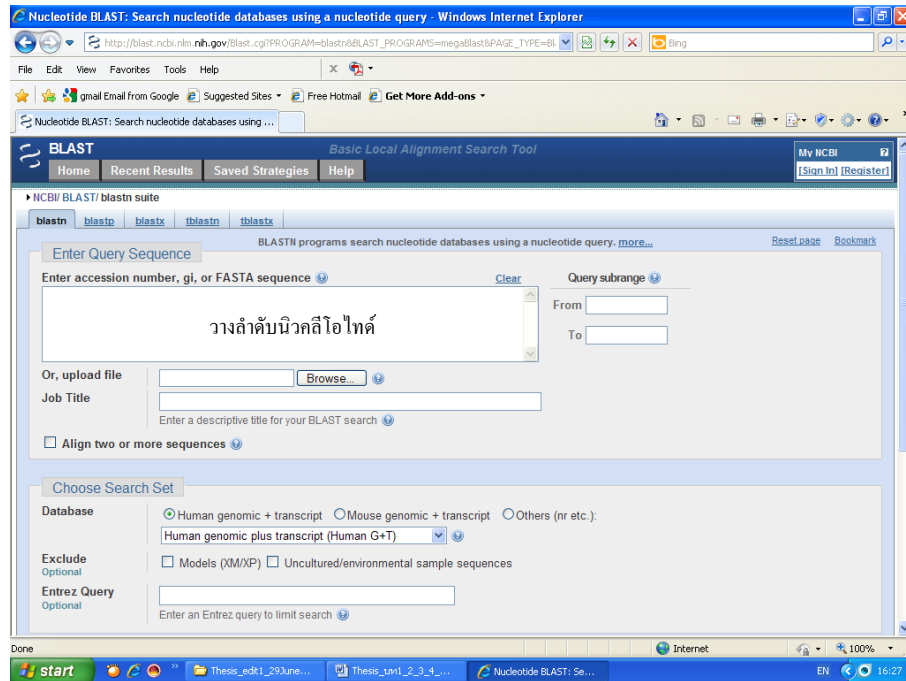
1. เข้าเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov/ คลิกเลือกที่โปรแกรม BLAST แสดงดังรูป



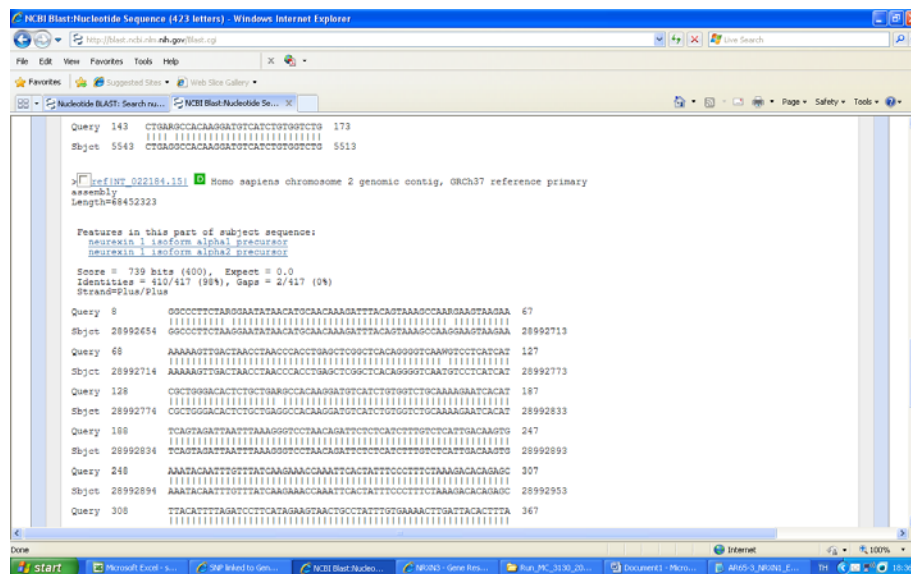
2. คลิกเลือกการ blast แบบ nucleotide blast แสดงดังรูป



3. วางลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่กำหนด และคลิก BLAST (มุมล่างซ้าย)



4. โปรแกรมแสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานข้อมูล GenBank



การยืนยันการกลายพันธุ์

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน beta-Neurexin 1 จำนวน 3 แบบ มีลักษณะคล้ายการกลายพันธุ์ คือ p.S14L, p.E272D และการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเข้าสู่ขั้นตอนการยืนยันการกลายพันธุ์ดังนี้

- 1) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนหรือไม่
- 2) ตรวจสอบว่าเป็นกรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์หรือไม่ ด้วยการเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ
- 3) ศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัว
- 4) ศึกษาในประชากรปกติเพื่อตรวจสอบความถี่ของแอลลีลในประชากรปกติ ถ้าพบมากกว่าร้อยละ 1 และมีข้อมูลสนับสนุนว่าไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค แสดงว่าเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม

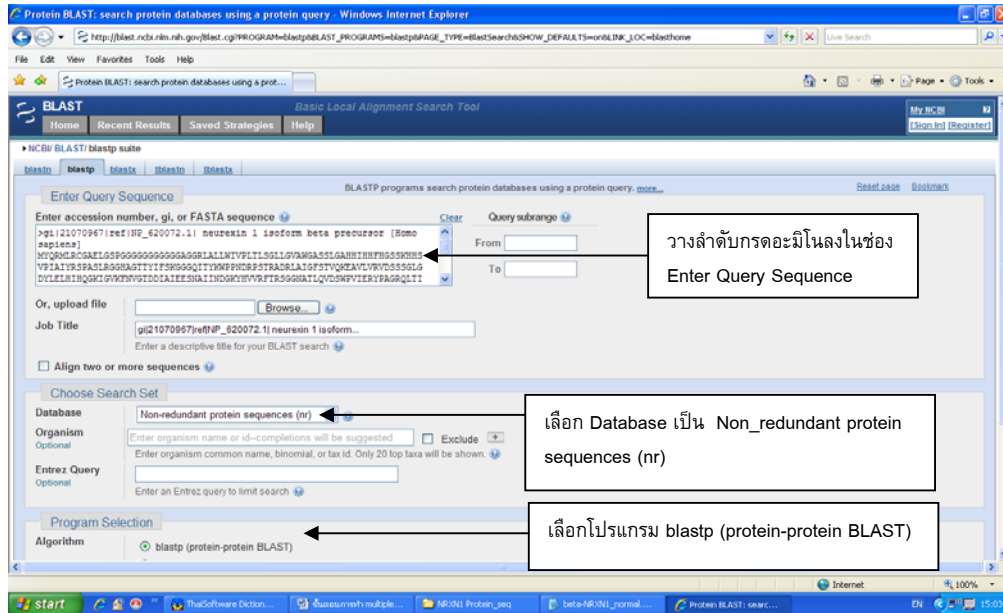
การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

การศึกษานี้ใช้การเปรียบเทียบกรดอะมิโนของโปรตีน beta-Neurexin 1 กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเพื่อหากรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ ด้วยโปรแกรม BLAST (Blastp) และ clustalW ขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. ค้นข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน beta-Neurexin 1 จากฐานข้อมูล GenBank #NP_620072.1

```
>gi|21070967|ref|NP_620072.1| Neurexin 1 isoform beta precursor [Homo sapiens]
MYQRMLRCGAELGSPGGGGGGGGGAGGRIALLWIVPLTSLGLGVAWGASSLGAHHIHHFHGSSSKHHS
VPIAIYRSPASLRGGHAGTTYIFSKGGGQITYKWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAVLVRVDSSSGLG
DYLELHIHQKIGVKFNVGTDIDIAIEESNAIINDGKYHVVRFRTRSGGNATLQVDSWPVIERYPAGRQLTI
FNSQATIIIGGKEQGQPFQGLSGLYNGLVNMAAENDANIAIVGNVRLVGEVPSMSTTESATAMQS
EMSTSIMETTTTLATSTARRGKPPKPEISQTTDDILVASAECPSDDEDIDPCEPSSGGLANPTRAGGRE
PYPGSAEVIRESSTTGMVVGIVAAAALCILILLYAMYKYRNRDEGSYHVDESRYNISNSAQSNGAVVKE
KQPSSAKSSNKNKKNKDKKEYYV
```


2. นำข้อมูลดังกล่าวตรวจสอบความเหมือนกับโปรตีนในสิ่งมีชีวิตอื่น ด้วยโปรแกรม Blastp (protein blast) เว็บไซต์ NCBI



ป้อนข้อมูลดังแสดงในรูป และคลิก BLAST (มุมล่างซ้าย)

3. ผลการ Blastp แสดงโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน beta-Neurexin 1 ทั้งสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์

Accession Number	Sequence Name	Score (Bits)	E Value
ref NP_620072.1	neurexin 1 isoform beta precursor [Homo sapiens]	909	0.0
gb F58400.1	NRX1B_MOUSE RefName: Full"Neurexin-1-beta; AltName...	890	0.0
ref XP_844937.1	PREDICTED: similar to neurexin 1 isoform beta...	815	0.0
ref NP_001103275.1	neurexin 1 [Bos taurus] >gb AA119906.1 n...	811	0.0
ref XP_844938.1	PREDICTED: similar to Neurexin-1-beta precu...	788	0.0
ref Q28142.2	NRX1B_BOVIN RefName: Full"Neurexin-1-beta; AltName...	794	0.0
gb E0802612.1	rCG61448, isoform CRA_a [Rattus norvegicus]	783	0.0
gb AA125180.1	NRXN1 protein [Homo sapiens]	758	0.0
ref XP_001917758.1	PREDICTED: neurexin 1 [Equus caballus]	677	0.0
gb EAX00183.1	neurexin 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]	675	0.0
gb EAX00186.1	neurexin 1, isoform CRA_e [Homo sapiens]	674	0.0
ref XP_531818.2	PREDICTED: similar to neurexin 1 isoform alp...	674	0.0
gb EAX00182.1	neurexin 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	674	0.0
ref NP_004792.1	neurexin 1 isoform alpha precursor [Homo sa...	674	0.0
gb EAX00184.1	neurexin 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	662	0.0
ref NP_774829.1	neurexin 1 precursor [Bos taurus] >sp Q28146...	662	0.0
ref NP_796258.2	neurexin I isoform 2 [Mus musculus]	662	0.0
ref XP_001375416.1	PREDICTED: similar to neurexin I isoform ...	661	0.0
ref Q28142.2	NRX1A_MOUSE RefName: Full"Neurexin-1-alpha; AltNam...	661	0.0
gb I2845433.2	mXIAA0578 protein [Mus musculus]	661	0.0
ref NP_064448.3	neurexin I isoform 1 [Mus musculus]	660	0.0
gb I2833015.1	unnamed protein product [Mus musculus]	660	0.0
ref Q28142.2	NRX1A_PAN RefName: Full"Neurexin-1-alpha; AltName...	658	0.0
ref NP_065235.2	neurexin 1 [Rattus norvegicus] >gb AA41704...	658	0.0
ref NP_001129131.1	neurexin 1 isoform alpha2 precursor [Homo...	658	0.0
ref XP_552102.1	PREDICTED: similar to Neurexin-1-alpha precu...	658	0.0
ref XP_844988.1	PREDICTED: similar to Neurexin-1-alpha precu...	657	0.0

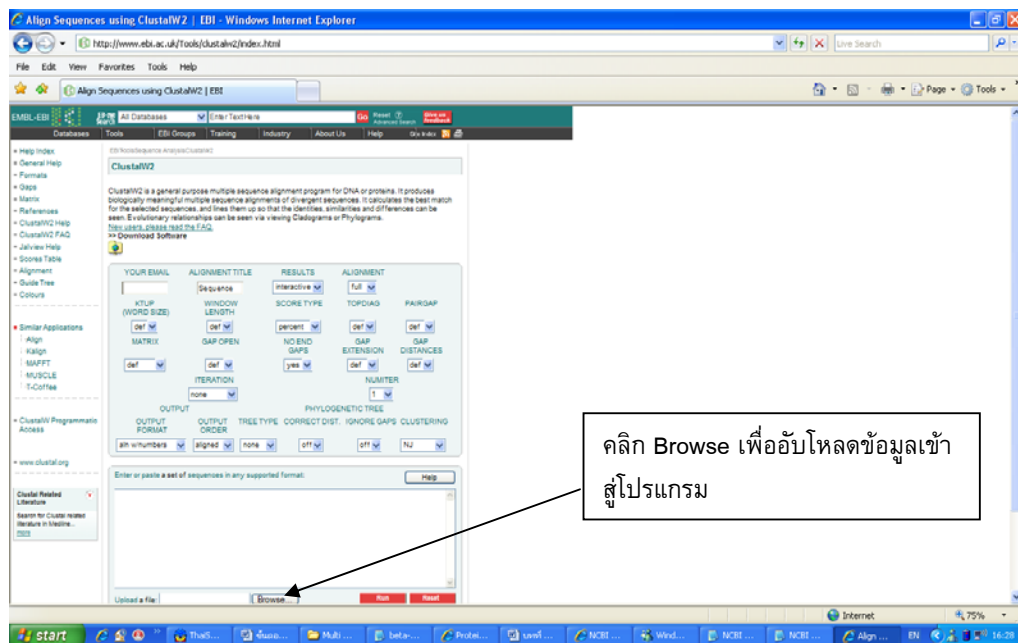
4. เลือกโปรตีนต่างสปีชีส์ที่ได้จากการ Blast ที่คล้ายคลึงกับโปรตีนที่สนใจ บันทึกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนแต่ละสปีชีส์ลงในแฟ้มข้อมูลที่เป็นไฟล์ Notepad จัดเก็บข้อมูล

ต่อเนื่องกัน ลักษณะดังนี้

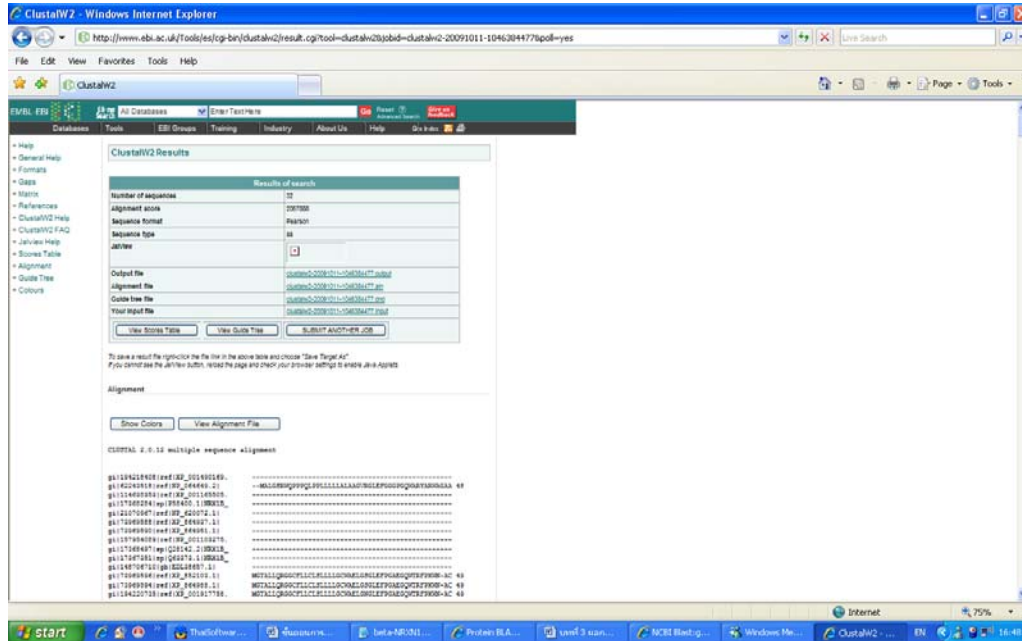
```
>gi|17368284|sp|P58400.1|NRX1B_HUMAN RecName: Full=Neurexin-1-beta; AltName:
Full=Neurexin I-beta; Flags: Precursor
MYQRLRCGAELGSPGGGGGGGGGAGGRLALLWIVPLTSLGLLGVAWGASSLGAHHIHHFHGSSKHHS
VPIAIYRSPASLRGGHAGTTYIFSKGGGQITYKWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAVLVRVDSGLG
DYLELHIHQGKIGVKFNIGTDDIAIEESNAIINDGKYHVVRFTSRGGNATLQVDSWPVIERYPAGRQLTI
FNSQATI IIGGKEQGQPFQGGQLSGLYNGLVNMAAENDANIAIVGDVRLVGEVPSSTTTESTATAMQS
EMSTS IMETTTTTLATSTARRGKPPKPEISQTTGDI L VASAECPSDDEDIDPCEPSSGGLANPTRAGGRE
PYPGSAEVIRESSTTGMVVGIVAAAALCILILLCAMNKCRNRDEGSYHVDES RNYISNSAQSN GAVVKE
KQPSSAKSSNKNKKNKDKKEYYV
>gi|21070967|ref|NP_620072.1| Neurexin 1 isoform beta precursor [Homo
sapiens]
MYQRLRCGAELGSPGGGGGGGGGAGGRLALLWIVPLTSLGLLGVAWGASSLGAHHIHHFHGSSKHHS
VPIAIYRSPASLRGGHAGTTYIFSKGGGQITYKWPPNDRPSTRADRLAIGFSTVQKEAVLVRVDSGLG
DYLELHIHQGKIGVKFNVTDDIAIEESNAIINDGKYHVVRFTSRGGNATLQVDSWPVIERYPAGRQLTI
FNSQATI IIGGKEQGQPFQGGQLSGLYNGLVNMAAENDANIAIVGNVRLVGEVPS SMTTTESTATAMQS
EMSTS IMETTTTTLATSTARRGKPPKPEISQTTDDI L VASAECPSDDEDIDPCEPSSGGLANPTRAGGRE
PYPGSAEVIRESSTTGMVVGIVAAAALCILILLYAMYKYNRNRDEGSYHVDES RNYISNSAQSN GAVVKE
KQPSSAKSSNKNKKNKDKKEYYV
```

เป็นต้น

5. ใช้โปรแกรม clustalW เพื่อลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งอนุรักษ์ การศึกษาที่ใช้ clustalW โปรแกรมออนไลน์จากเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนในข้อ 4 เข้าสู่โปรแกรม โดยการคลิกที่ browse เลือกไฟล์ notepad ที่จัดเก็บไว้ ใช้พารามิเตอร์ตามที่โปรแกรมตั้งไว้ทั้งหมด และคลิก RUN ให้โปรแกรมทำงาน



6. โปรแกรมแสดงผลการ multiple alignment แสดงดังรูป จัดเก็บข้อมูลเป็นไฟล์ BioEdit (คอมพิวเตอร์ต้องมีโปรแกรม Bioedit รองรับ) โดยการคลิกที่ view alignment file และบันทึกข้อมูล



7. ผลการทำ multiple alignment ทำให้ทราบว่าตำแหน่งที่เราสนใจนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตชนิดใดบ้าง

	1355 1365 1375 1385 1395
RAT_NRX1_B	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
Mouse_mCG15583_CRA_b	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
cattle_nrxn1_B	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGNSPTK-EP
dog_similar_nrxn1_B	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
Homo_sapiens_NRXN1_B	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
mouse_nrxn1_A	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
rat_nrxn1_A	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
horse_nrxn1	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
Homo_sapiens_NRXN1_A	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
cattle_nrxn1	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
rhesus_monkey_nrxn1_B	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
dog_nrxn1_A	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
opossum_nrxn1	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTAR RGKPPTK-EP
chicken_nrxn1_A	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSVMET TTTLATSTAR RGKAPT-EP
frog_LOC100127647	LVGDVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSIMET TTTLATSTR --KSPTR-EP
Taeniopygia_guttata_nrxn1	LVGEVPSS-M TTESTATAMQ SEMSTSVMET TTTLATSTAR RGKAPT-EP
chimpanzee_nrxn1I	LVGEGPSVLL SAETTATL ADMATTIMET TTTMATTTR RGRSPTLRDS
zebrafish_nrxn1a_B	LVGDMPSI TPQSSVSAAG NRSETSPSIT DITTTTASNR QGKQTTT---
Clustal Consensus	***: ** : ::::: : * : * * : * : *

การทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP)

การศึกษานี้ใช้วิธีการพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง p.S14L และ p.E272D ในกลุ่มประชากรปกติจำนวน 310 คน และ 198 คน ตามลำดับ หลักการพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี คือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัด ด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน ย่อมให้แถบดีเอ็นเอจากการตัดรูปแบบต่างกัน การศึกษานี้ใช้โปรแกรม NEBcutter V2.0 จากเว็บไซต์ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มี restriction site ตรงกับตำแหน่งที่ต้องการ จากนั้นใช้โปรแกรม Restriction mapper 3 จากเว็บไซต์ <http://www.restrictionmapper.org/>. ทำนายผลจากการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ การทำพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

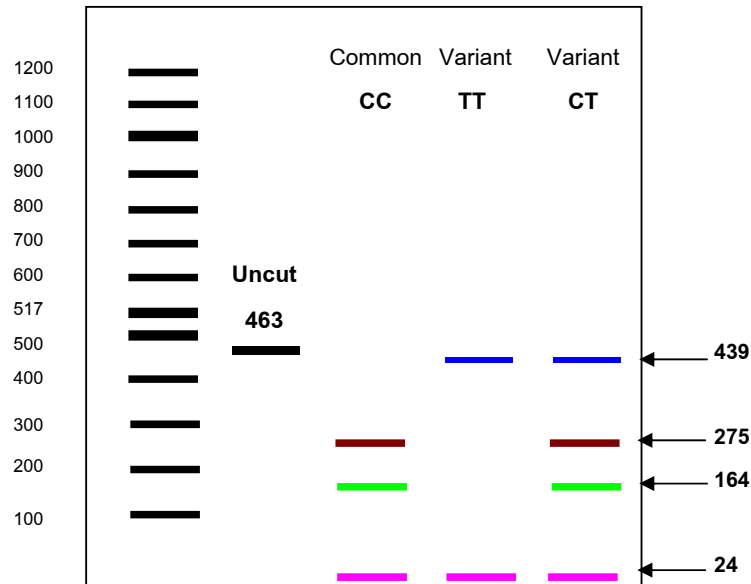
การเปลี่ยนแปลง p.S14L พบในเอกซอน 1 การทำพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีจึงใช้การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเดียวกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเอกซอน 1 ซึ่งมีขนาด 463 bp แสดงดังตารางที่ 14 และ 15

ส่วน p.E272D พบในเอกซอน 4 การทำพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีจึงใช้การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเดียวกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเอกซอน 4 ซึ่งมีขนาด 502 bp แสดงดังตารางที่ 14 และ 15

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

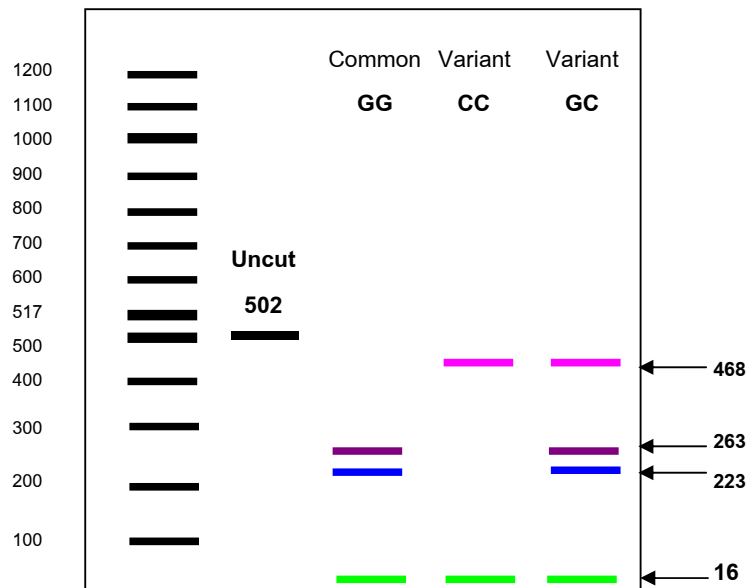
นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ แสดงดังตารางที่ 20 จากนั้นนำไปป้อนใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

การทำพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีด้วยเอนไซม์ *Bsp1286I* ใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง c.41C>T (p.S14L) ในประชากรปกติ โดยเอนไซม์จะตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แบบทั่วไป (CC) ขนาด 463 bp ได้ 2 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 24 bp, 164 bp และ 275 bp แต่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีการเปลี่ยนแปลง c.41C>T แบบโฮโมไซกัส (TT) ตัดได้เพียง 1 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 24 bp และ 439 bp แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 รูปจำลองแสดงผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp1286I* ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง c.41C>T (p.S14L) ในประชากรปกติ

ส่วนการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง c.816G>C (p.E272D) ในประชากรปกติ ใช้เอนไซม์ *DdeI* ในการทำพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยเอนไซม์สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แบบทั่วไป (GG) ได้ 2 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 16 bp, 223 bp และ 263 bp แต่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีการเปลี่ยนแปลง c.816G>C แบบโฮโมไซกัส (CC) ตัดได้เพียง 1 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 16 bp และ 486 bp แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 รูปจำลองแสดงผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DdeI* ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลง c.816G>C (p.E272D) ในประชากรปกติ

ตารางที่ 20 แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมี	การเปลี่ยนแปลง	
	p.S14L	p.E272D
	<i>Bsp1286I</i> * 1 Unit	<i>DdeI</i> * 1 Unit
	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Deionized water	3.7	1.8
10X Buffer (NEB)	1 (buffer 4)	1 (buffer 3)
BSA (10 mg/ml)	0.1	–
Restriction enzyme* (5 units/ul)	0.2	0.2
PCR product	5	7
ปริมาตรรวม	10	10

จากนั้นตรวจสอบผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส ความเข้มข้นร้อยละ 6 ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ความต่างศักย์ 150 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำเปล่า 5 นาที ตรวจสอบผลด้วยเครื่องถ่ายภาพที่มีแหล่งกำเนิดแสง UV และถ่ายภาพเจลด้วยโปรแกรม Gel image systems with UV transilluminator

การแปลผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลง c.41C>T ในกลุ่มประชากรปกติ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แบบทั่วไป (CC) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล 2 ขนาด คือ 164 bp และ 275 bp ส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี c.41C>T แบบโฮโมไซกัส (TT) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล 1 ขนาด คือ 439 bp และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เปลี่ยนแปลง c.41C>T แบบเฮเทอโรไซกัส (CT) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล 3 ขนาด คือ 164 bp 275 bp และ 439 bp แสดงดังรูปที่ 6

การแปลผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลง c.816G>C ในกลุ่มประชากรปกติ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แบบทั่วไป (GG) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล 2 ขนาด คือ 223 bp และ 263 bp ส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี c.816G>C แบบโฮโมไซกัส (CC) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล 1 ขนาด คือ 486 bp และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี c.816G>C แบบเฮเทอโรไซกัส (GC) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล 3 ขนาด คือ 223 bp 263 bp และ 486 bp แสดงดังรูปที่ 7

การวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์

การศึกษานี้พบผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม 5 ราย มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ทั้งหมด 3 แบบ คือ จำนวนซ้ำ GGC ขาดหาย 4 ซ้ำ (c.67-78del 4 GGC) จำนวนซ้ำ GGC ขาดหาย 5 ซ้ำ (c.64-78del 5 GGC) และจำนวนซ้ำ GGC เพิ่มขึ้น 1 ซ้ำ (c.78ins GGC) จากการศึกษาด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าวิธีนี้แปลผลจำนวนซ้ำไม่ชัดเจน ในกรณีที่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบเฮเทอโรไซกัส เนื่องจากอิเลกโตรเฟอโรแกรมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนกัน จนแปลผลไม่ได้ จึงเปลี่ยนมาใช้วิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้หลักการแยกตามขนาด ใช้โพลีเมอร์ POP4 (ชื่อการค้า) เป็นตัวกลางคำนวณในการทำ อิเล็กโตรฟอร์ซิส ทำให้การวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC มีความถูกต้องมากกว่า

การศึกษานี้ใช้วิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์วิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ในผู้ป่วย พ่อแม่ และกลุ่มประชากรปกติ 118 คน วิธีการทำพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่มีการติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ (FAM) ที่ปลาย 5' และการตรวจสอบผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ

ไพรเมอร์สำหรับทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอดังนี้ 5' CGAAGGAGGGA GAGGATG 3' เป็นไพรเมอร์ forward และ 5' AGCGGACTATCCAAAGC 3' เป็นไพรเมอร์ reverse ที่ติดฉลากสารฟลูออเรสเซนต์ (FAM) ที่ปลาย 5' ใช้อุณหภูมิและสภาวะในการทำ ปฏิกิริยาพีซีอาร์แสดงดังตารางที่ 21 และ 22

ตารางที่ 21 แสดงองค์ประกอบพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC

องค์ประกอบพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Primer_NRXN1_E18-3F (10uM)	0.2
Primer_NRXN1_E18-3R_Label_FAM (10uM)	0.2
Genomic DNA (50ng/ul)	1
dNTP (2.5 mM)	0.8
10X Buffer (Invitrogen)	1
MgCl ₂ (50mM)	0.4
Taq polymerase (50U/ul)	0.1
5X Q-solution (Qiagen)	2
Deionzed water	4.3
ปริมาตรรวม	10

ตารางที่ 22 แสดงสภาวะสำหรับการทำพีซีอาร์ปลูออเรสเซนซ์วิเคราะห์จำนวนซ้ำ
GGC

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	95	5 นาที	35 รอบ
Denaturation	95	45 วินาที	
Annealing	60	45 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final Extension	72	10 นาที	

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอมาตรฐาน LIZ500 0.3 ไมโครลิตร โหลดใน 96 well plate และทำให้เสียสภาพที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มสารพันธุกรรม และลดอุณหภูมิเป็น 0 องศาเซลเซียสทันทีด้วยการแช่น้ำแข็ง 2 นาที ตรวจสอบผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติด้วยโปรแกรม GeneMapper v3.2 ใช้เวลาประมาณ 45 นาทีในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 1 RUN (4 ตัวอย่าง)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1

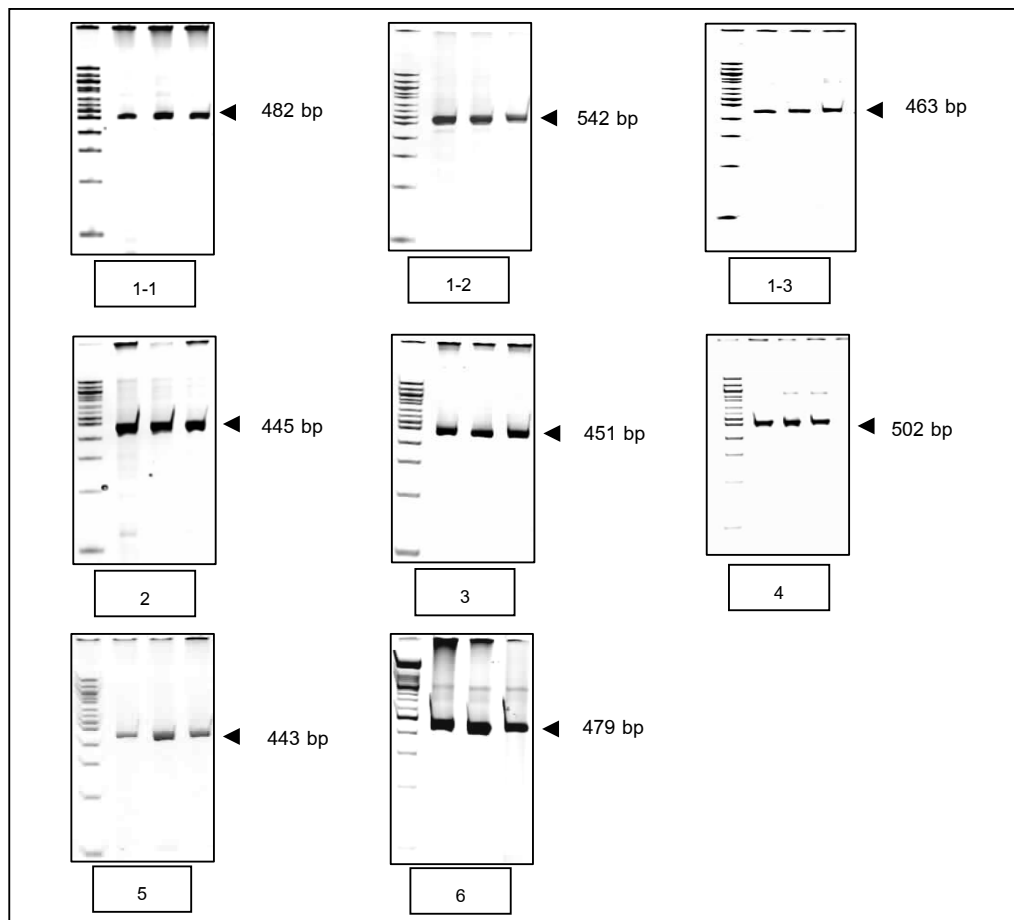
การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม 170 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นออทิซึม 135 ราย และกลุ่มผู้ป่วย PDD-NOS 35 ราย เป็นเพศชาย 140 ราย และเพศหญิง 30 ราย มีอายุอยู่ในช่วง 1 ปี 4 เดือน ถึง 16 ปี 7 เดือน อายุเฉลี่ย 4 ปี 3 เดือน แบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับสติปัญญาต่ำกว่าปกติ 128 ราย กลุ่มผู้ป่วยที่พี่น้องเป็นออทิซึมสเปกตรัม 7 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัวสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาทและพัฒนาการบกพร่อง 35 ราย ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงจำนวนและลักษณะของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในการศึกษา

ลักษณะของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม	Autism	PDD-NOS	รวม
1.ระดับสติปัญญาต่ำกว่าปกติ			
1.1) ระดับไอคิวต่ำกว่า 80 (แบบไม่ใช้ภาษา)	88	22	110
1.2) การประเมินทักษะการปรับตัวไวน์แลนด์อยู่ในระดับต่ำ ค่าอยู่ในช่วง 20 ถึง 70	18	0	18
2. ผู้ป่วยที่มีพี่น้องเป็นผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม	6	1	7
3. ระดับสติปัญญาปกติที่มีประวัติครอบครัวสัมพันธ์กับภาวะบกพร่องทางด้านพัฒนาการ (ไอคิวมากกว่า 80 หรือไวน์แลนด์มากกว่า 70)	23	12	35
รวม	135	35	170

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน beta-Neurexin 1

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็น ออทิสซึมสเปกตรัม ใช้การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มจำนวนยีน beta-Neurexin 1 และตรวจสอบผล ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 6 เอกซอน ประกอบด้วย 8 ส่วน คือ เอกซอน 1-1, 1-2, 1-3, 2, 3, 4, 5 และ 6 โดยเอกซอน 1 มีขนาดใหญ่ จึงแบ่งเป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ย่อย 3 ส่วน เพื่อความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่ละส่วนแสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน beta-Neurexin 1 ที่ตรวจสอบผลด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1-1, เลขตัวแรก คือ เอกซอนที่ 1 เลขตัวหลัง คือ พีซีอาร์ย่อยในแต่ละเอกซอน)

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม 170 ราย ใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอบริเวณที่แปลรหัสเป็นโปรตีน รวมถึงรอยต่ออินทรอนกับเอกซอน และ 5' UTR การศึกษานี้ใช้ลำดับเอกซอนและลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (refseq) ของยีน beta-Neurexin 1 ตามรหัส GenBank#NM_138735.2 (negative strand) การระบุตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ระดับ คือ ระดับจีโนมิกส์ (ตัวย่อ g.) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง GenBank#NT_022184.15 (plus strand) ระดับ cDNA (ตัวย่อ c.) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง GenBank#NM_138735.2 และระดับโปรตีน (ตัวย่อ p.) ใช้ลำดับกรดอะมิโนอ้างอิง GenBank#NP_620072.1 นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอน ใช้การระบุตำแหน่งอินทรอน (ตัวย่อ IVS) ตามเอกซอนของยีน alpha-Neurexin 1 ต่อด้วยตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่นับจาก splice site (AG หรือ GT) และระบุลำดับเบสที่เปลี่ยนตาม cDNA

ศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ทั้งหมด 12 แบบ ดังนี้

1) c.41C>T (p.S14L) หรือ g.29395934G>A แบบเฮเทอโรไซกัส เกิดที่เอกซอน 1 พบในผู้ป่วย 1 ราย คือ TM40-3 เป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เกิดจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 41 จาก C เป็น T ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่ง 14 เปลี่ยนจากเซอรีน (Serine, S) เป็นลิวซีน (Leucine, L) การเปลี่ยนแปลงนี้เคยมีรายงานมาก่อน แต่ยังไม่สรุปไม่ได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์หรือไม่

2) c.816G>C (p.E272D) หรือ g.29102413C>G แบบเฮเทอโรไซกัส เกิดที่เอกซอน 4 พบในผู้ป่วย 3 ราย คือ AR15-3, AR23-3 และ TM47-3 เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เกิดจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 816 จาก G เป็น C ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่ง 272 เปลี่ยนจากกรดกลูตามิก (Glutamic acid, E) เป็นกรดแอสพาติก (Aspartic acid, D) การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เคยรายงานมาก่อน

3) การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC (GGC repeat variations) 3 ลักษณะ แบบเฮเทอโรไซกัส เกิดที่เอกซอน 1 พบในผู้ป่วยทั้งหมด 5 ราย ดังนี้

(1) **c.67-78del4GGC (p.23-26del4G)** หรือ g.29395908_29395897del4GGC พบในผู้ป่วย 2 ราย ได้แก่ AR18-3 และ TM19-3 เป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบ deletion ที่เกิดจากจำนวนซ้ำ GGC ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 67-78 ขาดหาย 4 ซ้ำ ทำให้

สายพอลิเปปไทด์สายหนึ่ง มีการขาดหายของกรดอะมิโนไกลซีนตำแหน่ง 23-26 จำนวน 4 กรดอะมิโน

(2) **c.64-78del5GGC (p.22-26del5G)** หรือ g.29395911_29395897del5GGC พบในผู้ป่วย 2 ราย คือ AR80-3 และผู้ป่วย AR87-3 รวมถึงพบในพี่ชายของ AR87-3 ซึ่งมีความบกพร่องในการเรียนรู้ การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากจำนวนซ้ำ GGC ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 64-78 ขาดหาย 5 ซ้ำ ทำให้สายพอลิเปปไทด์สายหนึ่งขาดกรดอะมิโนไกลซีนตำแหน่ง 22-26 จำนวน 5 กรดอะมิโน

(3) **c.78insGGC (p.26insG)** หรือ g.29395896_29395894insGGC พบในผู้ป่วย 1 ราย คือ AR21-3 เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบเพิ่มขึ้นที่เกิดจากจำนวนซ้ำ GGC ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 78 เพิ่มขึ้น 1 ซ้ำ ทำให้สายพอลิเปปไทด์สายหนึ่ง มีกรดอะมิโนไกลซีนเพิ่มขึ้นหนึ่งตัวแทรกในตำแหน่ง 26

4) c.50G>T (p.G17V) หรือ g.29395925C>A เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส เกิดที่เอกซอน 1 พบในผู้ป่วย 2 ราย ได้แก่ AR13-3 และ AR76-3 เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เกิดจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 50 จาก G เป็น T ทำให้เปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่ง 17 จากไกลซีน (Glycine, G) เป็นวาลีน (Valine, V) การศึกษาก่อนหน้ารายงานว่า เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบสปีส์ รหัส rs13413205

5) IVS19-29C>G หรือ c.442-29C>G หรือ g.29140548G>C เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส พบในผู้ป่วย 8 ราย ได้แก่ AR11-3, AR23-3, AR41-3, AR76-3, AR87-3, TM14-3, TM16-3 และ TM22-3 โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอน 19 ของยีน alpha-Neurexin 1 จาก C เป็น G ตำแหน่ง -29 นับจาก G ของ AG splice acceptor site หรือตำแหน่ง -29 นับจาก cDNA ตำแหน่ง 442 การศึกษาก่อนหน้ารายงานว่า เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบสปีส์ รหัส rs74387895

6) IVS19-38A>C หรือ c.442-38A>C หรือ g.29140557T>G เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส พบในผู้ป่วย 1 ราย คือ PS4-3 โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอน 19 ของยีน alpha-Neurexin 1 จาก A เป็น C ในตำแหน่ง -38 นับจาก G ของ AG splice acceptor site หรือตำแหน่ง -38 นับจาก cDNA ตำแหน่ง 442 เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูลสปีส์ เช่นกัน

7) IVS22+71C>T หรือ c.933+71C>T หรือ g.29102225G>A พบในผู้ป่วย 117 ราย เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส CT 75 ราย (ร้อยละ 46) และแบบโฮโมไซกัส TT 42 ราย โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอน 22 ของยีน alpha-Neurexin 1 จาก C เป็น T ในตำแหน่ง +71

นับจาก G ของ GT splice donor site หรือตำแหน่ง +71 นับจาก cDNA ตำแหน่งที่ 933 การศึกษาก่อนหน้ารายงานเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบสลับรหัส รหัส rs1363049

8) c-749T>A หรือ g.29396723A>T เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส พบในผู้ป่วย 3 ราย ได้แก่ AR41-3, PS40-3 และ TM44-3 โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' UTR จาก T เป็น A ในตำแหน่ง -749 นับจาก A ของรหัสเริ่มต้น (ATG) การเปลี่ยนแปลงนี้ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูลสลับรหัส

9) c.-675G>T หรือ g.29396649C>A เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส พบในผู้ป่วย 1 ราย คือ AR 48-3 โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' UTR จาก G เป็น T ในตำแหน่ง -675 นับจาก A ของรหัสเริ่มต้น เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูลสลับรหัสเช่นกัน

10) c.-645G>A หรือ g.29396619C>T พบในผู้ป่วย 61 ราย เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส GA 49 ราย (ร้อยละ 36) และแบบโฮโมไซกัส AA 12 ราย โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' UTR จาก G เป็น A ในตำแหน่ง -645 นับจาก A ของรหัสเริ่มต้น การศึกษาก่อนหน้ารายงานเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบสลับรหัส รหัส rs3732049

11) c.-398T>C หรือ g.29396372A>G พบในผู้ป่วย 98 ราย เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส TC 64 ราย (ร้อยละ 43) และแบบโฮโมไซกัส CC 34 ราย โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' UTR จาก T เป็น C ในตำแหน่ง -398 นับจาก A ของรหัสเริ่มต้น การศึกษาก่อนหน้ารายงานเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบสลับรหัส รหัส rs13422484

12) c.-217G>C หรือ g.29396191C>G เป็นแบบเฮเทอโรไซกัส พบในผู้ป่วย 1 ราย คือ TM42-3 โดยเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' UTR จาก G เป็น C ในตำแหน่ง -217 นับจาก A ของรหัสเริ่มต้น เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูลสลับรหัส

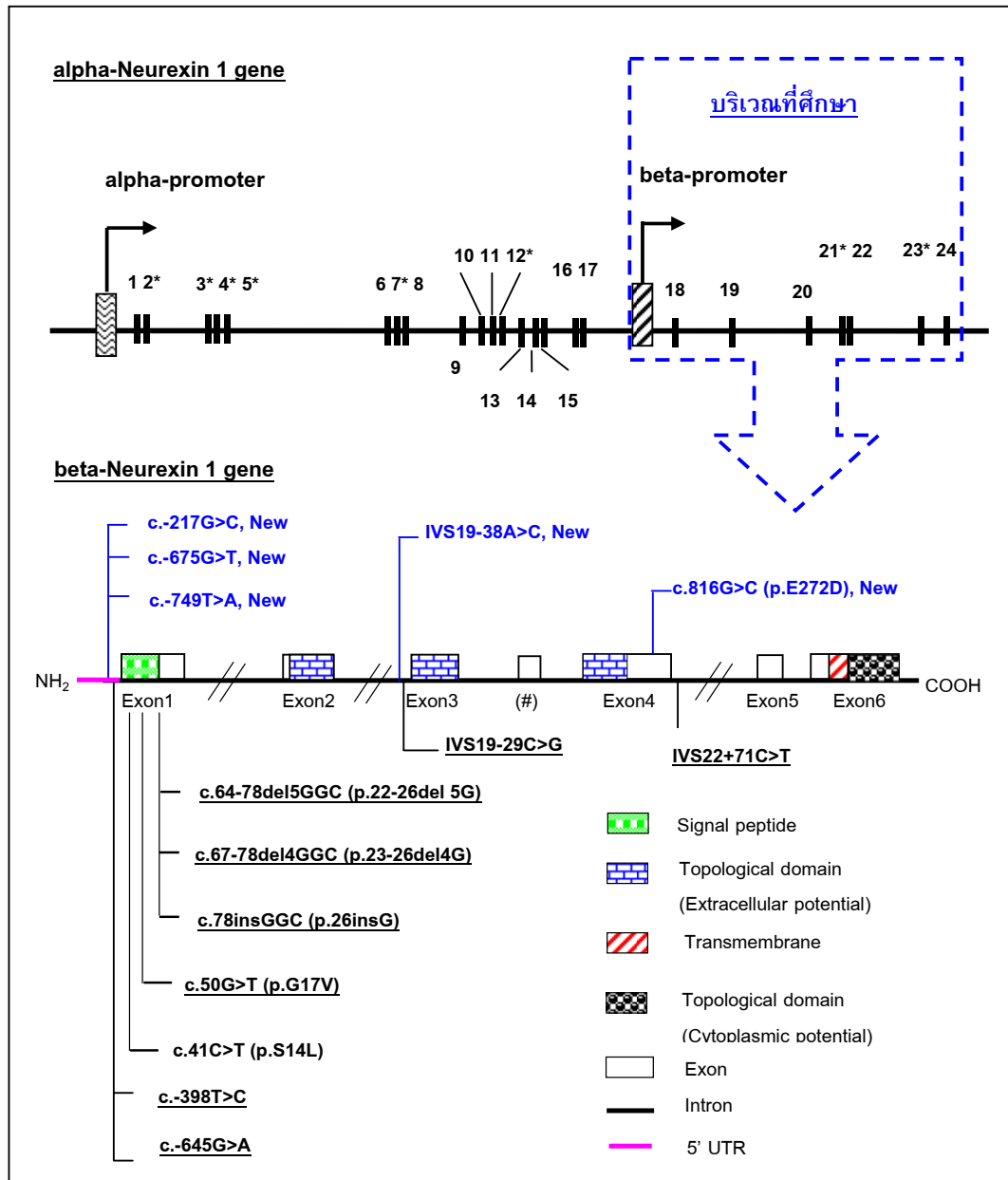
การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่พบในการศึกษานี้ แสดงดังตารางที่ 24 และรูปที่ 9

ตารางที่ 24 สรุปการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน **beta-Neurexin 1**
ในการศึกษา

การเปลี่ยนแปลง		บริเวณที่พบ		ชนิด การเปลี่ยนแปลง
ระดับดีเอ็นเอ	ระดับโปรตีน	beta-Neurexin 1	alpha-Neurexin 1	
c.41C>T	p.S14L	exon 1	exon 18	Missense variant
c.816G>C	p.E272D	exon 4	exon 22	Missense variant*
GGC repeat 1) c.67-78del4GGC 2) c.64-78del5GGC 3) c.78insGGC	1) p.23-26del4G* 2) p.22-26del5G 3) p.26insG	exon 1	exon 18	GGC repeat Variants
c.50G>T	p.G17V	exon 1	exon 18	SNP (rs13413205)
IVS22+71C>T	–	–	intron 22	SNP (rs1363049)
c.-645G>A	–	5' UTR	–	SNP (rs3732049)
c.-398T>C	–	5' UTR	–	SNP (rs13422484)
IVS19-29C>G	–	–	intron 19	SNP (rs74387895)
IVS19-38A>C	–	–	intron 19	Intronic variant*
c-749T>A	–	5' UTR	–	5' UTR variant*
c.-675G>T	–	5' UTR	–	5' UTR variant*
c.-217G>C	–	5' UTR	–	5' UTR variant*

หมายเหตุ: * พบในการศึกษา นี้ ยังไม่เคยรายงานมาก่อน

ตัวเลข IVS เรียกตามเอกซอนของยีน alpha-Neurexin 1



รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน **beta-Neurexin 1**

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ยีน **beta-Neurexin 1** แบบใหม่ แสดงเห็นรูปจำลองยีน ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เคยรายงานแล้ว แสดงได้รูปจำลองยีน ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือความหลากหลายทางพันธุกรรม และ (#) คือ เอกซอน 21 ของยีน **alpha-Neurexin 1** ซึ่งไม่ปรากฏในยีน **beta-Neurexin 1** (GenBank#NM_138735.2) เนื่องจากเป็น alternative splice site

ผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมเด็กไทยที่พบการเปลี่ยนแปลงของยีน beta-Neurexin 1 แบบเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน หรือการเปลี่ยนแปลงที่พบใหม่

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบพบใหม่หรือแบบเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมเด็กไทย 15 ราย เป็นเพศชาย 12 ราย เพศหญิง 3 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยออทิสซึม 14 ราย และผู้ป่วย PDD-NOS 1 ราย แสดงดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงจำนวนผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน หรือการเปลี่ยนแปลงแบบใหม่ในการศึกษานี้

Case ID	Diagnostic	Sex	Missense variant	5'UTR /Intron variants	GGC repeat variants
TM40-3	Autism	M	c.41C>T	N	N
AR15-3	Autism	M	c.816G>C*	N	N
AR23-3	Autism	M	c.816G>C*	IVS19-29C>G (SNP)	N
TM47-3	Autism	M	c.816G>C*	N	N
AR48-3	Autism	M	N	c.-675G>T*	N
AR41-3	Autism	M	N	c-749T>A*, IVS19-29C>G (SNP)	N
PS40-3	Autism	M	N	c-749T>A*	N
TM44-3	Autism	F	N	c-749T>A*	N
TM42-3	Autism	M	N	c.-217G>C*	N
AR87-3	Autism	M	N	IVS19-29C>G (SNP)	c.64-78del5GGC
PS4-3	PDD-NOS	M	N	IVS19-38A>C*	N
AR18-3	Autism	F	N	N	c.67-78del4GGC*
TM19-3	Autism	F	N	N	c.67-78del4GGC*
AR80-3	Autism	M	N	N	c.64-78del5GGC
AR21-3	Autism	M	N	N	c.78insGGC

* รายงานครั้งแรกในการศึกษานี้, ตัวย่อ M คือ ผู้ชาย, F คือ ผู้หญิง และ N คือ ไม่พบ variant

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน (Missense variants)

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน 2 แบบ คือ p.S14L และ p.E272D การเปลี่ยนแปลง p.S14L เกิดที่เอกซอน 1 ส่งผลให้กรดอะมิโนบริเวณ signal peptide domain เปลี่ยนจากเซอรีนเป็นลิวซีน การเปลี่ยนแปลงนี้มีรายงานมาก่อน ส่วนการเปลี่ยนแปลง p.E272D รายงานครั้งแรกในการศึกษานี้ เกิดที่เอกซอน 4 ส่งผลให้กรดอะมิโนบริเวณ extracellular potential domain เปลี่ยนจากกรดกลูตามิกเป็นกรดแอสพาทิก การเปลี่ยนแปลงทั้งสองแบบมีลักษณะคล้ายการกลายพันธุ์ เนื่องจากเปลี่ยนกรดอะมิโนซึ่งอาจกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีน beta-Neurexin 1

ตารางที่ 26 แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนของยีน beta-Neurexin 1

การเปลี่ยนแปลง		บริเวณที่เปลี่ยนแปลง		จำนวนผู้ป่วย	เอกสารอ้างอิง
ระดับดีเอ็นเอ	ระดับโปรตีน	เอกซอน (ดีเอ็นเอ)	โดเมน (โปรตีน)		
c.41C>T	p.S14L	1 (18)	signal peptide	1	Feng et al., 2006 และการศึกษานี้
c.816G>C	p.E272D	4 (22)	extracellular potential	3	การศึกษานี้

หมายเหตุ : เอกซอนในวงเล็บเรียกตามยีน alpha-Neurexin 1

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Polymorphism) ของยีน beta-Neurexin 1

การศึกษานี้พบความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ สนิปส์ และการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC

สนิปส์ 5 แบบ ได้แก่ rs13413205 (p.G17V), rs1363049 (IVS22+71C>T), rs3732049 (c.-645G>A), rs13422484 (c.-398T>C) และ rs74387895 (IVS19-29C>G) สนิปส์บริเวณแอกซอน 1 คือ rs13413205 (p.G17V) เปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่ง 17 โกลซีน เป็นวาเลอีน กรดอะมิโนดังกล่าวอยู่บริเวณ signal peptide domain ของสายโพลีเปปไทด์ beta-Neurexin 1 ส่วนสนิปส์อื่นๆ พบในอินทรอนและ 5' UTR ซึ่งไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนกรดอะมิโน

การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC พบ 3 ลักษณะ ได้แก่ c.67-78del4GGC (p.23-26del4G), c.64-78del5GGC (p.22-26del5G) และ c.78insGGC (p.26insG) เกิดที่แอกซอน 1 ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนบริเวณ signal peptide domain ของสายโพลีเปปไทด์ beta-Neurexin 1 อย่างไรก็ตามแม้การศึกษาก่อนหน้ารายงานการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงแบบขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของจำนวนซ้ำ GGC ทำให้กรดอะมิโนโกลซีนที่เรียงต่อเนื่องกัน (glycine tract) 11 ตัว มีการขาดหายหรือเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน การศึกษานี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำ GGC กับการเกิดภาวะออทิซึมสเปคตรัม โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มประชากรปกติ สรุปความหลากหลายทางพันธุกรรมในการศึกษานี้แสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงชนิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน **beta-Neurexin 1** ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมในการศึกษา

ความหลากหลายทางพันธุกรรม		ตำแหน่งที่เปลี่ยน		ผู้ป่วย (ราย)	เอกสารอ้างอิง
ระดับ ดีเอ็นเอ (-)	ระดับ โปรตีน	เอกซอน (ดีเอ็นเอ)	โดเมน (โปรตีน)		
c.50G>T (rs13413205)	p.G17V	exon 1 (18)	signal peptide	2	Feng et al., 2006 SNP database
IVS19-29C>G (rs74387895)	-	- (intron 19)	-	8	SNP database (+) C[0.114] G[0.886]
IVS22+71C>T (rs1363049)	-	- (intron 22)	-	117	SNP database (-) C[0.411] T[0.589]
c.-645G>A (rs3732049)	-	5' UTR	-	61	SNP database (-) G[0.876] A[0.124]
c.-398T>C (rs13422484)	-	5' UTR	-	98	SNP database (+) A[0.5] G[0.5]
c.67-78del4GGC	p.23-26del4G	exon 1 (18)	signal peptide	2	การศึกษานี้
c.64-78del5GGC	p.22-26del5G	exon 1 (18)	signal peptide	2	Feng et al., 2006
c.78insGGC	p.26insG	exon 1 (18)	signal peptide	1	Feng et al., 2006

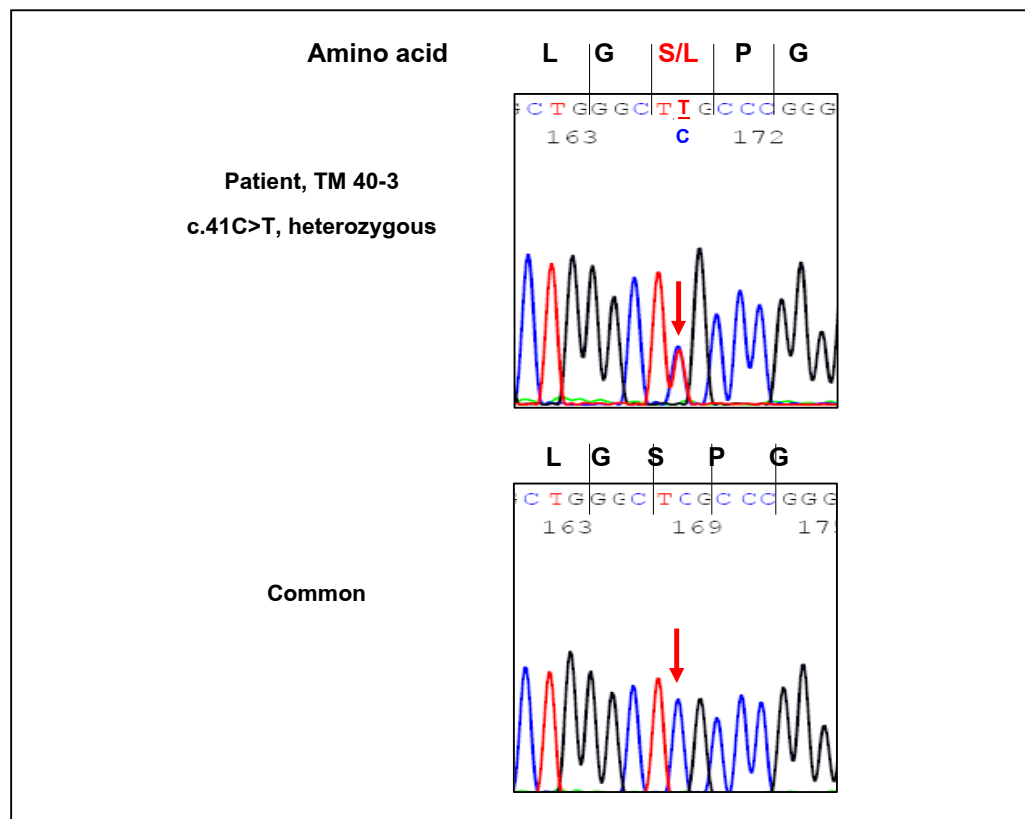
หมายเหตุ: เอกซอนในวงเล็บเรียกตามยีน alpha-Neurexin 1

(+) / (-) หมายถึง strand ของลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (refseq)

อิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

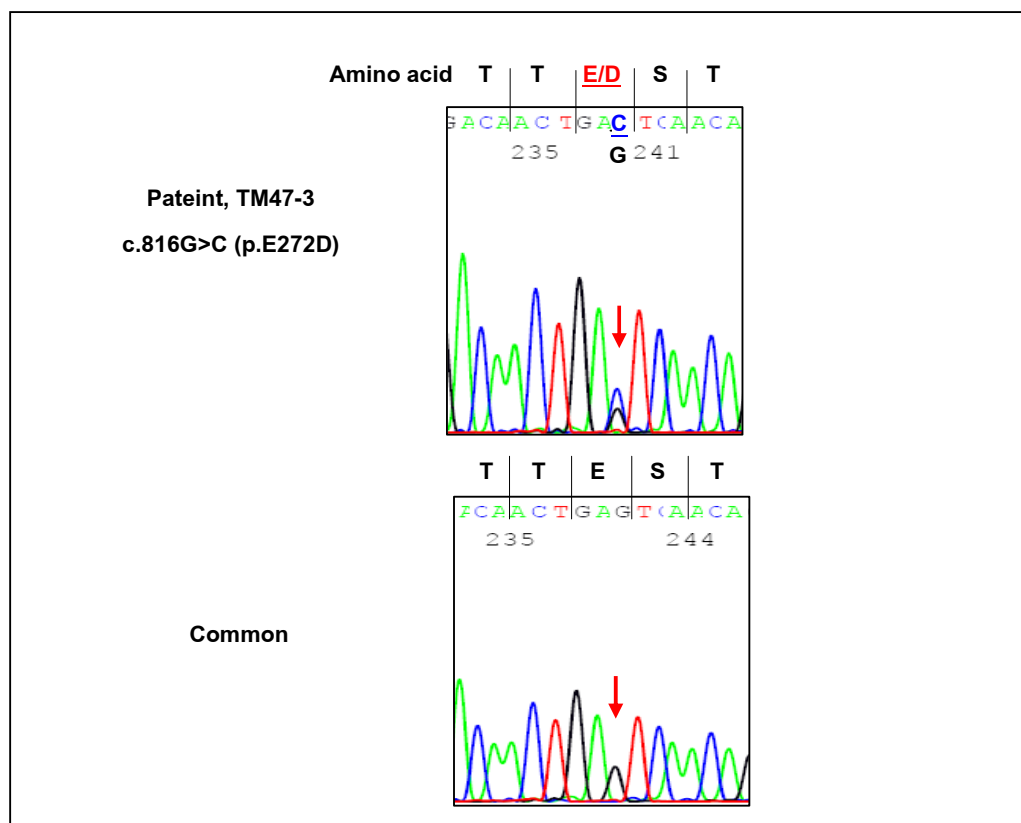
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็น ออทิสซึมสเปกตรัม พบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS แสดงด้วยอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมต่อไปนี้

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน beta-Neurexin 1 พบการเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์แบบ c.41C>T (p.S14L) ในผู้ป่วยออทิสซึม TM40-3 แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ C.41C>T (p.S14L) ของยีน beta-Neurexin 1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิสซึม TM40-3 (บน) เปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง) การแทนที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 41 จาก C เป็น T ทำให้กรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ตำแหน่ง 14 สายหนึ่งเปลี่ยนจากเซอรีน (S) เป็นลิวซีน (L) ลูกศรสีแดง คือนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่

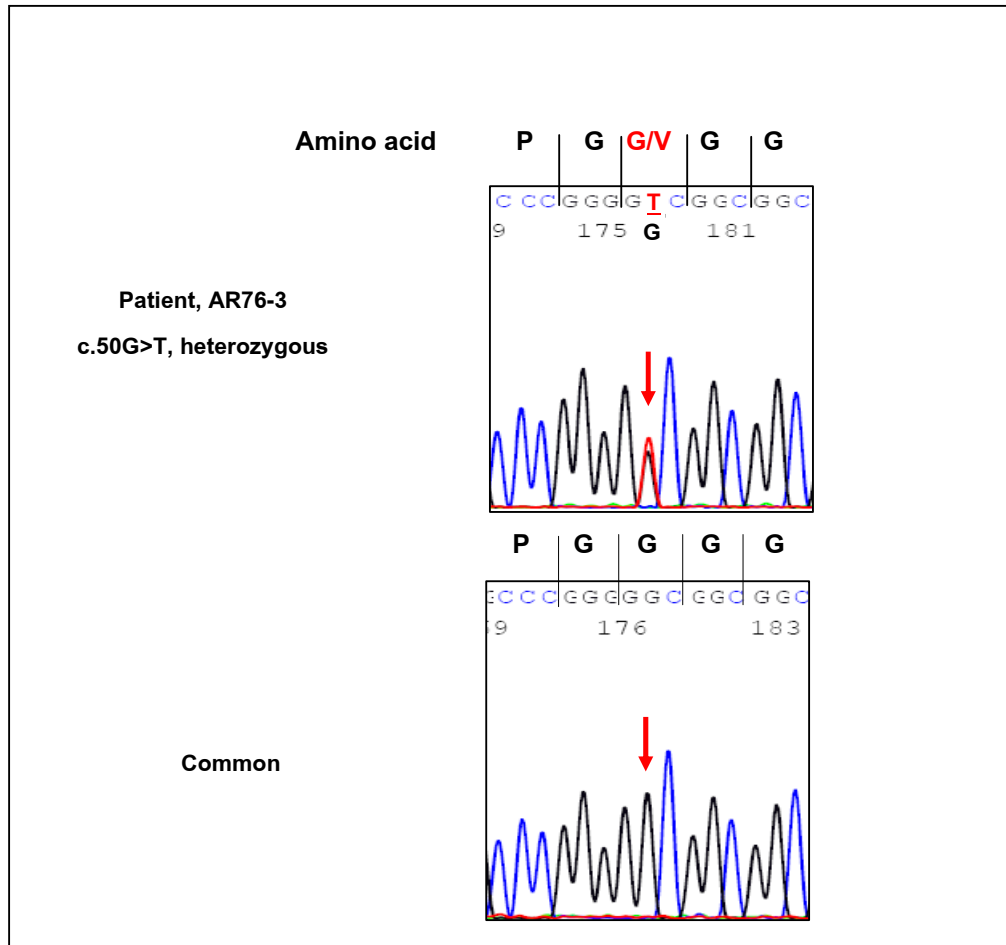
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบ c.816G>C (p.E272D) ในผู้ป่วยออทิสซึม 3 ราย ได้แก่ AR15-3, AR23-3 และ TM47-3 ตัวอย่างอิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมของผู้ป่วย TM47-3 แสดงดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ c.816G>C (p.E272D) ของยีน

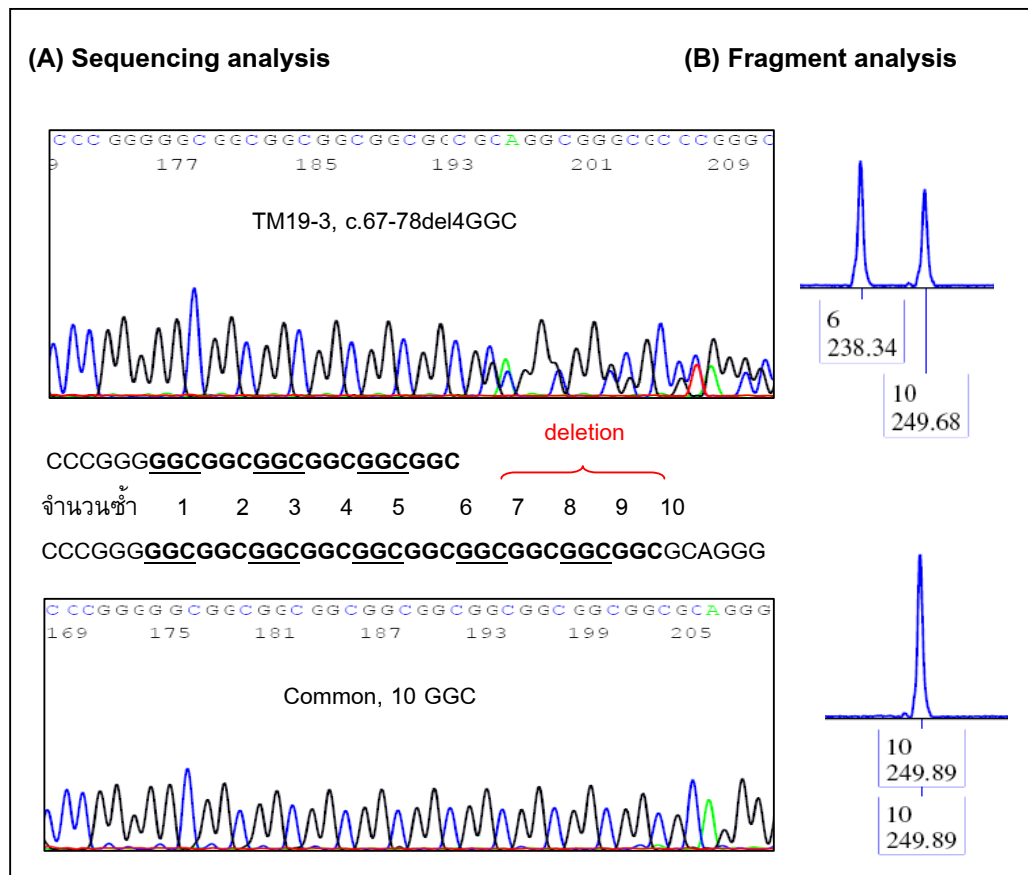
beta-Neurexin 1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กทรอนิกส์เฟอโรแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิสซึม TM47-3 (บน) เปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง) การแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 816 จาก G เป็น C ทำให้กรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ตำแหน่ง 272 สายหนึ่งเปลี่ยนจากการดกลูตามิค (E) เป็นกรดแอสพาทิก (D) ลุกครสีแดง คือนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน beta-Neurexin 1 พบการเปลี่ยนแปลงแบบสลับ rs13413205 (c.50G>T, p.G17V) ในผู้ป่วยออทิสซึม 2 ราย ได้แก่ AR13-3 และ AR76-3 ตัวอย่างอิเล็กโทรเฟอโรแกรมของผู้ป่วย AR76-3 แสดงดังรูปที่ 12



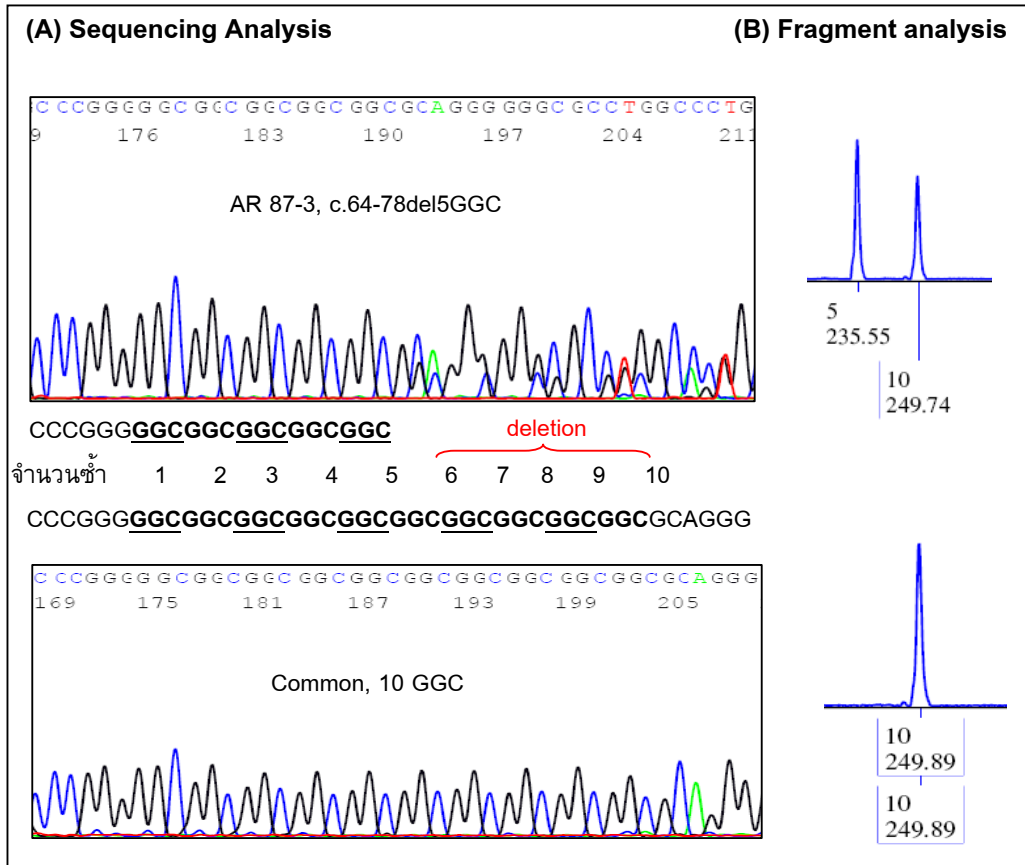
รูปที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบสลับ rs13413205, (c.50G>T, p.G17V) ยีน beta-Neurexin 1 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อิเล็กโทรเฟอโรแกรม แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิสซึม AR76-3 (บน) เปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง) การแทนที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 50 จาก G เป็น T ทำให้กรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ตำแหน่ง 175 สายหนึ่ง เปลี่ยนจากไกลซีน (G) เป็นวาลีน (V) ลูกศรสีแดงคือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการแทนที่

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม TM19-3 และ AR18-3 พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบขาดหาย 4 ซ้ำ c.67-78del4GGC (p.23-26del4G) แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบ c.67-78del4GGC ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ (A) ตัวอย่างอิเล็กโทรแกรมแสดงจำนวนซ้ำ GGC ของยีน beta-Neurexin 1 ผู้ป่วยออทิซึม TM19-3 แสดงจำนวนซ้ำ GGC 6 ซ้ำ (บน) เปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง) แสดงจำนวน GGC 10 ซ้ำ โดยจำนวนซ้ำ GGC ของผู้ป่วยตั้งแต่ลำดับที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนกัน เนื่องจากโครโมโซมข้างหนึ่งมีการขาดหายจำนวน 4 ซ้ำ (B) การวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ ผู้ป่วย TM19-3 (บน) แสดงจำนวนซ้ำ GGC ขาดหาย 4 ซ้ำ ทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บางส่วนขนาดลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึม AR87-3 และ AR80-3 พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบขาดหายจำนวน 5 ซ้ำ c.64-78del5GGC (p.22-26del5G) ตัวอย่างผลการศึกษาในผู้ป่วย AR87-3 แสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แบบ c.64-78del5GGC ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์จำนวนซ้ำ GGC ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ (A) ตัวอย่างอิเล็กโตรเฟอโรแกรมแสดงจำนวนซ้ำ GGC ของยีน beta-Neurexin 1 ผู้ป่วยออทิซึม AR87-3 แสดงจำนวนซ้ำ 5 ซ้ำ (บน) เปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง) แสดงจำนวนซ้ำ 10 ซ้ำ โดยจำนวนซ้ำ GGC ของผู้ป่วยตั้งแต่ลำดับที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนกัน เนื่องจากโครโมโซมข้างหนึ่งมีการขาดหาย 5 ซ้ำ (B) การวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีพีซีอาร์ฟลูออเรสเซนซ์ในผู้ป่วย AR87-3 (บน) แสดงจำนวนซ้ำ GGC ขาดหาย 5 ซ้ำ ทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บางส่วนขนาดลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับคนส่วนใหญ่ (ล่าง)

การยืนยันการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

การพิจารณาว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เป็นการกลายพันธุ์หรือไม่ จะพิจารณาจากเงื่อนไขของการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโน โดยทั่วไปจะพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนกรดอะมิโนในตำแหน่งอนุรักษ์ รวมถึงการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวและการศึกษาในกลุ่มประชากรปกติ ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์

การถ่ายทอดในครอบครัว

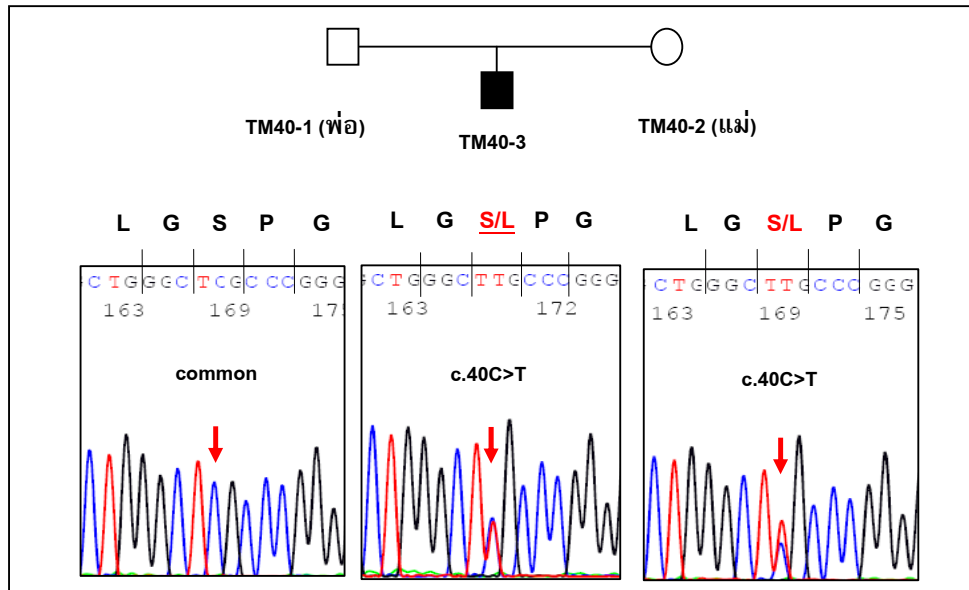
การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ยีน beta-Neurexin 1 จำนวน 3 แบบ มีลักษณะคล้ายการกลายพันธุ์ คือ p.S14L, p.E272D และ GGC repeat จึงศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวเพื่อให้ทราบถึงต้นกำเนิดของการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ

ตารางที่ 28 แสดงการถ่ายทอดในครอบครัวของผู้ป่วยที่พบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 ที่มีลักษณะคล้ายการกลายพันธุ์

การเปลี่ยนแปลง	ผู้ป่วย	วิธีการศึกษา ในพ่อแม่	จีโนไทป์			สรุป ถ่ายทอด
			ผู้ป่วย	พ่อ	แม่	
1.c.41C>T(p.S14L)	TM40-3	Sequencing	CT	CC	CT	จากแม่
2.c.816G>C (p.E272D)	1) AR15-3	Sequencing / PCR-RFLP	GC	GG	GC	จากแม่
	2) AR23-3		GC	GC	GG	จากพ่อ
	3) TM47-3		GC	GG	GC	จากแม่
3. GGC repeat (common 10 10)						
c.67-78del4GGC (p.23-26del 4G)	1) AR18-3	Fragment analysis	6 10	6 10	10 10	จากพ่อ
	2) TM19-3		6 10	10 10	6 10	จากแม่
c.64-78del5GGC (p.22-26del 5G)	1) AR87-3		5 10	5 10	10 10	จากพ่อ
	2) AR80-3		5 10	5 10	10 10	จากพ่อ
c.78insGGC (p.26insG)	AR21-3		11 10	10 10	11 10	จากแม่

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวที่พบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโน แสดงดังรูปต่อไปนี้

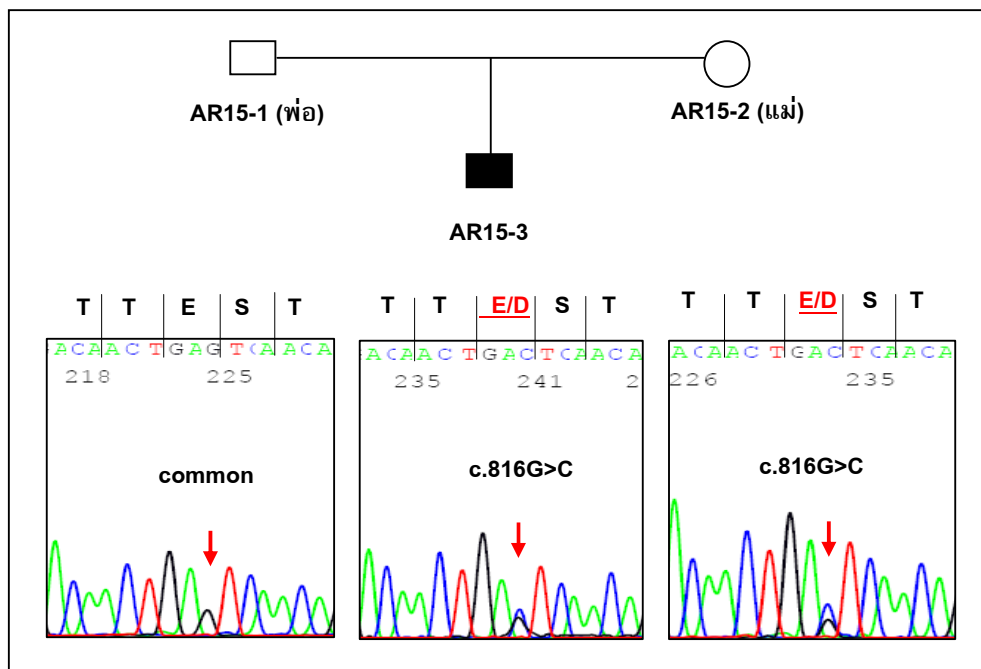
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัวของผู้ป่วย TM40-3 ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบ c.41C>T (p.S14L) แสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 แสดงการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลง c.41C>T (p.S14L) ยีน beta-Neurexin 1

ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม TM40-3 ลูกครึ่งสีแดงแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแม่ (TM40-2) แสดงการเปลี่ยนแปลงแบบ c.41C>T เป็นแบบเฮเทอโรไซกัสเช่นเดียวกับผู้ป่วย(TM40-3) ส่วนพ่อ (TM40-1) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนคนส่วนใหญ่

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อดูการถ่ายทอดในครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ c.816G>C (p.E272D) ในผู้ป่วยออทิซึม AR15-3 แสดงดังรูปที่ 17 ส่วนครอบครัวของผู้ป่วย AR23-3 และ TM47-3 ใช้วิธีการพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (แสดงในรูปที่ 21)



รูปที่ 17 แสดงการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ c.816G>C (p.E272D) ยีน beta-Neurexin 1 ในครอบครัวผู้ป่วยออทิซึม AR15-3 ลูกศรสีแดงแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ พ่อแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ปกติ แม่และผู้ป่วย AR15-3 เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 816 เปลี่ยนจากเบส G เป็นเบส C แบบเฮเทอโรไซกัส

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ด้วยโปรแกรมกลุ่ม multiple alignment ทำให้ทราบกรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนกรดอะมิโน 2 แบบ คือ p.S14L และ p.E272D มีลักษณะคล้ายการกลายพันธุ์ จึงเปรียบเทียบกรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ด้วยโปรแกรม ClustalW แสดงดังต่อไปนี้

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ณ ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลง p.S14L แสดงดังรูปที่ 18

```

NRX1B_RAT      MYQRMLRCGAELSGGGSSGGAG---GRLALLWIVPLTSLGLLGVAWGASSLGAAHHIH 56
Mus musculus  MYQRMLRCGADLSGGGSGGGAG---GRLALIWIWVPLTSLGLLGVAWGASSLGAAHHIH 56
BOVIN         MYQRMLRCGAELSGGGG-GGGAG---GRLALLWIVPLTSLGLLGVAWGASSLGAAHHIH 55
Humans       MYQRMLRCGAELSGGGGGGGGGGAGGRLALLWIVPLTSLGLLGVAWGASSLGAAHHIH 60
Dog          MYPRMLRCGAELSGGGGGGGG--GAGGRLALLWIVPLTSLGLLGVAWGASSLGAAHHIH 58
  
```

รูปที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 14 ของสายพอลิเปปไทด์

beta-Neurexin 1 กับสิ่งมีชีวิตอื่น ตำแหน่งที่แรงเงาสีเหลือง คือตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนแบบ p.S14L เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด เช่น หนู (mouse และ rat) วัว และสุนัข

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ Neurexin 1 กับ
 สิ่งมีชีวิตอื่น ณ ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลง p.E272D แสดงดังรูปที่ 19

	1355	1365	1375	1385	1395
RAT_NRX1_B	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
Mouse_mCG15583_CRA_b	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
cattle_nrxn1_B	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGNSPTK-EP
dog_similar_nrxn1_B	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
Homo_sapiens_NRXN1_B	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
mouse_nrxn1_A	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
rat_nrxn1_A	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
horse_nrxn1	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
Homo_sapiens_NRXN1_A	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
cattle_nrxn1	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
rhesus_monkey_nrxn1_B	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
dog_nrxn1_A	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
opossum_nrxn1	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTAR	RGKPPTK-EP
chicken_nrxn1_A	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSVMET	TTTLATSTAR	RGKAPTK-EP
frog_LOC100127647	LVGDVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSIMET	TTTLATSTR-	--KSPTR-EP
Taeniopygia_guttata_nrxn1	LVGEVPSS-M	TTESTATAMQ	SEMSTSVMET	TTTLATSTAR	RGKAPTK-EP
chimpanzee_nrxn1I	LVGEGPSVLL	SAETTATLTL	ADMATTIMET	TTTMATTTTR	RGRSPTLRDS
zebrafish_nrxn1a_B	LVGDMPSSSI	TPQSSVSAAG	NRSETSFSIT	DITTTTASNR	QGKQTTT---

รูปที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 272 ของสายพอลิเปปไทด์ **beta-Neurexin 1** กับสิ่งมีชีวิตอื่น ตำแหน่งที่แรงงาสีเหลือง คือตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนแบบ p.E272D เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ในมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ได้แก่ หนู วัว หมา ม้า ลิง สัตว์คล้ายกระรอก สัตว์ปีก (ไก่ และนก finch) และกบ

การทดสอบในประชากรปกติ

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลง 3 แบบ ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบนสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 คือ p.S14L, p.E272D และการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC (c.67-8del4GGC, c.64-78del5GGC และ c.78insGGC) จึงทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในกลุ่มควบคุม ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงแบบ p.S14L ศึกษาในกลุ่มควบคุม ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp1286I* แสดงดังรูปที่ 20 การศึกษานี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงแบบ p.S14L ในกลุ่มควบคุม 310 ราย แสดงดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 แสดงผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลงแบบ c.41C>T ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเด็กไทย และกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง	จีโนไทป์ (ราย)		รวม
	CC	CT	
กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม	169	1	170
กลุ่มควบคุม	310	0	310

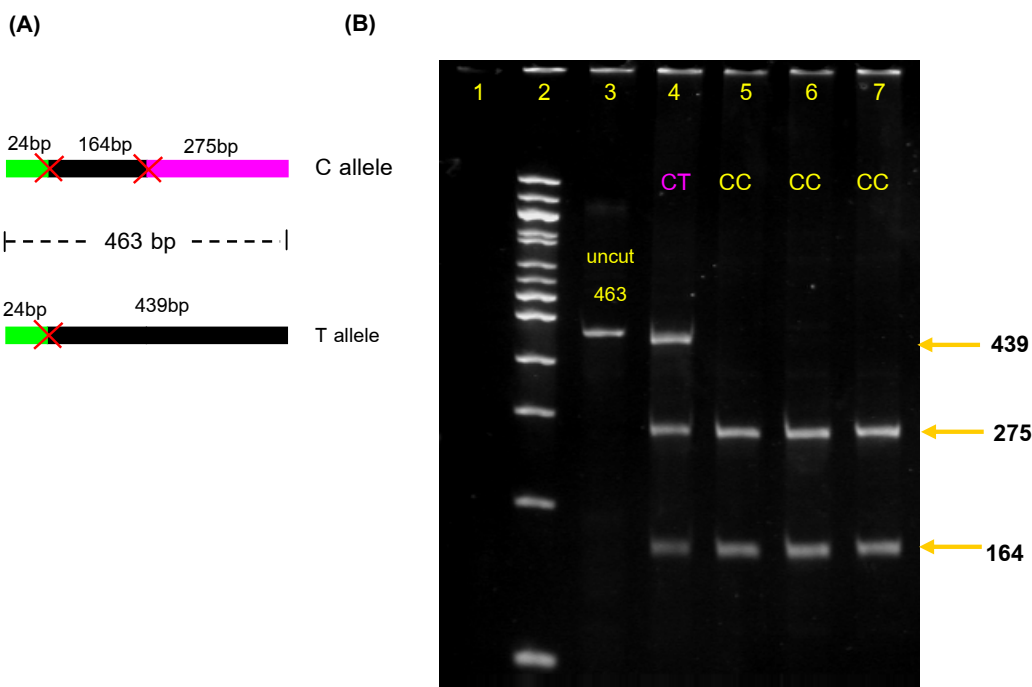
การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Chi-square test ด้วยโปรแกรม Fisher's Exact Test ออนไลน์ (Langsrud, 2010) ให้ค่า p -value = 0.354 (1/170 vs 0/310) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของจีโนไทป์แบบ CC และ CT ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงแบบ c.816G>C (p.E272D) ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์ เอฟแอลพี (แสดงดังรูปที่ 21) ในกลุ่มควบคุม 198 คน (396 แอลลีล) พบการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มควบคุม 6 คน ความถี่แอลลีล C คิดเป็นร้อยละ 1.5 (6/396 แอลลีล) ของประชากรปกติ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 แสดงผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.816G>C ในกลุ่มผู้ป่วย ออทิสซึมสเปคตรัมเด็กไทย และกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง	จีโนไทป์ (ราย)		รวม
	GG	GC	
กลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมสเปคตรัม	167	3	170
กลุ่มควบคุม	192	6	198

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Chi-square test ด้วยโปรแกรม Fisher's Exact Test ออนไลน์ (Langsrud, 2010) ให้ค่า p -value =0.87 (3/170 vs. 6/198) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของจีโนไทป์แบบ GG และ GC ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย



รูปที่ 20 แสดงการทดสอบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ c.41C>T (p.S14L) ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

(A) แสดงตำแหน่งการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ดีเอ็นเอแบบทั่วไป (แอลลีล C) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp1286I* ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 463 bp ได้ 2 ตำแหน่ง เกิดแถบ ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 24 bp, 164 bp และ 275 bp ส่วนดีเอ็นเอที่มี c.41C>T (แอลลีล T) เอนไซม์ *Bsp1286I* ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 463 bp ได้เพียง 1 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 24 bp และ 439 bp โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 24 bp มีขนาดเล็กจึงไม่แสดงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล (B) รูปโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

แถวที่ 1: คือ negative control

แถวที่ 2: คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

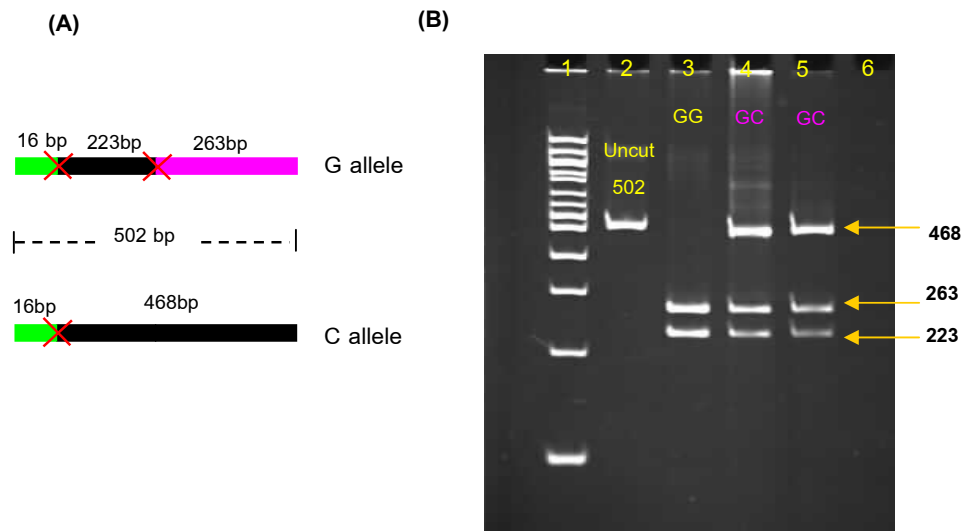
แถวที่ 3: คือ แถบดีเอ็นเอที่ไม่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bsp1286I* ขนาด 463 bp

แถวที่ 4: คือ แถบดีเอ็นเอผู้ป่วยออทิซึม TM 40-3 ผลจีโนไทป์ CT

แถวที่ 5: คือ แถบดีเอ็นเอกลุ่มควบคุม ผลจีโนไทป์ CC

แถวที่ 6: คือ แถบดีเอ็นเอกลุ่มควบคุม ผลจีโนไทป์ CC

แถวที่ 7: คือ แถบดีเอ็นเอกลุ่มควบคุม ผลจีโนไทป์ CC



รูปที่ 21 แสดงการทดสอบการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ c.816G>C

(p.E272D) ด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

(A) แสดงตำแหน่งการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ดีเอ็นเอแบบทั่วไป (แอลลีล G) เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ddel* ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 502 bp ได้ 2 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 16 bp, 223 bp และ 263 bp ส่วนดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.816G>C. (แอลลีล C) เอนไซม์ *Ddel* ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 502 bp ได้เพียง 1 ตำแหน่ง เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 16 bp และ 468 bp โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 16 bp มีขนาดเล็กจึงไม่แสดงบนโพลีอะครีลาไมด์เจล (B) รูปโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

แถวที่ 1: คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

แถวที่ 2: คือ แถบดีเอ็นเอที่ไม่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ddel* ขนาด 502 bp

แถวที่ 3: คือ แถบดีเอ็นเอกลุ่มควบคุม ผลจีโนไทป์ GG

แถวที่ 4: คือ แถบดีเอ็นเอผู้ป่วยออทิซึม TM47-3 ผลจีโนไทป์ GC

แถวที่ 5: คือ แถบดีเอ็นเอแม่ผู้ป่วย TM47-2 ผลจีโนไทป์ GC

แถวที่ 6: คือ negative control

การศึกษานี้ตรวจสอบจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มประชากรควบคุมจำนวน 118 คน (236 แอลลีล) ด้วยวิธี Fragment analysis การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงแบบเพิ่มจำนวนซ้ำ GGC 1 ซ้ำ คือ c.78insGGC ในกลุ่มควบคุม 3 คน คิดเป็นความถี่แอลลีล ร้อยละ 1.27 (3/236 แอลลีล) ของประชากรปกติ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำแบบอื่นๆ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 แสดงผลการตรวจสอบจีโนไทป์การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเด็กไทย และกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง	จีโนไทป์ (คน)				รวม
	(10 , 10) ส่วนใหญ่	(10 , 6) c.67-8del4GGC	(10 , 5) c.64-78del5GGC	(10 , 11) c.78insGGC	
กลุ่มผู้ป่วย ออทิซึมสเปกตรัม	165	2	2	1	170
กลุ่มควบคุม	115	0	0	3	118

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Chi-square test ด้วยโปรแกรม Fisher's Exact Test ออนไลน์ (Langsrud, 2010) ให้ค่า p -value = 0.57 (5/170 vs. 3/118) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย

บทที่ 4 บทวิจารณ์

การกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเด็กไทย

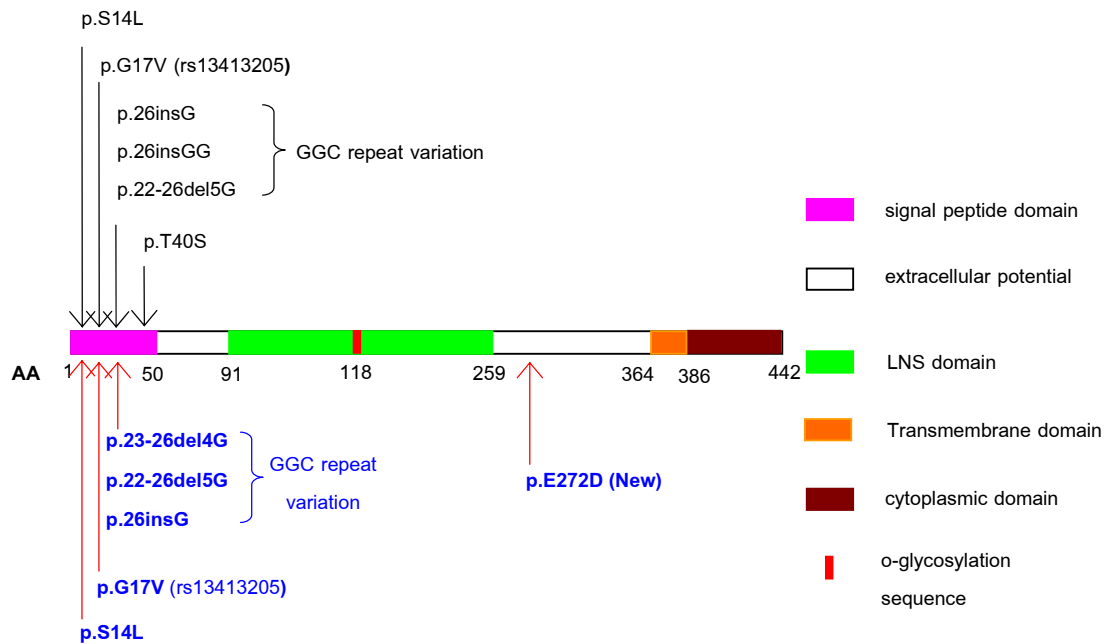
การศึกษานี้เป็นครั้งแรกในการตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเด็กไทย 170 ราย ผลการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ทั้งหมด 12 แบบ จัดเป็น 4 กลุ่ม คือ (1) การเปลี่ยนแปลงแบบเปลี่ยนกรดอะมิโน ได้แก่ p.S14L และ p.E272D (2) การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC 3 ลักษณะ ได้แก่ c.67-78del4GGC (p.23-26del4G), c.64-78del5GGC (p.22-26del5G) และ c.78insGGC (p.26insG) (3) สนิปส์ 5 แบบ ได้แก่ rs13413205 (p.G17V), rs74387895 (IVS19-29C>G), rs1363049 (IVS22+71C>T), rs3732049 (c.-645G>A) และ rs13422484 (c.-398T>C) (4) การเปลี่ยนแปลงบริเวณที่ไม่แปลรหัสโปรตีน 4 แบบ ได้แก่ IVS19-38A>C, c.-217G>C, c.-749T>A และ c.-675G>T

การเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า ได้แก่ p.S14L, rs13413205 และการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แต่ไม่พบ p.T40S ที่เคยรายงานแล้ว (Feng et al., 2006) ส่วนการเปลี่ยนแปลง p.E272D พบครั้งแรกในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายการกลายพันธุ์ตามทฤษฎีมีเพียง 3 แบบ คือ p.S14L, การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC และ p.E272D เนื่องจากเกิดที่บริเวณ CDS ในเอกซอน 1 (เอกซอน 18 ของ alpha-Neurexin 1) และเอกซอน 4 (เอกซอน 22 ของ alpha-Neurexin 1) ส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยน จึงอาจกระทบการทำงานของโปรตีน

โปรตีน beta-Neurexin 1 ทำหน้าที่เป็น transmembrane อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ประสาท โปรตีน beta-Neurexin 1 มี 442 กรดอะมิโน โครงสร้างประกอบด้วย 5 โดเมน คือ 1) N-terminal signal peptide 2) LNS domain (Laminin, Neurexin, Sex-hormone-binding protein) 3) O-glycosylation sequence (CH) 4) transmembrane domain (TM) และ 5) cytoplasmic domain (CD) ฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot รายงานลำดับกรดอะมิโน 1-50 คือ บริเวณ N-terminal signal peptide และลำดับกรดอะมิโน 91-259 คือบริเวณ LNS domain ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Neuroligins (Craig and Kang, 2007) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง p.S14L และการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC จึงอยู่ในบริเวณ signal peptide domain และ p.E272D อยู่ในบริเวณที่ใกล้โดเมนสำคัญ คือ LNS domain แสดงดังรูปที่ 22

signal peptide คือ ลำดับกรดอะมิโนที่แสดงบนสายโปรตีน ทำหน้าที่เป็นสัญญาณกำหนดว่า สายโปรตีนจะเคลื่อนที่ไปทำหน้าที่เป็นโปรตีนแบบ secreted proteins หรือเคลื่อนที่ไปยัง endoplasmic reticulum เพื่อปรับปรุงโครงสร้าง (post translation) และทำหน้าที่เป็น transmembrane เช่น โปรตีนกลุ่ม cell surface receptor โครงสร้าง signal peptide แบบทั่วไป มีกรดอะมิโนประมาณ 16-30 ตัว ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 1) *n*-region (N-terminal region) 5-8 กรดอะมิโน มีลักษณะชอบน้ำเป็นประจวบ 2) *h*-region (hydrophobic region) 5-8 กรดอะมิโน มีลักษณะไม่ชอบน้ำ 3) *c*-region (C terminus region) 6 กรดอะมิโน เป็นบริเวณที่มี cleavage site การเคลื่อนที่ของสายโปรตีนไปยัง ER จะอาศัยการรวมตัวกับ SRP (signal recognition particle) และโปรตีนกลุ่ม transmembrane จะมี hydrophobic region ที่ยาวกว่ากลุ่ม secreted proteins ลักษณะนี้เป็นกลไกที่ควบคุมไม่ให้สายโปรตีนหลังออกนอกเซลล์ ยังคงค้างอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Strachan and Read, 2004) มีรายงานว่าปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน Neurexin I β , II β และ III β ในหนูและวัว มีลำดับกรดอะมิโนของ signal peptide ที่แตกต่างกัน และแตกต่างจาก signal peptide ทั่วไป โดยมีลำดับกรดอะมิโนที่ยาวกว่าแบบทั่วไป (Neurexin I β และ II β 46 กรดอะมิโน, III β 35 กรดอะมิโน) และประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่ม short chain จำนวนมาก โครงสร้างที่แตกต่างจากแบบทั่วไปนี้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างความหลากหลายของโปรตีน (Ullrich et al., 1995) จากการเปรียบเทียบกรดอะมิโนส่วนปลาย N-terminal ของโปรตีน beta-Neurexin 1, 2 และ 3 ในมนุษย์ พบว่าลำดับกรดอะมิโนส่วนปลาย N-terminal ของโปรตีนทั้งสามชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งให้ผลเหมือนกับโปรตีน beta-Neurexin ในหนูและวัว แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณ signal peptide ของโปรตีนมนุษย์แต่ละไอโซฟอร์ม (beta-Neurexin 1, 2 และ 3) กับสิ่งมีชีวิตอื่น (หนูและวัว) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งให้เห็นโปรตีนแต่ละชนิด (Neurexin 1, 2 และ 3) ของหนู วัว และมนุษย์มีวิวัฒนาการร่วมกัน นั่นหมายถึงการมีหน้าที่ที่คล้ายกัน อาจสรุปได้ว่า signal peptide ของโปรตีน Neurexins 1, 2 และ 3 ไม่ใช่จำนวน และลำดับกรดอะมิโนที่แน่นอน เป็นสัญญาณเหมือน signal peptide แบบทั่วไป แต่ใช้คุณสมบัติของความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในการทำหน้าที่มากกว่า ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ส่งผลต่อคุณสมบัติดังกล่าวอาจกระทบต่อการลำเลียงโปรตีนภายในเซลล์

การเปลี่ยนแปลงบริเวณ CDS ของยีน beta-Neurexin 1 ที่เคยรายงานแล้ว



การเปลี่ยนแปลงบริเวณ CDS ของยีน beta-Neurexin 1 ในการศึกษา

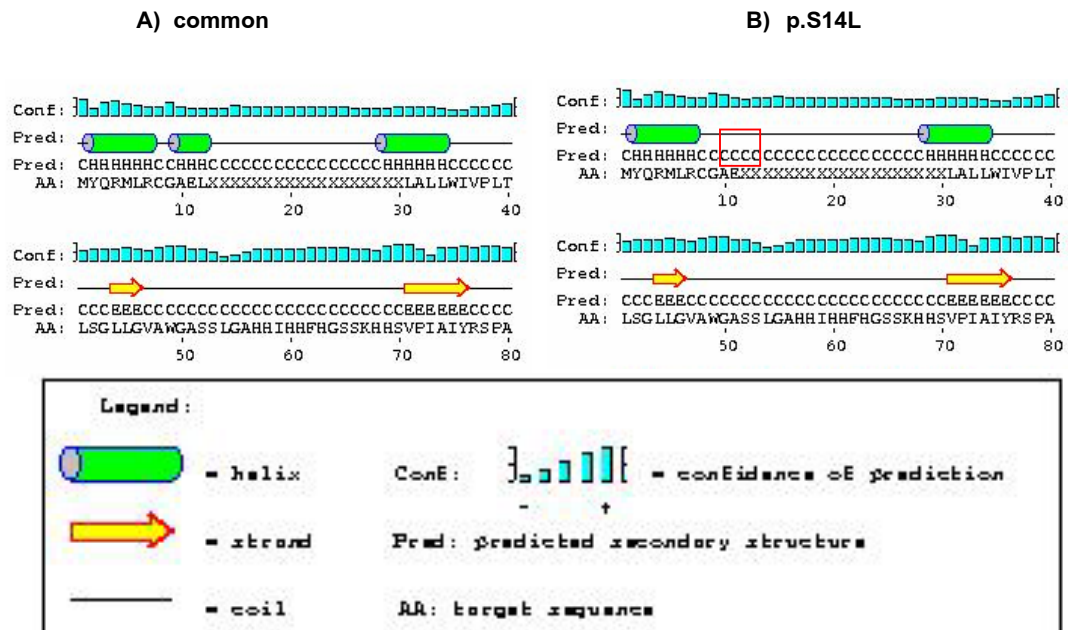
รูปที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ยีน beta-Neurexin 1

ด้านบนของรูปจำลองแสดงการเปลี่ยนแปลงที่เคยรายงานแล้ว ด้านล่างของรูปจำลองแสดงการเปลี่ยนแปลงในการศึกษานี้

การเปลี่ยนแปลงที่อาจเป็นการกลายพันธุ์ p.S14L (c.41C>T)

p.S14L พบในผู้ป่วยออทิซึมเด็กไทย 1 ราย คิดเป็นความถี่ร้อยละ 0.59 (1/170) แต่เคยรายงานในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียนในความถี่ร้อยละ 1.97 (3/203) (Feng et al., 2006) ความถี่ p.S14L ในผู้ป่วยชาวไทยต่ำกว่า อาจเกิดจากกลุ่มตัวอย่างจำนวนน้อยกว่า รวมถึงเกณฑ์การเลือกตัวอย่างที่ต่างกัน (การศึกษาที่ใช้กลุ่มตัวอย่างออทิซึมและ PDD-NOS)

p.S14L ทำให้เปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่ง 14 (GenBank#NP_620072.1) จากกรดอะมิโนเซอรีน (S) เป็นกรดอะมิโนลิซีน (L) อยู่บริเวณสำคัญของโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่เรียกว่า signal peptide domain เซอรีนเป็นกรดอะมิโนมีขั้วและไม่มีประจุ (polar/uncharged) แต่ลิซีนเป็นกรดอะมิโนไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ (nonpolar/hydrophobic) การเปลี่ยนกรดอะมิโนข้ามกลุ่มน่าจะมีผลต่อโครงสร้างและการขนส่งโปรตีนภายในเซลล์ การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิด้วยโปรแกรม Predict Secondary Structure (PSIPRED v2.6) พบว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนเซอรีนเป็นลิซีน ทำให้โครงสร้างทุติยภูมิของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 10-12 เปลี่ยนจาก helix เป็น coil แสดงดังรูปที่ 23 จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน beta-Neurexin 1 กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง 14 อนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนมที่มีสมองซับซ้อน เช่น มนุษย์ หนู วัว และสุนัข เป็นต้น แสดงดังรูปที่ 18 ข้อมูลข้างต้นแสดงว่าการเปลี่ยนแปลง p.S14L อาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างการทำงานของ signal peptide domain ซึ่งรายงานการกลายพันธุ์ดังกล่าวในโรคพันธุกรรมประมาณ 26 โรค เชื่อว่าความผิดปกติของ signal peptide มีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนภายในเซลล์ (Jarjanazi et al., 2008) รวมถึงมีรายงานการเปลี่ยนแปลง signal peptide ของโปรตีน GHRH receptor แบบ p.V10G ส่งผลให้โปรตีน GHRH receptor ไม่ถูกทำลายไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งพบในผู้ป่วยโรค Growth hormone deficiency (IGHD-IB) (Godi et al., 2010)



รูปที่ 23 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L เปรียบเทียบกับแบบทั่วไป ด้วยโปรแกรม Predict Secondary Structure (PSIPRED v2.6) (A) โครงสร้างทุติยภูมิโปรตีน beta-Neurexin 1 แบบทั่วไป (B) โครงสร้างทุติยภูมิโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L ซึ่งส่งผลให้โครงสร้างทุติยภูมิบริเวณกรดอะมิโนที่ 10-12 เปลี่ยนจาก helix เป็น coil (กรอบสีเขียว) กรดอะมิโนที่แทนด้วยเครื่องหมาย X หมายถึง mask low complexity regions ซึ่งเป็นการตั้งค่า default จากโปรแกรม

การศึกษานี้ทำนายผลกระทบของ p.S14L ต่อหน้าที่ signal peptide ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 ผลการทำนายพบว่า p.S14L ทำให้โอกาสการเป็น signal peptide ของลำดับกรดอะมิโนปลาย N-terminal ลดลงเล็กน้อย (ร้อยละ 0.9) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนแบบปกติ และเมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่า D (% D value change คือ ค่าที่บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่เป็น signal peptide) พบว่าค่า D เพิ่มขึ้น ร้อยละ 5.2 เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนแบบปกติ (แสดงดังตารางที่ 32) และการทำนายด้วยโมเดล SignalP-HMM Prediction รายงานว่า p.S14L อยู่ในบริเวณ n-region (แสดงดังรูปที่ 24) การศึกษาด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 เคยรายงานโดย Jarjanazi และคณะ ปี ค.ศ. 2008 ทำนายโรคที่เกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณ signal peptide 26 โรค พบการกลายพันธุ์ที่ก่อโรค 25 ตำแหน่ง แสดงค่า D value change ในทางลดลง (ลดลงร้อยละ 1.6-28.6) และพบการกลายพันธุ์หนึ่งตำแหน่ง คือ p.T17A (ยีน CTLA4) แสดงค่า D value change ลดลงเพียงร้อยละ 0.6 แต่ทำให้

เกิดโรคด้วยสาเหตุจาก incomplete glycosylation ซึ่งให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่า D ในทางลดลง น่าจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ที่ก่อโรค นอกจากนี้รายงานว่าการกลายพันธุ์ที่ก่อโรคส่วนใหญ่ ร้อยละ 71 เกิดบริเวณ *h*-region, ร้อยละ 29 เกิดบริเวณ *c*-region และไม่พบการกลายพันธุ์บริเวณ *n*-region เมื่อเปรียบเทียบผลทำนายจากการศึกษาี้กับการรายงานของ Jarjanazi และคณะ พบว่า p.S14L อาจมีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ signal peptide น้อย

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปว่า p.S14L ไม่มีผลกระทบต่อ signal peptide เนื่องจากรายงานของ Jarjanazi และคณะ ศึกษาเฉพาะโรคที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนเดียว การกลายพันธุ์ของ signal peptide จึงเป็นสาเหตุเดียวที่ทำให้เกิดโรค จึงสามารถทำนายความผิดปกติได้จากโปรแกรม SignalP 3.0 ต่างจากโรคพันธุกรรมแบบหลายปัจจัย เช่น ออทิสซึมสเปคตรัม ซึ่งมีสาเหตุจากหลายยีนร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้นผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงเพียงแบบเดียว (p.S14L) อาจมีผลกระทบเพียงเล็กน้อย รวมถึง p.S14L อาจส่งผลต่อกระบวนการ glycosylation เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ของยีน CTLA4 (p.T17A) (Jarjanazi et al., 2008)

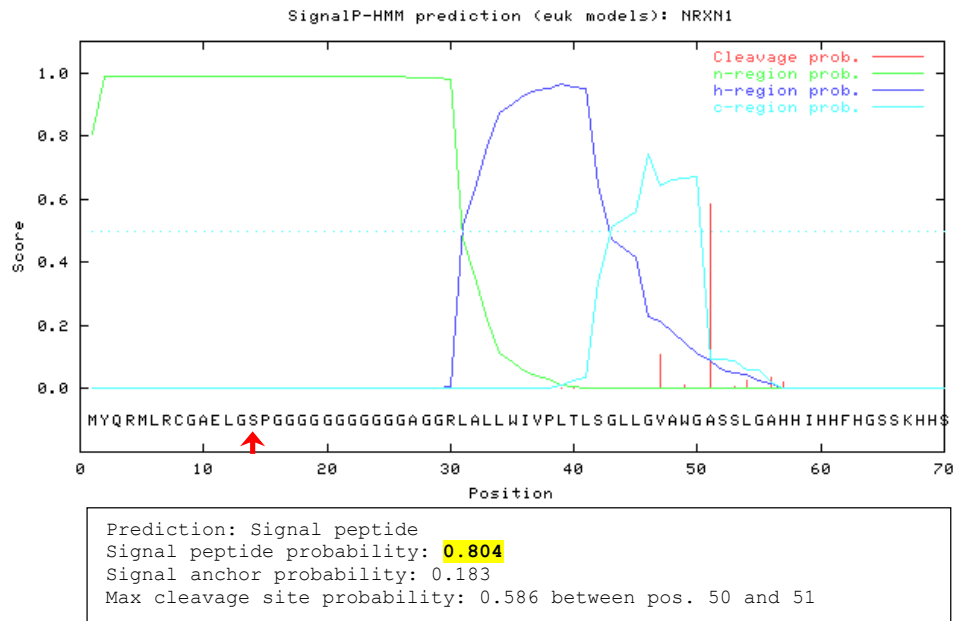
ตารางที่ 32 แสดงการทำนาย signal peptide ด้าน N-terminal ของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบต่าง ๆ เปรียบเทียบกับแบบทั่วไป ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0

Signal peptide variant	SignalP-HMMPrediction	SignalP-NN Prediction	
	Signal peptide probability	D score	D value change (%)
common	0.804	0.327	reference
p.S14L	0.797 (ลด 0.9%)	0.344	5.2 (เพิ่มขึ้น)
p.G17V	0.832 (เพิ่ม 3.5%)	0.331	1.2 (เพิ่มขึ้น)
p.23-26del4G	0.846 (เพิ่ม 5.2%)	0.381	16.5 (เพิ่มขึ้น)
p.22-26del5G	0.855 (เพิ่ม 6.3%)	0.404	23.5 (เพิ่มขึ้น)
p.26insG	0.791 (ลด 1.6%)	0.318	2.8 (ลดลง)

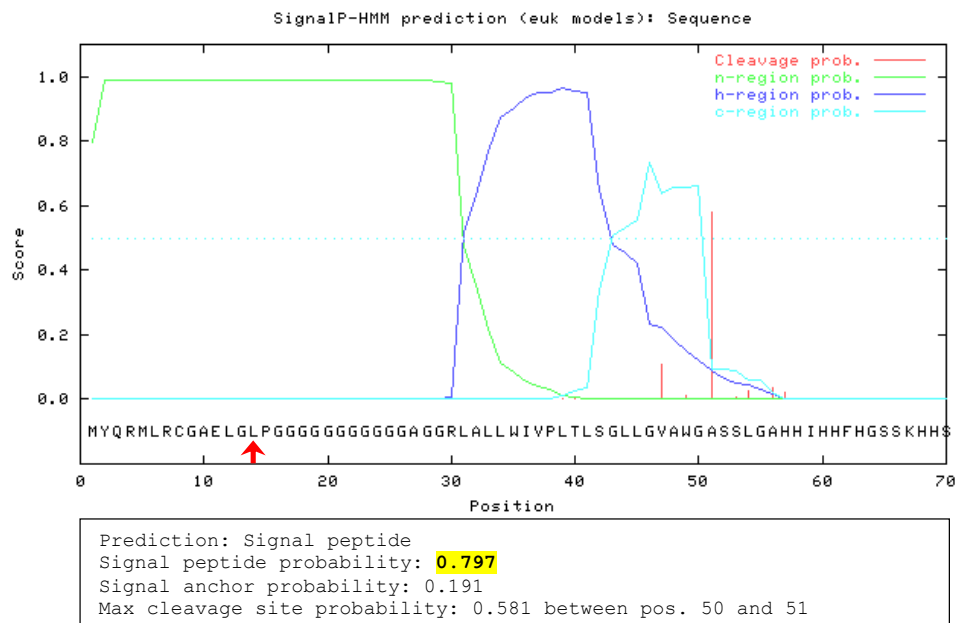
D score คือ ค่าการทำนายการทำหน้าที่เป็น signal peptide โดยโปรแกรมจะมีค่ามาตรฐานเป็นเกณฑ์

D value change (%) คือ การเปลี่ยนแปลงค่า D ของลำดับกรดอะมิโนที่มีการกลายพันธุ์เทียบกับลำดับกรดอะมิโนดั้งเดิม

(A) Common

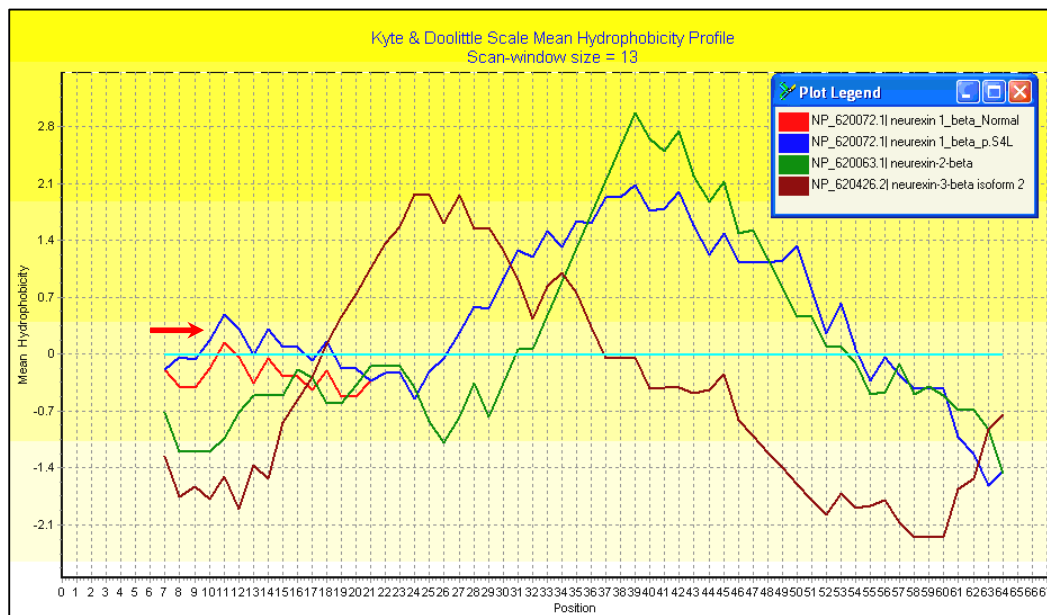


(B) p.S14L



รูปที่ 24 แสดงการทำนาย **signal peptide** ของลำดับกรดอะมิโนด้าน **N-terminal** บนสายพอลิเปปไทด์ **beta-Neurexin 1** ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 predictions (SignalP-HMM result) เพื่อทำนายลำดับกรดอะมิโนส่วน N-terminal ว่ามีหน้าที่เป็น signal peptide หรือไม่ (A) แสดงผลการทำนายสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 แบบทั่วไป (B) แสดงผลการทำนายสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L ลูกศรสีแดงแสดงตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโน

การคำนวณคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ด้วยฟังก์ชัน Kyte & Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile ด้วยโปรแกรม Bioedit เป็นอีกวิธีการหนึ่งในการทำนายผลกระทบของ p.S14L ต่อการทำหน้าที่ signal peptide ผลการวิเคราะห์พบว่า p.S14L (เส้นกราฟสีน้ำเงินตำแหน่งที่ลูกศรชี้) ทำให้ *n*-region มีความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับ signal peptide ปกติ (เส้นกราฟสีแดง) และ signal peptide ของโปรตีนที่มีหน้าที่เหมือนกัน ได้แก่ beta-Neurexin 2 (เส้นกราฟสีเขียว) และ beta-Neurexin 3 (เส้นกราฟสีน้ำตาล) ซึ่งให้เห็นว่า p.S14L เปลี่ยนคุณสมบัติ *n*-region จากคุณสมบัติชอบน้ำเปลี่ยนเป็นไม่ชอบน้ำ อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการทำหน้าที่ signal peptide (แสดงดังรูปที่ 25)



รูปที่ 25 แสดงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ปลายด้าน N-terminal ของสายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexins ด้วยฟังก์ชัน Kyte & Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile โปรแกรม Bioedit เส้นกราฟสีแดง คือ สายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 เส้นกราฟสีน้ำเงิน คือ สายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L เส้นกราฟสีเขียว คือ สายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 2 และเส้นกราฟสีน้ำตาล คือ สายพอลิเปปไทด์ beta-Neurexin 3

การศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวและกลุ่มควบคุม พบว่าผู้ป่วยออทิซึมในการศึกษานี้ได้รับการถ่ายทอด p.S14L จากแม่ที่ไม่มีภาวะออทิซึม แต่ไม่พบความผิดปกติในพ่อและกลุ่มควบคุมชาวไทย 310 คน สรุปว่า p.S14L ไม่ใช่ความหลากหลายทางพันธุกรรมตามทฤษฎี เพราะพบแอลลีล T น้อยกว่าร้อยละ 1 ในคนปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Feng และคณะที่รายงานผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียนที่มี p.S14L ได้รับการถ่ายทอดจากพ่อ แต่ไม่พบความผิดปกติในแม่และกลุ่มควบคุม 535 คนเช่นกัน

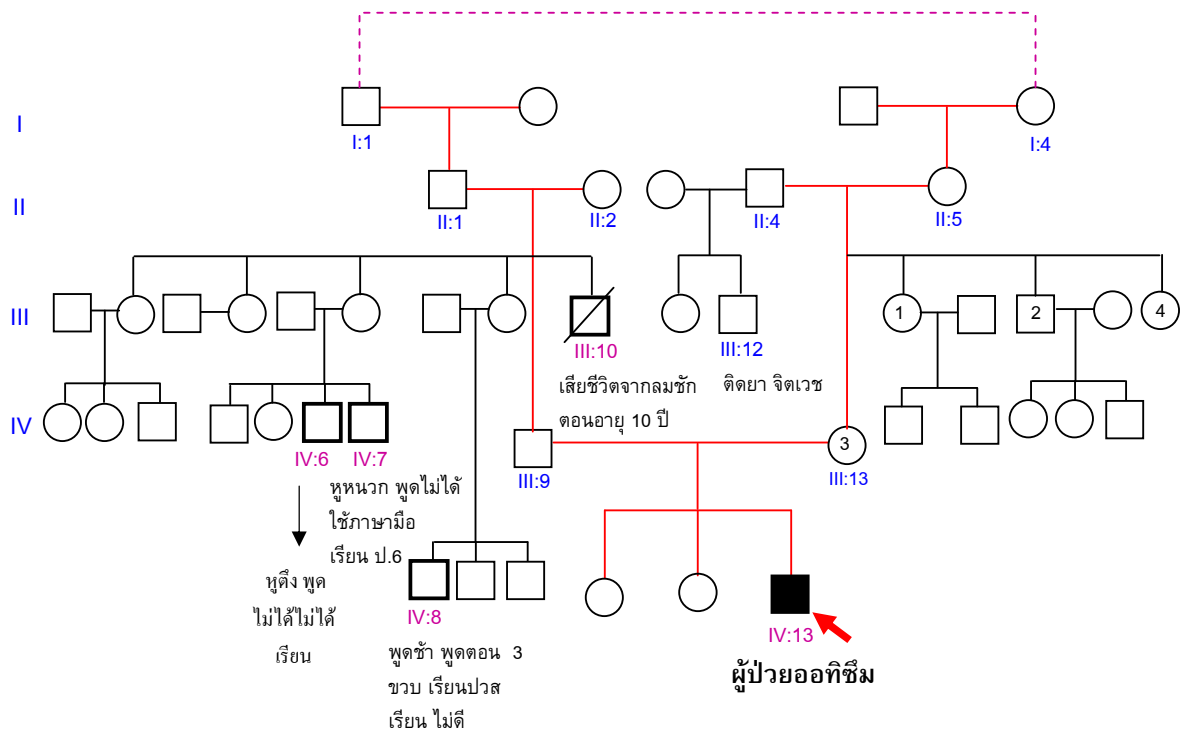
ในการศึกษานี้ผู้ป่วยเป็นเด็กชายอายุ 3 ปี ระดับไอคิว 64 ไม่มีประวัติชัก มีประวัติพูดช้าและชนอนุญไม่นิ่ง รวมถึงมีประวัติครอบครัวสัมพันธ์กับโรคระบบประสาทและพัฒนาการบกพร่อง (แสดงดังรูปที่ 26) ได้แก่ หลานชายของพ่อ 3 คน มีปัญหาพูดช้าและปัญหาด้านการเรียนรู้ อาผู้ชาย 1 คน เสียชีวิตจากโรคลมชัก จนถึงปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยออทิซึมที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L อย่างน้อย 4 ราย และผู้ป่วย 3 ราย (ผู้ป่วยเชื้อสายคอเคเซียน 2 ราย อีกหนึ่งรายไม่มีข้อมูลและชาวไทย 1 ราย) มีลักษณะทางคลินิกสอดคล้องกันคือ ไอคิวต่ำกว่า 70 และทุกรายมีประวัติครอบครัวสัมพันธ์กับโรคระบบประสาทและพัฒนาการบกพร่อง แต่มีภาวะชักเพียง 2 ราย ในผู้ป่วยเชื้อสายคอเคเซียน (แสดงดังตารางที่ 33) ผลการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวของผู้ป่วยออทิซึมทั้ง 3 ราย (เชื้อสายคอเคเซียน 2 รายและชาวไทย 1 ราย) พบว่าญาติที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L ในแต่ละครอบครัวไม่แสดงอาการออทิซึมเหมือนในผู้ป่วย ซึ่งอาจเกิด incomplete penetrance เนื่องจากออทิซึมเป็นโรคพันธุกรรมแบบหลายยีนและร่วมกับปัจจัยสิ่งแวดล้อม มีลักษณะทางคลินิกแบบสเปกตรัมอาการหลายระดับตั้งแต่น้อยไปมาก ดังนั้นความผิดปกติของยีนตำแหน่งเดียวกัน แต่มีสิ่งแวดล้อมต่าง อาจทำให้ p.S14L แบบเฮเทอโรไซกัส ไม่แสดงอาการของโรคที่สังเกตได้ในบางคน

แม้ผลการศึกษาด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 จะไม่สนับสนุนว่า p.S14L มีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของ signal peptide แต่จากคุณสมบัติชอบน้ำเปลี่ยนเป็นไม่ชอบน้ำใน p.S14L ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ *n*-region ของ signal peptide รวมถึงการพบ p.S14L ในผู้ป่วยออทิซึมสองกลุ่มเชื้อชาติ (เชื้อสายคอเคเซียนและชาวไทย) สนับสนุนว่า p.S14L น่าจะเป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดภาวะออทิซึม อย่างไรก็ตามข้อมูลจากประวัติครอบครัวทำให้ทราบว่าปู่ทวดและยายทวดของผู้ป่วยในการศึกษานี้เป็นพี่น้องกัน จึงไม่สามารถตัดสาเหตุจากยีนด้อยอื่นๆ เนื่องจากมีการแต่งงานในเครือญาติ รวมถึงควรมีการศึกษา function study เพื่อยืนยันว่า p.S14L มีผลต่อการแสดงออกของยีนหรือไม่

ตารางที่ 33 เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิก และประวัติครอบครัวของผู้ป่วยออทิซึมที่มีการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ c.41C>T (p.S14L) ในการศึกษาี้กับการศึกษาของ Feng และคณะ (2006)

เอกสารอ้างอิง	รหัสผู้ป่วย	เพศ/เชื้อชาติ	ลักษณะทางคลินิก	การถ่ายทอด	ประวัติในครอบครัว
Feng et al., 2006	8139	ชาย คอเคเชียน	1) ไอคิว 50 2) มีอาการชักรุนแรง 3) mild facial dysmorphism 4) hypopigmented	แม่ (CC), พ่อ (CT), น้องสาว (CT)	<u>ในครอบครัว</u> - น้องสาว (CT) มีปัญหาเกี่ยวกับระบบโสต การปฏิสัมพันธ์กับสังคมลดลง - แม่ตอนเด็กพูดติดอ่าง <u>ญาติทางแม่</u> ญาติทางพ่อ (ของแม่) มีประวัติบกพร่องในการเรียนรู้
	15107	ชาย คอเคเชียน	1) ไอคิว 68 2) มีอาการชัก 3) mild facial dysmorphism 4) hypopigmented 5) hyperactive	แม่ (CC), พ่อ (CT), น้องชายคนที่ 1 (CT), น้องชายคนที่ 2 (CT)	<u>ในครอบครัว</u> - พ่อ (CT) มีภาวะ hyperactive - พี่ชาย (CT) มีภาวะบกพร่องในการเรียนรู้และ hyperactive <u>ญาติทางแม่</u> - ญาติฝั่งแม่มีประวัติปัญญาอ่อน
	17160	หญิง คอเคเชียน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
การศึกษานี้	TM40-3	ชาย ชาวไทย (มุสลิม)	1) อายุ 3 ปี 2) ไอคิว 64 3) delay language 4) hyperactive	พ่อ (CC), แม่ (CT)	<u>ญาติทางพ่อ</u> - หลานชายพ่อ 3 คน พัฒนาการด้านการพูดล่าช้าและมีภาวะบกพร่องในการเรียนรู้ - อาชาย เสียชีวิตจากลมชัก <u>ญาติทางแม่</u> - น้องชายแม่ psychiatric problem (ติดยา และมีปัญหาจิตเวช)

ปู่ทวดและยายทวดเป็นพี่น้องกัน



รูปที่ 26 แสดงประวัติครอบครัวของผู้ป่วยออทิสซึม (TM40-3) ที่มีการเปลี่ยนแปลงยีน beta-Neurexin 1 แบบ p.S14L ในการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงแบบใหม่ p.E272D (c.816G>C)

p.E272D พบในผู้ป่วยออทิซึมเด็กไทย 3 ราย ได้แก่ AR15-3, AR23-3 และ TM47-3 เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบใหม่ ยังไม่มีรายงานมาก่อน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดที่เอกซอน 4 ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CDS ตำแหน่ง 816 เปลี่ยนจากเบส G เป็นเบส C แบบเฮเทอโรไซกัส ส่งผลให้การดอะมิโนตำแหน่ง 272 เปลี่ยนจากกรดกลูตามิก (E) เป็นกรดแอสพาดิก (D) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนประจุลบทั้งคู่ การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เปลี่ยนแปลงประจุของกรดอะมิโน จึงไม่ส่งผลให้โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน beta-Neurexin 1 เปลี่ยนแปลง (แสดงดังรูปที่ 27) การเปลี่ยนแปลง p.E272D อยู่ในส่วน extracellular potential ของโปรตีน beta-Neurexin 1 แต่ไม่อยู่ในโดเมนสำคัญ (LNS domain) คาดว่าการเปลี่ยนแปลงแบบ p.E272D น่าจะไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน

จากการศึกษาการถ่ายทอดในครอบครัวและกลุ่มควบคุม พบว่าผู้ป่วยออทิซึมชาวไทยทั้งสามได้รับการถ่ายทอด p.E272D จากแม่หรือพ่อที่ไม่มีอาการออทิซึม (แสดงดังตารางที่ 28) และการศึกษาในกลุ่มควบคุมพบ p.E272D ในประชากรไทยปกติ 6 คน จากทั้งหมด 198 คน สรุปว่า p.E272D เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมตามทฤษฎี เพราะความถี่แอลลีล C คิดเป็นร้อยละ 1.5 ของประชากรปกติ การวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Chi-square test, fisher exact เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของจีโนไทป์แบบ GG และ GC ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย ให้ค่า $p\text{-value} = 0.87$ (มากกว่า 0.05) แสดงว่าจีโนไทป์แบบ GC ไม่สัมพันธ์กับภาวะออทิซึมสเปคตรัม

ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นสนับสนุนว่า p.E272D น่าจะเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบสนิปส์ในชาวไทยที่รายงานครั้งแรกในการศึกษานี้

การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC

การเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC พบในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมชาวไทย 3 แบบ ได้แก่ p.23-26del4G, p.22-26del5G และ p.26insG เคยรายงานในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียนและแอฟริกัน-อเมริกัน 3 แบบ เช่นกัน ได้แก่ p.22-26del5G, p.26insGG และ p.26insGG (Feng et al., 2006) โดยการเปลี่ยนแปลง p.22-26del5G เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรแอฟริกัน-อเมริกัน แต่ไม่พบในประชากรปกติเชื้อสายคอเคเซียนและประชากรไทยปกติในการศึกษานี้ การเปลี่ยนแปลง p.26insG ไม่ใช่ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรปกติเชื้อสายคอเคเซียนและแอฟริกัน-อเมริกัน ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษานี้ พบ p.26insG มีความถี่แอลลีล ร้อยละ 1.27 ของประชากรไทยปกติ ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมตามทฤษฎี ส่วน p.23-26del4G พบเฉพาะในผู้ป่วยออทิซึมชาวไทย แต่ยังไม่มีรายงานในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายอื่นๆ ซึ่งตรงข้ามกับ p.26insGG ที่เคยรายงานในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียน แต่ไม่พบในการศึกษานี้ การศึกษาแบบ case-control study ในกลุ่มเชื้อสายคอเคเซียน เชื้อสายแอฟริกัน-อเมริกัน และชาวไทย (แสดงดังตารางที่ 34) พบว่าจำนวนซ้ำ GGC ทุกแบบไม่สัมพันธ์กับการเกิดภาวะออทิซึมสเปกตรัม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังไม่ชัดเจน ยังมีข้อด้อยด้านจำนวนผู้ป่วย และกลุ่มควบคุมที่น้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้า จึงไม่สามารถสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC สัมพันธ์กับการเกิดออทิซึมสเปกตรัมในเด็กไทยหรือไม่ นอกจากนี้ควรทดสอบว่าการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำของ GGC ว่ามีผลต่อการแสดงออกของยีนหรือไม่ เพื่อให้ข้อสรุปที่ชัดเจน

ตารางที่ 34 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ ในผู้ป่วยออทิซึม สเปคตรัมชาวไทยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมประชากรปกติ

GGC repeat variants	Thai (This study)			Caucasian and Afro-American (Feng et al. 2006)		
	ASD 173	Controls 118	Fisher exact test	Autism 203 Caucasian 61 Afro- American*	Controls 535 Caucasian 194 Afro- American*	Fisher exact test
p.23-26del4G (6GGC repeat)	2	0	2/170 vs. 0/118 <i>P</i> = 0.34	0	0	–
p.22-26del5G (5GGC repeat)	2	0	2/170 vs. 0/118 <i>P</i> = 0.34	6 *	11*	6/61* vs 11/194* <i>P</i> = 0.19
p.26insG (11GGC repeat)	1	3	1/170 vs. 3/118 <i>P</i> = 0.97	2	3	2/264 vs. 3/729 <i>P</i> = 0.40
p.26insGG (12GGC repeat)	0	0	–	1	0	1/264 vs. 0/729 <i>P</i> = 0.27
Total	5	3	5/170 vs. 3/118 <i>P</i> = 0.57	9	14	9/264 vs. 14/729 <i>P</i> = 0.13
Total cases = 14, Total controls = 17 (14/434 vs. 17/847, <i>P</i> = 0.125)						

GGC repeat กับความเสถียรในโครงสร้าง hairpin ของ mRNA

ด้าน N-terminal ของโปรตีน beta-Neurexin 1 ลำดับกรดอะมิโนที่ 1-50 คือ signal peptide domain บริเวณนี้มีกรดอะมิโนไกลซีนเรียงตัวต่อเนื่องกัน (glycine tract) 11 ตัว ตั้งแต่กรดอะมิโนตัวที่ 16 ถึง 26 โดย glycine tract แปรรหัสจาก **(GGG)(GGC)₁₀** บริเวณ CDS ลำดับที่ 46 ถึง 78 จากการศึกษาและรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ทำให้เกิดความหลากหลายของ glycine tract บริเวณนี้

จนถึงปัจจุบันความหลากหลาย glycine tract ของโปรตีน beta-Neurexin 1 มี 5 แบบ คือ 11, 7, 6, 12 และ 13 ตัว โดย glycine tract 11 ตัว คือ ลักษณะทั่วไปที่พบในคนส่วนใหญ่ ส่วนแบบอื่นๆ เป็นแบบพบได้น้อย โดยความหลากหลาย glycine tract เกิดจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำ GGC ดังนี้ 1) glycine tract 7 ตัว เกิดจากการเปลี่ยนแปลง c.67-78del4GGC (p.23-26del4G) 2) glycine tract 6 ตัว เกิดจากการเปลี่ยนแปลง c.64-78del5GGC (p.22-26del5G) 3) glycine tract 12 ตัว เกิดจากการเปลี่ยนแปลง c.78insGGC (p.26insG) และ 4) glycine tract 13 ตัว เกิดจากเปลี่ยนแปลง c.78insGGCGGC (p.26insGG)

หน้าที่ glycine tract ของโปรตีน beta-Neurexin 1 ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เคยมีรายงานในโปรตีน Androgen receptor (AR) และโปรตีน TWIST พบว่า glycine tract มีหน้าที่เป็น flexible linker ของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโดเมน หรือ ระหว่างการรวม subunit เกิดเป็นโครงสร้างแบบ dimer (Elanko et al., 2001) การศึกษาของ Ding และคณะ ปี ค.ศ.2005 รายงานว่าความหลากหลายของ glycine tract ในโปรตีน AR ไม่มีผลต่อ AR transactivation activity แต่ในทางกลับกัน พบว่ายีน AR ที่มีจำนวนซ้ำ GGC น้อย (13 ซ้ำ) สามารถผลิตโปรตีนต่อหน่วยได้มากขึ้นเป็น 2.7 เท่าของยีนที่มีจำนวนซ้ำ GGC สูง (17 ซ้ำ) และการทำนายความเสถียรของโครงสร้าง mRNA ด้วยโปรแกรม RNA structure, v.3.7, DH Mathews พบว่าจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มขึ้น ให้ค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ลดลง นั้นหมายถึง โครงสร้าง hairpin ของ mRNA มีความเสถียรมากขึ้น จนส่งผลกระทบต่อกระบวนการแปลรหัสโปรตีน นอกจากนี้พบว่าจำนวนซ้ำ GGC ที่ต่ำ ทำให้การทำงานของ Androgen สูงขึ้น ซึ่งลักษณะนี้เป็นปัจจัยเสี่ยงของ prostate cancer (Ding et al., 2005)

การศึกษานี้ตรวจสอบค่าพลังงานอิสระของการเกิด hairpin ของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบของยีน beta-Neurexin 1 ด้วยโปรแกรม RNA structure, v.5.1, Mathews Lab แสดงค่าพลังงานอิสระดังนี้ 10 GGC ($\Delta G = -38.5$), 6 GGC ($\Delta G = -30.0$), 5 GGC ($\Delta G = -29.9$) และ 11 GGC ($\Delta G = -42.7$) (แสดงดังรูปที่ 28) ผลการทำนายพบว่าจำนวนซ้ำ GGC ที่เพิ่มขึ้น ให้ค่าพลังงานอิสระลดลงเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ นั้นหมายถึงจำนวนซ้ำ

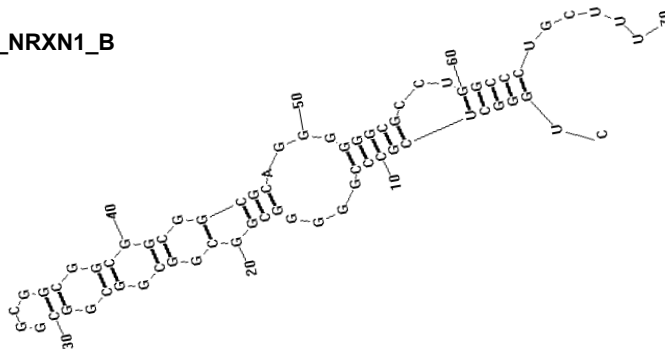
GGC แบบขาดหาย (5 GGC หรือ 6 GGC) อาจทำให้โครงสร้าง mRNA เสถียรน้อยกว่าจำนวนซ้ำแบบทั่วไป (10 GGC) และจำนวนซ้ำแบบเพิ่มขึ้น (11 GGC)

อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงความเสถียรในโครงสร้าง mRNA จะกระทบต่อการผลิตโปรตีน beta-Neurexin 1 เช่นเดียวกับยีน AR หรือไม่ ยังไม่สามารถสรุปได้จากการทำนายนี้ เนื่องจากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนส่วน N-terminal ของโปรตีน beta-Neurexin 1 ในคน วัว และสุนัข มีความคล้ายกันมาก (แสดงในรูปที่ 18) แตกต่างกันที่จำนวน glycine tract ในมนุษย์มีมากกว่าวัวและสุนัข (มนุษย์มี 11 ไกลซีน, วัวมี 6 ไกลซีนและสุนัขมี 9 ไกลซีน) นั้นหมายความว่าความหลากหลายของไกลซีนในมนุษย์ช่วง 6-13 ตัว คาดว่ายังไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของ signal peptide แต่การขาดหรือเพิ่มจากจำนวนที่พบทั่วไป อาจส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนในเชิงประสิทธิภาพการสร้างโปรตีน จึงควรศึกษาเพิ่มในระดับการแสดงออกของยีน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตโปรตีนต่อหน่วยของยีนที่มีจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ ถ้าผลการศึกษพบว่าการผลิตโปรตีนต่อหน่วยขึ้นอยู่กับจำนวนซ้ำ GGC เหมือนยีน AR คือ จำนวนซ้ำ GGC ต่ำ (5 GGC) จะทำให้ผลิตโปรตีนต่อหน่วยได้มากขึ้น คาดการณ์ว่าปริมาณโปรตีน beta-Neurexin 1 ที่ผลิตมากขึ้นหรือน้อยลงกว่าปกติ อาจกระทบต่อการควบคุมชนิดของไซแนปส์ (กระตุ้นหรือยับยั้ง) เนื่องจากกลไกควบคุมดังกล่าวใช้ความหลากหลายจากโปรตีน beta-Neurexins 3 ชนิด ได้แก่ beta-Neurexin 1, 2 และ 3 (อธิบายรายละเอียดในบทที่ 1 หน้าที่ของโปรตีน beta-Neurexins) โดยความสมดุลของไซแนปส์ทั้งสองชนิดจำเป็นต่อการพัฒนาระบบประสาทส่วนกลางให้เป็นปกติ (Cline, 2005) ซึ่งมีรายงานความไม่สมดุลของไซแนปส์ชนิดกระตุ้นและยับยั้งในออทิซึมบางกลุ่ม (Rubenstein and Merzenich, 2003)

ผลการศึกษาด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ ให้แนวคิดถึงความหลากหลายจำนวนซ้ำ GGC อาจไม่เกิดผลเสียต่อหน้าที่ของโปรตีน beta-Neurexin 1 แต่อาจกระทบต่อประสิทธิภาพของกระบวนการแปลรหัสแปลโปรตีน ที่ส่งผลให้ปริมาณการผลิตโปรตีนต่อหน่วยเปลี่ยนไปจากสัดส่วนเดิม อาจมีแนวโน้มที่จะกระทบต่อความหลากหลายของโปรตีนกลุ่ม beta-Neurexins ในกระบวนการไซแนปส์ อย่างไรก็ตามควรศึกษาในระดับ functional study เพิ่มเพื่อให้ข้อสรุปที่ดีขึ้น

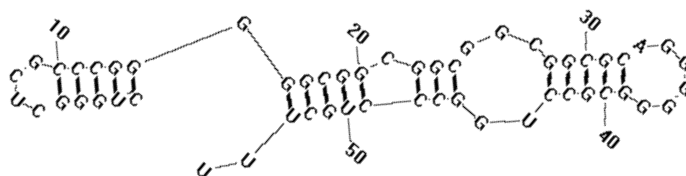
A) 10 GGC's_NRXN1_B

$$\Delta G = -38.5$$



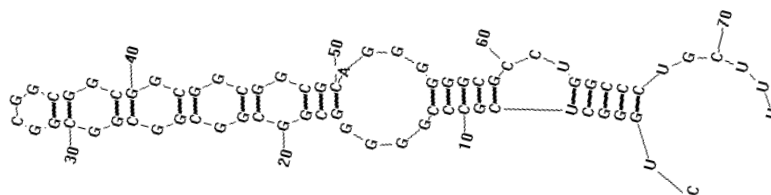
B) 5 GGC's_NRXN1_B

$$\Delta G = -29.9$$



C) 11 GGC's_NRXN1_B

$$\Delta G = -42.7$$



รูปที่ 28 แสดงการทำนายโครงสร้าง hairpin และค่าพลังงานอิสระ (ΔG) ของจำนวนซ้ำ GGC แต่ละแบบ ด้วยโปรแกรม RNA structure, v.3.7, DH Mathews (A) จำนวนซ้ำ GGC 10 ซ้ำ พบในคนส่วนใหญ่ (B) จำนวนซ้ำ GGC 5 ซ้ำ แบบพบน้อย (C) จำนวนซ้ำ GGC 11 ซ้ำ แบบพบน้อย

สลิปส์ในการศึกษา

การศึกษานี้พบ 5 แบบ ได้แก่ rs13413205 (p.G17V), rs74387895 (IVS19-29C>G), rs1363049 (IVS22+71C>T), rs3732049 (c.-645G>A) และ rs13422484 (c.-398T>C) โดย rs13413205 คือ สลิปส์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เคยมีรายงานในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมเชื้อสายคอเคเซียน (Feng et al., 2006) และพบผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปคตรัมชาวไทยเช่นกัน การศึกษานี้พบสลิปส์ที่มีค่า heterozygosity สูง 3 แบบ คือ rs1363049 (ร้อยละ 46), rs3732049 (ร้อยละ 36), rs13422484 (ร้อยละ 43) ทำให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไม่แปลรหัสโปรตีน

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไม่แปลรหัสโปรตีนที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน 4 แบบ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ การเปลี่ยนแปลงบริเวณอินทรอน คือ IVS19-38A>C และการเปลี่ยนแปลงบริเวณ 5' UTR ได้แก่ c.-217G>C, c-749T>A และ c.-675G>T

การกลายพันธุ์บริเวณที่ไม่แปลรหัสโปรตีน เช่น intragenic, splice site, conserved element และบริเวณโปรโมเตอร์ก็อาจส่งผลให้ก่อโรคได้เช่นกัน จากการตรวจสอบพบว่าการเปลี่ยนบริเวณอินทรอนในการศึกษานี้ไม่ได้ส่งผลให้เกิด splice site ตำแหน่งใหม่ จึงสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงบริเวณอินทรอนไม่มีผลการแสดงของยีน ส่วนการเปลี่ยนแปลงบริเวณ 5' UTR ทั้ง 3 แบบ พบว่าเป็นตำแหน่งที่ใกล้กับตำแหน่งสลิปส์ rs3732049 คาดว่าการเปลี่ยนแปลงทั้ง 3 แบบ อาจเป็นสลิปส์ที่รายงานครั้งแรกในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม 5'UTR เป็นตำแหน่งสำคัญที่ในกระบวนการ translation เป็นบริเวณที่ช่วยจับกันระหว่างไรโบโซมและอาร์เอ็นเอสังขามีความเสถียรมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงบริเวณ 5' UTR ส่งผลกระทบต่อการเกาะของไรโบโซม อาจกระทบต่อการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน (Strachan and Read, 2004)

บทที่ 5

สรุปผล

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับการรายงานก่อนหน้าคือ p.S14L ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงพบได้น้อย แต่อยู่ในบริเวณสำคัญที่เรียกว่า signal peptide domain ผลการศึกษาด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ ทำนายว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14 เป็น ลิวซีนส่งผลกระทบต่อการทำหน้าที่ signal peptide จึงอาจส่งผลต่อการไซแนปส์ของเซลล์ประสาททำให้มีผลต่อการเกิดภาวะออทิซึม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถตัดสาเหตุจาก ยีนด้อยอื่นๆ เนื่องจากมีการแต่งงานในเครือญาติ ควรมีการศึกษาระดับโปรตีนต่อไปเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

รายการเอกสารอ้างอิง

- กนิษฐา ภัทรกุล, จินตนา จิรถาวร และ ญัฐิยา หิรัญกาญจน์. 2546. เวชศาสตร์โมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่1. Text and Journal Publication Co., Ltd: กรุงเทพมหานคร.
- นิชรา เรืองดารกานนท์, ชาศรียา ซีเรนตร, รวิวรรณ รุ่งไพรวลัย, ทิพวรรณ หรรษคุณาชัย และ นิตยา คชภักดี. 2551. ตำราพัฒนาการและพฤติกรรมเด็ก. พิมพ์ครั้งที่ 1. โฮลิสติก แพ็บลิชซิ่ง จำกัด: กรุงเทพมหานคร.
- 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.
- Anthony P. M. 2007. IMGSAC Positional/ Functional Candidate Genes (2007).
http://www.well.ox.ac.uk/monaco/autism/IMGSAC/IMGSAC_genes.shtml.
 (accessed 01/02/07).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 2000. *Current Protocols In Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc: United States of America.
- 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.
- Blasi, F., Bacchelli, E., Pesaresi, G., Carone, S., Bailey, A. J. and Maestrini, E. 2006. Absence of coding mutations in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4 in individuals with Autism from the IMGSAC collection. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 141B(3): 220-221.
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P. and Sudhof, T. C. 2005. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron*. 48(10): 229-236.
- Chakrabarti, S. and Fombonne, E. 2005. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *The American Journal of Psychiatry*. 162(6): 1133-1141.

- Chih, B., Afridi, S. K., Clark, L. and Scheiffele, P. 2004. Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Human Molecular Genetics*. 13(14): 1471-1477.
- Chih, B., Engelman, H. and Scheiffele, P. 2005. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*. 307(2): 1324-1328.
- Ching, M. S. L., Shen, Y. P., Tan, W. H., Jeste, S. S., Morrow, E. M., Chen, X. L., Mukaddes, N. M., Yoo, S. Y., Hanson, E., Hundley, R., Austin, C., Becker, R. E., Berry, G. T., Driscoll, K., Engle, E. C., Friedman, S., Gusella, J. F., Hisama, F. M., Irons, M. B., Lafiosca, T., LeClair, E., Miller, D. T., Neessen, M., Picker, J. D., Rappaport, L., Rooney, C. M., Sarco, D. P., Stoler, J. M., Walsh, C. A., Wolff, R. R., Zhang, T., Nasir, R. H., Wu, B. L. and Phe, C. H. B. G. 2010. Deletions of NRXN1 (Neurexin-1) Predispose to a Wide Spectrum of Developmental Disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 153B(4): 937-947.
- Chocholska, S., Rossier, E., Barbi, G. and Kehrer-Sawatzki, H. 2006. Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22.2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 140(6): 604-610.
- Cline, H. 2005. Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Current Biology*. 15(6): R203-205.
- Comoletti, D., De Jaco, A., Jennings, L. L., Flynn, R. E., Gaietta, G., Tsigelny, I., Ellisman, M. H. and Taylor, P. 2004. The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with Autism reveals a defect in protein processing. *The Journal of Neuroscience*. 24(20): 4889-4893.
- Craig, A. M. and Kang, Y. 2007. Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*. 17(1): 43-52.
- Dalva, M. B., McClelland, A. C. and Kayser, M. S. 2007. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(3): 206-220.
- De Jaco, A., Comoletti, D., Kovarik, Z., Gaietta, G., Radic, Z., Lockridge, O., Ellisman, M. H. and Taylor, P. 2006. A mutation linked with Autism reveals a common

- mechanism of endoplasmic reticulum retention for the alpha, beta-hydrolase fold protein family. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(14): 9667-9676.
- 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.
- Dudanova, I., Tabuchi, K., Rohlmann, A., Sudhof, T. C. and Missler, M. 2007. Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. *The Journal of Comparative Neurology*. 502(2): 261-274.
- Elanko, N., Sibbring, J. S., Metcalfe, K. A., Clayton-Smith, J., Donnai, D., Temple, I. K., Wall, S. A. and Wilkie, A. O. 2001. A survey of *TWIST* for mutations in craniosynostosis reveals a variable length polyglycine tract in asymptomatic individuals. *Human Mutation*. 18(6): 535-541.
- Ensembl. 2010. Gene: NRXN1 (ENSG00000179915).
<http://www.ensembl.org/Homosapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000179915>. (accessed 07/07/10).
- Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook, E. H., Jr., Skinner, C., Schwartz, C. E. and Sommer, S. S. 2006. High frequency of neurexin 1 β signal peptide structural variants in patients with Autism. *Neuroscience Letters*. 409(1): 10-13.
- Fombonne, E. 2005. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *Journal of Clinical Psychiatry*. 66(Suppl 10): 3-8.
- Friedman, J. M., Baross, A., Delaney, A. D., Ally, A., Arbour, L., Armstrong, L., Asano, J., Bailey, D. K., Barber, S., Birch, P., Brown-John, M., Cao, M., Chan, S., Charest, D. L., Farnoud, N., Fernandes, N., Flibotte, S., Go, A., Gibson, W. T., Holt, R. A., Jones, S. J., Kennedy, G. C., Krzywinski, M., Langlois, S., Li, H. I., McGillivray, B. C., Nayar, T., Pugh, T. J., Rajcan-Separovic, E., Schein, J. E., Schnerch, A., Siddiqui, A., Van Allen, M. I., Wilson, G., Yong, S. L., Zahir, F., Eydoux, P. and Marra, M. A. 2006. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *The American Journal of Human Genetics*. 79(3): 500-513.
- Gauthier, J., Bonnel, A., St-Onge, J., Karemera, L., Laurent, S., Mottron, L., Fombonne, E., Joober, R. and Rouleau, G. A. 2005. NLGN3/NLGN4 gene mutations are not

- responsible for Autism in the Quebec population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 132B(1): 74-75.
- Godi, M., Mellone, S., Petri, A., Arrigo, T., Bardelli, C., Corrado, L., Bellone, S., Prodam, F., Momigliano-Richiardi, P., Bona, G. and Giordano, M. 2010. A Recurrent signal peptide mutation in growth hormone releasing hormone receptor with defective translocation to cell surface and isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 94(10): 3939-3947.
- Grice, D. E. and Buxbaum, J. D. 2006. The genetics of Autism spectrum disorders. *NeuroMolecular Medicine*. 8(4): 451-460.
- Hishimoto, A., Liu, Q. R., Drgon, T., Pletnikova, O., Walther, D., Zhu, X. G., Troncoso, J. C. and Uhl, G. R. 2007. Neurexin 3 polymorphisms are associated with alcohol dependence and altered expression of specific isoforms. *Human Molecular Genetics*. 16(23): 2880-2891.
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C. and Sudhof, T. C. 1995. Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81(3): 435-443.
- 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.
- Jorde, L. B., Hasstedt, S. J., Ritvo, E. R., Mason-Brothers, A., Freeman, B. J., Pingree, C., McMahon, W. M., Petersen, B., Jenson, W. R. and Mo, A. 1991. Complex segregation analysis of Autism. *The American Journal of Human Genetics*. 49(5): 932-938.
- Jarjanazi, H., Savas, S., Pabalan, N., Dennis, J. W. and Ozcelik, H. 2008. Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. *Proteins*. 70(2): 394-403.
- Kim, H. G., Kishikawa, S., Higgins, A. W., Seong, I. S., Donovan, D. J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L. A., Najm, J., Kutsche, K., Descartes, M., Holt, L., Braddock, S., Troxell, R., Kaplan, L., Volkmar, F., Klin, A., Tsatsanis, K., Harris, D. J., Noens, I., Pauls, D. L., Daly, M. J., MacDonald, M. E., Morton, C. C., Quade, B. J. and

- Gusella, J. F. 2008. Disruption of neurexin 1 associated with Autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics*. 82(1): 199-207.
- Kirov, G., Rujescu, D., Ingason, A., Collier, D. A., O'Donovan, M. C. and Owen, M. J. 2009. Neurexin 1 (*NRXN1*) Deletions in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 35(5): 851-854.
- Klauck, S. M. 2006. Genetics of Autism spectrum disorder. *European Journal of Human Genetics*. 14(6): 714-720.
- Langsrud, Ø. 2010. Fisher's Exact Test.
<http://www.langsrud.com/fisher.htm>. (accessed 06/01/10).
- 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. *The American Journal of Human Genetics*. 74(3): 552-557.
- Lawson-Yuen, A., Saldivar, J. S., Sommer, S. and Picker, J. 2008. Familial deletion within *NLGN4* associated with Autism and Tourette syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 16(5): 614-618.
- Li, Q., Lee, J. A. and Black, D. L. 2007. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(11): 819-831.
- Macarov, M., Zeigler, M., Newman, J. P., Strich, D., Sury, V., Tennenbaum, A. and Meiner, V. 2007. Deletions of *VCX-A* and *NLGN4*: a variable phenotype including normal intellect. *Journal of Intellectual Disability Research*. 51(Pt 5): 329-333.
- Marshall, C. R., Noor, A., Vincent, J. B., Lionel, A. C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., Thiruvahindrapduram, B., Fiebig, A., Schreiber, S., Friedman, J., Ketelaars, C. E., Vos, Y. J., Ficiocioglu, C., Kirkpatrick, S., Nicolson, R., Sloman, L., Summers, A., Gibbons, C. A., Teebi, A., Chitayat, D., Weksberg, R., Thompson, A., Vardy, C., Crosbie, V., Luscombe, S., Baatjes, R., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Fernandez, B., Szatmari, P. and Scherer, S. W. 2008. Structural variation of chromosomes in Autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics*. 82(2): 477-488.

- Missler, M. and Sudhof, T. C. 1998. Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends in Genetics*. 14(1): 20-26.
- Missler, M., Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R. E., Gottmann, K. and Sudhof, T. C. 2003. Alpha-neurexins couple Ca^{2+} channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*. 423(6): 939-948.
- Muhle, R., Trentacoste, S. V. and Rapin, I. 2004. The genetics of Autism. *Pediatrics* 113(5): e472-486.
- The National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2010. Entrez gene: NRXN1 neurexin 1 [*Homo sapiens*] GeneID: 9378. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9378> (accessed 07/26/10).
- Nguyen, T. and Sudhof, T. C. 1997. Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1 β reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(41): 26032-26039.
- Nussbaum, J., Xu, Q., Payne, T. J., Ma, J. Z., Huang, W., Gelernter, J. and Li, M. D. 2008. Significant association of the neurexin-1 gene (*NRXN1*) with nicotine dependence in European and African-American smokers. *Human Molecular Genetics*. 17(11): 1569-1577.
- Pardo, C. A. and Eberhart, C. G. 2007. The neurobiology of Autism. *Brain Pathology* 17(4): 434-447.
- PREMIER Biosoft International. 2010. Tech Note: PCR Primer Design Guidelines. http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html (accessed 03/26/10).
- Rowen, L., Young, J., Birditt, B., Kaur, A., Madan, A., Philipps, D. L., Qin, S., Minx, P., Wilson, R. K., Hood, L. and Graveley, B. R. 2002. Analysis of the human neurexin genes: alternative splicing and the generation of protein diversity. *Genomics*. 79(4): 587-597.
- Rubenstein, J. L. and Merzenich, M. M. 2003. Model of Autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*. 2(5): 255-267.
- Rujescu, D., Ingason, A., Cichon, S., Pietilainen, O. P., Barnes, M. R., Touloupoulou, T., Picchioni, M., Vassos, E., Ettinger, U., Bramon, E., Murray, R., Ruggeri, M., Tosato, S., Bonetto, C., Steinberg, S., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T.,

- Petursson, H., Gylfason, A., Olason, P. I., Hardarsson, G., Jonsdottir, G. A., Gustafsson, O., Fossdal, R., Giegling, I., Moller, H. J., Hartmann, A. M., Hoffmann, P., Crombie, C., Fraser, G., Walker, N., Lonqvist, J., Suvisaari, J., Tuulio-Henriksson, A., Djurovic, S., Melle, I., Andreassen, O. A., Hansen, T., Werge, T., Kiemenev, L. A., Franke, B., Veltman, J., Buizer-Voskamp, J. E., Sabatti, C., Ophoff, R. A., Rietschel, M., Nothen, M. M., Stefansson, K., Peltonen, L., St Clair, D., Stefansson, H. and Collier, D. A. 2009. Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*. 18(5): 988-996.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA.
- Sato, N., Kageyama, S., Chen, R. Y., Suzuki, M., Tanioka, F., Kamo, T., Shinmura, K., Nozawa, A. and Sugimura, H. 2010. Association between neurexin 1 (*NRXN1*) polymorphisms and the smoking behavior of elderly Japanese. *Psychiatric Genetics*. 20(3): 135-136.
- 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. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 30(3): 405-416.
- Strachan, T. and Read, P. A. 2004. *Human molecular genetics* 3. 3rd edition. Garland Science: India.
- Szatmari, P., Paterson, A. D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X. Q., Vincent, J. B., Skaug, J. L., Thompson, A. P., Senman, L., Feuk, L., Qian, C., Bryson, S. E., Jones, M. B., Marshall, C. R., Scherer, S. W., Vieland, V. J., Bartlett, C., Mangin, L. V., Goedken, R., Segre, A., Pericak-Vance, M. A., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., Wright, H. H., Abramson, R. K., Betancur, C., Bourgeron, T., Gillberg, C., Leboyer, M., Buxbaum, J. D., Davis, K. L., Hollander, E., Silverman, J. M., Hallmayer, J., Lotspeich, L., Sutcliffe, J. S., Haines, J. L., Folstein, S. E., Piven, J., Wassink, T. H., Sheffield, V., Geschwind, D. H., Bucan, M., Brown, W. T., Cantor, R. M., Constantino, J. N., Gilliam, T. C., Herbert, M., Lajonchere, C., Ledbetter, D. H., Lese-Martin, C., Miller, J., Nelson, S., Samango-Sprouse, C. A., Spence, S., State, M., Tanzi, R.

E., Coon, H., Dawson, G., Devlin, B., Estes, A., Flodman, P., Klei, L., McMahon, W. M., Minshew, N., Munson, J., Korvatska, E., Rodier, P. M., Schellenberg, G. D., Smith, M., Spence, M. A., Stodgell, C., Tepper, P. G., Wijsman, E. M., Yu, C. E., Roge, B., Mantoulan, C., Wittmeyer, K., Poustka, A., Felder, B., Klauck, S. M., Schuster, C., Poustka, F., Bolte, S., Feineis-Matthews, S., Herbrecht, E., Schmotzer, G., Tsiantis, J., Papanikolaou, K., Maestrini, E., Bacchelli, E., Blasi, F., Carone, S., Toma, C., Van Engeland, H., de Jonge, M., Kemner, C., Koop, F., Langemeijer, M., Hijmans, C., Staal, W. G., Baird, G., Bolton, P. F., Rutter, M. L., Weisblatt, E., Green, J., Aldred, C., Wilkinson, J. A., Pickles, A., Le Couteur, A., Berney, T., McConachie, H., Bailey, A. J., Francis, K., Honeyman, G., Hutchinson, A., Parr, J. R., Wallace, S., Monaco, A. P., Barnby, G., Kobayashi, K., Lamb, J. A., Sousa, I., Sykes, N., Cook, E. H., Guter, S. J., Leventhal, B. L., Salt, J., Lord, C., Corsello, C., Hus, V., Weeks, D. E., Volkmar, F., Tauber, M., Fombonne, E., Shih, A. and Meyer, K. J. 2007. Mapping Autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*. 39(3): 319-328.

Tabuchi, K. and Sudhof, T. C. 2002. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics*. 79(6): 849-859.

Talebizadeh, Z., Lam, D. Y., Theodoro, M. F., Bittel, D. C., Lushington, G. H. and Butler, M. G. 2006. Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in Autism. *Journal of Medical Genetics*. 43(5): e21.

Ullrich, B., Ushkaryov, Y. A. and Sudhof, T. C. 1995. Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron*. 14(3): 497-507.

The Universal Protein Resource (UniProt). 2010. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P58400 (NRX1B_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/P58400>. (accessed 07/26/10).

Vincent, J. B., Kolozsvari, D., Roberts, W. S., Bolton, P. F., Gurling, H. M. and Scherer, S. W. 2004. Mutation screening of X-chromosomal neuroligin genes: no mutations in 196 Autism probands. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 129B(1): 82-84.

- Wermter, A. K., Kamp-Becker, I., Strauch, K., Schulte-Korne, G. and Remschmidt, H. 2008. No evidence for involvement of genetic variants in the X-linked neuroligin genes *NLGN3* and *NLGN4X* in probands with Autism spectrum disorder on high functioning level. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 147B(4): 535-537.
- Yamakawa, H., Oyama, S., Mitsuhashi, H., Sasagawa, N., Uchino, S., Kohsaka, S. and Ishiura, S. 2007. Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-gamma 2, and the interactions are affected by Autism-related mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 355(1): 41-46.
- Yan, J., Feng, J., Schroer, R., Li, W., Skinner, C., Schwartz, C. E., Cook, E. H., Jr. and Sommer, S. S. 2008a. Analysis of the neuroligin 4Y gene in patients with Autism. *Psychiatric Genetics*. 18(4): 204-207.
- Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, W., Schroer, R., Skinner, C., Zeng, W., Schwartz, C. E. and Sommer, S. S. 2008b. Neurexin 1 α structural variants associated with Autism. *Neuroscience Letters*. 438(3): 368-370.
- Yan, J., Oliveira, G., Coutinho, A., Yang, C., Feng, J., Katz, C., Sram, J., Bockholt, A., Jones, I. R., Craddock, N., Cook, E. H., Jr., Vicente, A. and Sommer, S. S. 2005. Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in Autism and other neuropsychiatric patients. *Molecular Psychiatry*. 10(4): 329-332.
- Ylisaukko-oja, T., Rehnstrom, K., Auranen, M., Vanhala, R., Alen, R., Kempas, E., Ellonen, P., Turunen, J. A., Makkonen, I., Riikonen, R., Nieminen-von Wendt, T., von Wendt, L., Peltonen, L. and Jarvela, I. 2005. Analysis of four neuroligin genes as candidates for Autism. *European Journal of Human Genetics*. 13(12): 1285-1292.

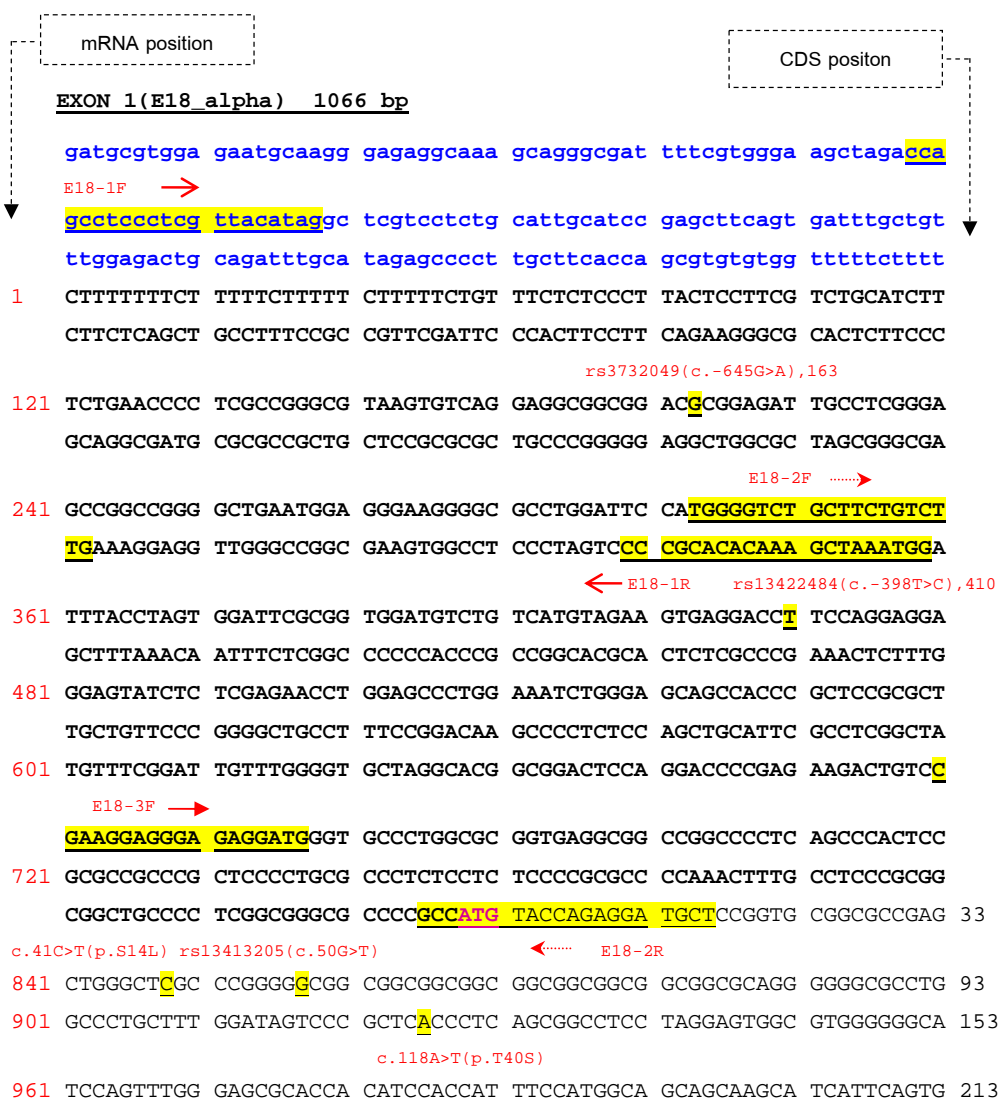
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รูปที่ 29 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-Neurexin 1 ที่ระบุตำแหน่งไพรเมอร์ และตำแหน่งสไนป์ส์

Gene: beta-Neurexin 1, DNA size (NT_022184) : 427.41 Kb, mRNA (NM_138735): 3730 bp, CDS (NP_620072): 1329 bp

สัญลักษณ์อักษรและสี: NON CODANT mRNA, CDS, start and stop codon, intronic adjacent sequences, Primer and SNPs position



1021 CCTATTGCAA TCTACAGGTC ACCGGCATCC TTGCGAGGCG GACACG 259
 gtgggtctgc gatgccaagt tctcgggggt tatcccctcg ctccccctctt tctaccctgc
 rs13023114(c.259+12A>G) ← E18-3R

EXON 2(E19) 182 bp

ccatttcttt taaaacaact tgggccactt tcttgagcac atttgattga aatctatgat
 ttactttgcc atagttttgt gtgtagagtt gatactttac tgatatatca atataacatg
 ccttgctaata gtgcagactt gatgtatttg gactaattgg ttttggtttt tgtttccag
 rs4611676(c.260-28C>G) rs80094872 (c.303G>A,p.Thr101Thr)
 1067 CTGGGACGAC ATATATCTTT AGCAAAGGTG GTGGACAAAT CACGTATAAG TGGCCTCCTA 319
 ATGACCGACC CAGTACACGA GCAGACAGAC TGGCCATAGG TTTTAGCACT GTTCAGAAAG 379
 1187 AAGCCGTATT GGTGCGAGTG GACAGTTCTT CAGGCTTGGG TGACTIONACTA GAACTGCATA 439
 1247 TA 441
 Gtaagtactt tttgcataag attcagcttt tactttttac tgtaacttt ttgtaagaa
 Tttataattt tgcttcttgg atgcttctctt cccccagaaa ccagtacttt gttataggaa
 ← E19R
 Atatgaatac aatctagagg aaataagacc atatacctat tgctgtagtt aatcgcgttc

EXON 3(E20) 172 bp

tcttaaattt acccagatgt caagaatctt gcttctacta catgtagttt ttcagaagta
 aaattggagg aaagcagctg ttgtccaaag cacattttaa aacaatacct tgatgtaat
 ctttattaaa tggtagctag tcaacttaac tcaactcttt tttcccctcc tctcttacag
 1249 CACCAGGGAA AAATTGGAGT TAAGTTTAAT GTTGGGACAG ATGACATCGC CATTGAAGAA 501
 TCCAATGCAA TCATTAATGA TGGGAAATAC CATGTAGTTC GTTTCACGAG GAGTGGTGCC 561
 1369 AATGCCACGT TGCAGGTGGA CAGCTGGCCA GTGATCGAGC GCTACCCTGC AG 613
 gtaagcaagt gaatatgtat cgggggaaga ttttatgaaa aacaaactgg aagaaaaagc
 actgttttgc atccgtttca ccaaattgtg gttttctgag aaaccatcaa ctatttattg
 gactttaagag tcatgtgaat gtaatgctgt cctaaactgt tcttgctaca gtgtacaaat
 ← E20R

EXON 4(E22) 320 bp

tgctctctt atagtttatt gctctcatta ttcaccccat aaaagatctg ttttatcattc
 cattgtagat atagagttca caatcaacat ttttgcatgt atgtaatatt atttttacag
 rs55776596(c.660C>T,p.G220G)
 1421 GCGTCAGCT CACAATCTTC AATAGCCAAG CAACCATAAT AATTGGCGG AAAGAGCAGG 673
 GCCAGCCCTT CCAGGGCCAG CTCTCTGGGC TGTACTACAA TGGCTTGAAA GTTCTGAATA 733
 1541 TGGCAGCCGA AAACGATGCC AACATCGCCA TAGTGGGAAA TGTGAGACTG GTTGGTGAAG 793
 rs79970751(c.738A>G,p.A246A) rs77665267(c.820A>C,p.Thr274Pro)
 TGCCTTCCTC TATGACAACT GAGTCAAACAG CCACTGCCAT GCAATCAGAG ATGTCCACAT 853
 1661 CAATTATGGA GACTACACAG ACCCTGGCTA CTAGCACAGC CAGAAGAGGA AAGCCCCGA 913
 c.3975C>T (alpha_NRXN1) rs74714098(c.873G>A, p.T291T)
 1721 CAAAAGAACC CATTAGCCAG 933

gtgagcctgt ggattttatt ccttcatttt catcctatat tatttatgat agtgggcttt
 tctgcatatg **g**gtcttttct aaattggaac attttt**ctga tottaggcac tacagcttcc**
 rs1363049 (c.933+71C>T) ←..... E22R

EXON 5 (E23) 88 bp

E23F>

ttgttttaaa cctctgtatg atactgtgtg cagcttctat ctgcattt**ga gtggatgggt**
atctacaagt tggctgtcac catttctgcg tcctcatgta aactaaagtg taatcaagtt
 ttcacaaaata ggcagttact tctatgaagg atcctaaaatg taagctctgt gtcttttagaa
 agggaaatag tgaatttgggt ttcttgataa acaaattgta tttcacttgt caatgagaca
 aagatgagag aatctgttag gaccctttaa attaatctac tgaatgtgat tcttttgcag
 1741 ACCACAGATG ACATCCTTGT GGCCTCAGCA GAGTGTCCCA GCGATGATGA GGACATTGAC 993
 1801 CCCT**G**TGAGC CGAGCTCAGG TGGGTTAG 1021
 rs77943160 (c.998G>A, p.C333Y)
 gttagtcaac ttttttctt acttccttgg ctttactgta aatctttggt gcatgttata
 ttcttagaa gggccttata **ttcatgtata gaaggctacc ctg**ctataacc atcgttgatt
 ←..... E23R

EXON 6 (E24) 1902 bp

E24F>

ctctgggtatt cagtgaactc aatgataact ttgtgtttgt tctcctcctc ttttctatag
 rs77435334 (c.1043G>A) rs55923848 (c.1059A>G, p.P353P)

1829 CCAACCCAAC CCGAGCAGGC **G**CAGAGAGC CGTATCC**A**GG CTCAGCAGAA GTGATCCGGG1081
 AGTCCAGCAG CACCACGGGT ATGGTCGTTG GGATAGTAGC CGCTGCCGCC CTGTGCATCC1141
 1949 TTATCCTCCT CTATGCCATG TACAAGTACA GAAACCGGGA TGAAGGCTCA TACCATGTGG1201
 ACGAGAGTCG AAACCTACATC AGTAACTCAG CACAGTCCAA TGGGGCTGTT GTAAAGGAGA1261
 2069 AACAAACCAG CAGTGCGAAA AGCTCCAACA AAAATAAGAA AAACAAGGAT AAAGAGTATT1321
 ATGTC**TGA**TC CCAAGATCTT AAATGGACAC TTGTATAGAA ATAGTCTTCA TTTTATCTGA1329
 ←.....E24R rs1045881(G>A,2246)

2189 GACATAATAT AAACCTATTT ACTTTCCTTT TTATGA**AGCA** **CATACAAAAG** **AAGACAGGGA**
 ATGCAATCAG GAAGGAAAGA CTTTTTAAAA AATAAAAACA AGTATCTCAT GCTCTTGT
 2309 CTCAAAAAAG AAAAAACAAA AACAAAAAAC AGGGGCCAAT AAATCCCTA ACATCCACAG
 TGTTCATCATT TACTCTGCTT GTCTTTATGT TGCTGGAACA TTTCTAAAAG ACAGTGATGA
 2429 CCGCACGCAT TCATAAAGCA AAGGAGTACT ACAGCATCAA GGCACAACAC AAAAACCAAC
 ACAAACATA ACACAAAAAA GAAGCTACCT ATGATCCTGG ATTAGCCAA AGTGCTAGCG
 2549 CTTTCCTGAG AAGTCAGTCC AATTGCCAGA GAAGACTGTC CTTTGTAGTG ACTCAACCTG
 CAAACCTTTA AGAGTTTGCC GCCTGGTGCA ACTGGAGCAG TGGTTGGAAC TTGCATTTGA
 2669 AACAAAGTGC TGGCTTTTTT GAAGACTTGT GTAGGAACAC ATCAAAAAG CCCCTTTCTG
 GTTGTGAGAG AGGAAAAAAA AGTATGGAGG CCTTATTTT CAAAATGTGA AATATAAGGC
 2789 ACGTTTTTAC ACAAATTTT AAAACAAAAA CAAGAGGGCA TAGATGCAAT CATTGGGAAA
 TTTTCATGCA CGCTTATTAT GTTATTACAT ATGTTTATAT AAAATCCATC TCTGTGTGCT
 2909 TTCTGGACTG TGATAAGTGA CGTTTTATAG CCTGTTGTAT AGAAAATGCA AAATATATCT
 CTGCTCTTCA GCCATTTTTG GTAAATTCAA TGTTATAAGT GTTGCTAAGT ATAGGGAGTT
 3029 TTATGACATC AGAGCAACAA TTATTTTCA GTGGTTTTT TTTTTTTTTG CCACCATTAT
 AAATTGCCAC AATTACTTTT ATTTTTTAAA GAAATTACAG TGTAGTGTTT ATTCTAAGGA

3149AGATATGTAT GAATGTATAT ACAAAGACTC AGCTACTTCT TTTCTTATAT GTACAGCCTT
 CATTCTGTTG CAATTAAGTT TTAGTACTTG TATGAAAGGT GTGAATTAGA AAGTCACATA
3269TATACATATG TATCTTATAA TCTTTTCTCC CTGAAATACT CACATTCCCA CATAATTCA
 CTATTTTCAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACGAATCC
3389ACAGCAATCC ATCAGATATG CTGGAAGATC CAAACGTGCA TACAGTAGCA AATATTTATT
 rs12998798(G>C,3463)
 GACAAATGA AAAGCAGGAA GGAAGAGGGT TGT**G**CCAAGG TATTGATGAC AAATGGGGTG
3509ATTGCTTCA TTGAGATCTT GCTCCCAGGT AACCTTAAGA AGATTTTAGT CCCTAAAGAA
 ATGAACCTT CCTTATCAA TAGAATATCA CTGATATACT GCTGCATGAA TAAGAACCAT
3629TATGTGGCA GGTATGGAA GCAAATTGG TTAATCTACA CCTTAACCTT GGCTGCTGCA
3689ATTGAAACT TTCTTTCTAA TAAAATAATA TATATATCTC TG (3730)
 aatctgatgtgcatgatgaacattttctggaaagtaaacacttttctctcgactaagaaagt
 atttttcagtaatttttgattctgtattactaccacttaaaaaatcatttctctgttaat
 tattgactatgttttaacttttctggtttttacatatatatcattaaatatagtttttagtt

รูปที่ 30 แสดงการแปลรหัสลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน beta-Neurexin 1

GenBank#NM_138735.2

mRNA 5593 bp

CDS 1329 bp

AA 442

By BioEdit program

>gil 2136-208609955:808Homo sapiens neurexin) 1NRXN(1, transcript variant beta, mRNA

1	ATG	TAC	CAG	AGG	ATG	CTC	CGG	TGC	GGC	GCC	GAG	CTG	GGC	TCG	CCC	45
1M	Y	Q	R	M	L	R	C	G	A	E	L	G	S	P		15
46	GGG	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GCA	GGG	GGG	CGC	90	
16	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	R	30	
91	CTG	GCC	CTG	CTT	TGG	ATA	GTC	CCG	CTC	ACC	CTC	AGC	GGC	CTC	CTA	135
31	L	A	L	L	W	I	V	P	L	T	L	S	G	L	L	45
136	GGA	GTG	GCG	TGG	GGG	GCA	TCC	AGT	TTG	GGA	GCG	CAC	CAC	ATC	CAC	180
46	G	V	A	W	G	A	S	S	L	G	A	H	H	I	H	60
181	CAT	TTC	CAT	GGC	AGC	AGC	AAG	CAT	CAT	TCA	GTG	CCT	ATT	GCA	ATC	225
61	H	F	H	G	S	S	K	H	H	S	V	P	I	A	I	75
226	TAC	AGG	TCA	CCG	GCA	TCC	TTG	CGA	GGC	GGA	CAC	CCT	GGG	ACG	ACA	270
76	Y	R	S	P	A	S	L	R	G	G	H	A	G	T	T	90
271	TAT	ATC	TTT	AGC	AAA	GGT	GGT	GGA	CAA	ATC	ACG	TAT	AAG	TGG	CCT	315
91	Y	I	F	S	K	G	G	G	Q	I	T	Y	K	W	P	105
316	CCT	AAT	GAC	CGA	CCC	AGT	ACA	CGA	GCA	GAC	AGA	CTG	GCC	ATA	GGT	360
106	P	N	D	R	P	S	T	R	A	D	R	L	A	I	G	120

361TTT AGC ACT GTT CAG AAA GAA GCC GTA TTG GTG CGA GTG GAC AGT 405
 121 F S T V Q K E A V L V R V D S 135
 406TCT TCA GGC TTG GGT GAC TAC CTA GAA CTG CAT ATA **CAC** CAG GGA 450
 136 S S G L G D Y L E L H I H Q G 150
 451AAA ATT GGA GTT AAG TTT AAT GTT GGG ACA GAT GAC ATC GCC ATT 495
 151 K I G V K F N V G T D D I A I 165
 496GAA GAA TCC AAT GCA ATC ATT AAT GAT GGG AAA TAC CAT GTA GTT 540
 166 E E S N A I I N D G K Y H V V 180
 541CGT TTC ACG AGG AGT GGT GGC AAT GCC ACG TTG CAG GTG GAC AGC 585
 181 R F T R S G G N A T L O V D S 195
 586TGG CCA GTG ATC GAG CGC TAC CCT GCA **GGG** CGT CAG CTC ACA ATC 630
 196 W P V I E R Y P A G R Q L T I 210
 631TTC AAT AGC CAA GCA ACC ATA ATA ATT GGC GGG AAA GAG CAG GGC 675
 211 F N S Q A T I I I G G K E Q G 225
 676CAG CCC TTC CAG GGC CAG CTC TCT GGG CTG TAC TAC AAT GGC TTG 720
 226 Q P F Q G Q L S G L Y Y N G L 240
 721AAA GTT CTG AAT ATG GCA GCC GAA AAC GAT GCC AAC ATC GCC ATA 765
 241 K V L N M A A E N D A N I A I 255
 766GTG GGA AAT GTG AGA CTG GTT GGT GAA GTG CCT TCC TCT ATG ACA 810
 256 V G N V R L V G E V P S S M T 270
 811ACT GAG TCA ACA GCC ACT GCC ATG CAA TCA GAG ATG TCC ACA TCA 855
 271 T E S T A T A M Q S E M S T S 285
 856ATT ATG GAG ACT ACC ACG ACC CTG GCT ACT AGC ACA GCC AGA AGA 900
 286 I M E T T T T L A T S T A R R 300
 901GGA AAG CCC CCG ACA AAA GAA CCC ATT AGC CAG **ACC** ACA GAT GAC 945
 301 G K P P T K E P I S Q T T D D 315
 946ATC CTT GTG GCC TCA GCA GAG TGT CCC AGC GAT GAT GAG GAC ATT 990
 316 I L V A S A E C P S D D F D I 330
 991GAC CCC TGT GAG CCG AGC TCA GGT GGG TTA **GCC** AAC CCA ACC CGA 1035
 331 D P C E P S S G G L A N P T R 345
 1036GCA GGC GGC AGA GAG CCG TAT CCA GGC TCA GCA GAA GTG ATC CGG 1080
 346 A G G R E P Y P G S A E V I R 360
 1081GAG TCC AGC AGC ACC ACG GGT ATG GTC GTT GGG ATA GTA GCC GCT 1125
 361 E S S S T T G M V V G I V A A 375
 1126GCC GCC CTG TGC ATC CTT ATC CTC CTC TAT GCC ATG TAC AAG TAC 1170
 376 A A L C I L I L L Y A M Y K Y 390
 1171AGA AAC CGG GAT GAA GGC TCA TAC CAT GTG GAC GAG AGT CGA AAC 1215
 391 R N R D E G S Y H V D E S R N 405
 1216TAC ATC AGT AAC TCA GCA CAG TCC AAT GGG GCT GTT GTA AAG GAG 1260
 406 Y I S N S A Q S N G A V V K E 420
 1261AAA CAA CCC AGC AGT GCG AAA AGC TCC AAC AAA AAT AAG AAA AAC 1305
 421 K Q P S S A K S S N K N K K N 435
 1306AAG GAT AAA GAG TAT TAT GTC TGA 1329
 436 K D K E Y Y V *

ตารางที่ 35 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนแต่ละโดเมน จากฐานข้อมูลโปรตีน Uniprot สืบค้น
ข้อมูลวันที่ 26 กรกฎาคม 2551

Feature key	Position(s) AA	Length	Description
Molecule processing			
Signal peptide	1 – 50	50	By similarity
Chain	51 – 442	392	Neurexin-1-beta
Regions			
Topological domain	51 – 363	313	Extracellular Potential
Transmembrane	364 – 386	23	Potential
Topological domain	387 – 442	56	Cytoplasmic Potential
Domain	91 – 259	169	Laminin G-like
Compositional bias	289 – 292	4	Poly-Thr
Compositional bias	374 – 377	4	Poly-Ala
Amino acid modifications			
Glycosylation	188	1	N-linked (GlcNAc...) Potential

ภาคผนวก ข

10 M Ammonium acetate (50 ml)		
CH ₃ COONH ₄ (FW = 77.08)	38.54	g
Deionized distilled water	50	ml
25% Ammonium persulfate (1 ml)		
ASP	0.25	g
Deionized distilled water	1	ml
2.5 mM dNTP Mix (400 µl)		
100 mM dATP	10	µl
100 mM dCTP	10	µl
100 mM dGTP	10	µl
100 mM dTTP	10	µl
Deionized distilled water	360	µl
Mix well, store at -20 °C		
0.5 M EDTA (pH 8.0) (1,000 ml)		
EDTA (FW = 372.24)	186.12	g
Deionized distilled water	1,000	ml
pH to 8.0 using NaOH		
Elution buffer (40 ml)		
10 M Ammonium acetate	2.5	ml
3 M Sodium Acetate (pH 5.2)	136	µl
0.5 M EDTA (pH 8.0)	80	µl
Deionized distilled water up to 40 ml		
Loading dye (for electroporesis)		
Bromophenol Blue	0.25%	
Glycerol	30%	

ภาคผนวก ข (ต่อ)

1 M MgCl ₂ (1,000 ml)			
MgCl ₂	203.31		g
Deionized distilled water	1,000		ml
10% SDS (50 ml)			
SDS	5		g
Deionized distilled water	50		ml
3 M Sodium Acetate pH 5.2 (100 ml)			
NaOAc*3H ₂ O	40.8		g
Deionized distilled water	100		ml
Lysis buffer (400 ml)			
5 M NaCl	11.2		ml
1 M Tris-HCl, pH8.0	4		ml
1 M MgCl ₂	0.6		ml
NP-40	0.4		ml
Deionized distilled water up to 400 ml			
10X TBE (1,000 ml)			
Tris base	109.03		g
Boric acid	55.65		g
EDTA	7.45		g
Distilled water up to 1,000 ml, store at room temperature			
TE buffer (1,000 ml)			
1 M Tris-HCl, pH 8.0	10		ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2		ml
Deionized distilled water up to 1,000 ml			
1 M Tris-HCl, pH 8.0 (1,000 ml)			
Tris (FW = 121.4 g/mol)	121.14		g
Deionized distilled water	1,000		ml

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 36 แสดงสลิปส์ของยีน **beta-Neurexin 1** (สลิปส์บริเวณอินทรอนแสดงเฉพาะตำแหน่งที่มีค่า avHet มากกว่า 0.3, สืบค้นเมื่อวันที่ 10 กันยายน 2553)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	Population diversity (allele frequency)				Func.
					HCB	JPT	CEU	YRI	
rs80349157	50146012	+	A/C	0.022	0.989 : 0.011		N.D.	N.D.	3'UTR
rs80333541	50146091	+	A/C	0.027	N.D.	N.D.	0.014 : 0.986		3'UTR
rs80323177	50146806	+	A/G	0.077	N.D.	N.D.	N.D.	0.04 : 0.96	3'UTR
rs11885824	50147171	+	A/C	0.404	0.36 : 0.64	0.39 : 0.61	0.2 : 0.8	0.24 : 0.76	3'UTR
rs77838429	50147390	+	A/G	0.027	N.D.	N.D.	0.986 : 0.014	N.D.	3'UTR
rs12998798	50147755	+	C/G	0.331	0.311 : 0.689	0.375 : 0.625	0.186 : 0.814	0.017 : 0.983	3'UTR
rs66845531	50147835	+	- /GTGTGT GTGT	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs66612444	50147872	+	- /TGTGTG TGTG	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs72488444	50147880	+	-/TG	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs10681654	50147882	+	-/TGTG	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs34401515	50147883	+	-/TGTG	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs3839058	50148111	-	-/ACTT	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs71902030	50148112	+	-/AAGT	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs70946881	50148117	+	-/GTAA	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs3839057	50148140	-	-/T	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3'UTR
rs74421750	50148542	+	A/T	0.077	N.D.	N.D.	N.D.	0.96 : 0.04	3'UTR
rs1045881	50148972	-	A/G	0.212	0.111 : 0.889	0.08 : 0.92	0.1 : 0.9	0.183 : 0.817	3'UTR

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCB	JPT	CEU	YRI	
rs55923848	50149352	-	A/G	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	coding-synon
rs77435334	50149368	-	A/G	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	missense
rs17039448	50149510	+	A/G	0.409	0.633 : 0.367	0.58 : 0.42	0.8 : 0.2	0.758 : 0.242	intron
rs17039452	50150348	+	A/T	0.302	0.689 : 0.311	0.633 : 0.367	0.817 : 0.183	1.0 : 0.0	intron
rs17039454	50150503	+	A/G	0.300	0.311 : 0.689	0.367 : 0.633	0.183 : 0.817	1.0 : 0.0	intron
rs34533417	50150644	+	A/G	0.500	0.67 : 0.33		0.819 : 0.181	N.D.	intron
rs17039456	50151057	+	C/G	0.402	0.367 : 0.633	0.4 : 0.6	0.2 : 0.8	0.208 : 0.792	intron
rs11902804	50151951	+	A/C	0.380	0.622 : 0.378	0.6 : 0.4	0.808 : 0.102	0.9 : 0.1	intron
rs10495987	50153280	+	A/C	0.496	0.5220.478	0.50.5	0.7 : 0.3	0.417 : 0.583	intron
rs1013597	50154815	-	C/T	0.398	0.378 : 0.622	0.409 : 0.591	0.2 : 0.8	0.233 : 0.767	intron
rs75081763	50155345	+	A/G	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.22 : 0.78	intron
rs10495988	50155935	+	A/G	0.310	0.3 : 0.7	0.78 : 0.622	0.183 : 0.817	0.008 : 0.992	intron
rs17039472	50156357	+	A/T	0.417	0.367 : 0.633	0.4 : 0.6	0.217 : 0.783	0.258 : 0.742	intron
rs12617277	50157772	+	C/T	0.416	0.633 : 0.367	0.607 : 0.393	0.78 : 0.22	0.754 : 0.246	intron
rs7598993	50158083	+	A/G	0.423	0.622 : 0.378	0.591 : 0.409	0.8 : 0.2	0.742 : 0.258	intron
rs11125278	50159004	+	C/T	0.424	0.378 : 0.622	0.411 : 0.589	0.2 : 0.8	0.241 : 0.759	intron
rs12995774	50159478	+	C/G	0.500	N.D.	N.D.	0.194 : 0.806	N.D.	intron
rs35373906	50159731	+	A/G	0.500	0.648 : 0.352		0.806 : 0.194	0.6 : 0.4	intron
rs62132414	50160604	+	C/G	0.369	0.716 : 0.284		0.806 : 0.194	N.D.	intron
rs13016321	50162412	+	A/G	0.418	0.622 : 0.378	0.6 : 0.4	0.8 : 0.2	0.75 : 0.25	intron
rs2241752	50162758	-	C/T	0.387	0.622 : 0.378	0.578 : 0.422	0.8 : 0.2	0.892 : 0.108	intron
rs2241750	50163153	-	C/T	0.417	0.367 : 0.633	0.389 : 0.611	0.203 : 0.797	0.267 : 0.733	intron
rs12465691	50163955	+	C/T	0.375	0.364 : 0.636		0.125 : 0.875	N.D.	intron
rs62132436	50164218	+	A/G	0.500	0.682 : 0.318		0.833 : 0.167	N.D.	intron
rs57936567	50164317	+	C/T	0.500	0.682 : 0.318		0.819 : 0.181	0.76 : 0.24	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs17039484	50164701	+	C/T	0.394	0.633 : 0.367	0.611 : 0.389	0.8 : 0.2	0.792 : 0.208	intron
rs4143112	50164923	-	A/C	0.365	0.367 : 0.633	0.386 : 0.614	0.2 : 0.8	0.095 : 0.905	intron
rs6758043	50165529	+	A/G	0.375	0.636 : 0.364	0.611 : 0.389	0.802 : 0.198	0.822 : 0.118	intron
rs6758276	50165688	+	A/G	0.403	0.705 : 0.295		0.889 : 0.111	0.62 : 0.38	intron
rs13007882	50166806	+	A/G	0.409	0.633 : 0.367	0.602 : 0.398	0.8 : 0.2	0.733 ; 0.267	intron
rs1421596	50167986	-	C/G	0.370	0.333 : 0.667	0.432 : 0.568	0.292 : 0.708	0.017 : 0.983	intron
rs920035	50168239	-	C/T	0.376	0.36 : 0.64	0.389 : 0.611	0.184 : 0.816	0.083 : 0.917	intron
rs920034	50168265	-	G/T	0.500	0.648 : 0.352		0.806 : 0.194	0.64 : 0.36	intron
rs920033	50168374	-	A/G	0.369	0.321 : 0.679	0.389 : 0.611	0.195 : 0.805	0.102 : 0.898	intron
rs13022108	50168884	+	A/G	0.412	0.636 : 0.364	0.6 : 0.4	0.797 : 0.203	0.736 : 0.264	intron
rs6745765	50169708	+	C/G	0.432	0.633 : 0.367	0.589 : 0.411	0.797 : 0.203	0.667 : 0.333	intron
rs12624115	50170096	+	A/C	0.500	0.443 : 0.557		0.374 : 0.653	N.D.	intron
rs17039508	50170237	+	C/T	0.399	0.644 : 0.356	0.6 : 0.4	0.814 : 0.186	0.767 : 0.233	intron
rs62132439	50170284	+	C/T	0.500	0.318 : 0.682		0.194 : 0.806	0.34 : 0.66	intron
rs1345562	50170729	+	C/G	0.410	0.364 : 0.636	0.411 : 0.589	0.183 : 0.817	0.246 : 0.754	intron
rs77943160	50170865	-	A/G	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	missense
rs6753652	50171273	+	C/G	0.411	0.398 : 0.602	0.422 : 0.578	0.183 : 0.817	0.233 ; 0.767	intron
rs12618646	50171658	+	A/G	0.423	0.6 : 0.4	0.568 : 0.432	0.8 : 0.2	0.742 : 0.258	intron
rs35371642	50171936	+	A/G	0.500	0.739 : 0.261		0.819 : 0.181	0.82 : 0.18	intron
rs10166360	50176213	+	C/G	0.355	0.7 : 0.3	0.636 : 0.364	0.7 : 0.3	0.967 : 0.33	intron
rs59973985	50176376	+	G/T	0.500	0.455 : 0.545		0.694 : 0.306	0.46 : 0.54	intron
rs1421594	50176965	-	C/T	0.495	0.522 : 0.478	0.5 : 0.5	0.692 : 0.308	0.467 : 0.533	intron
rs17039529	50177419	+	C/T	0.496	0.511 : 0.489	0.511 : 0.489	0.317 : 0.683	0.508 : 0.492	intron
rs1363046	50178151	-	A/T	0.496	0.5 : 0.5	0.5 : 0.5	0.317 : 0.683	0.533 : 0.467	intron
rs2193869	50179983	-	A/T	0.379	0.322 : 0.678	0.422 : 0.578	0.3 : 0.7	0.033 : 0.967	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs75009026	50181896	+	A/G	0.340	0.909 : 0.091		N.D.	0.56 : 0.44	intron
rs62132441	50182809	+	A/G	0.500	0.693 : 0.307		0.792 : 0.208	N.D.	intron
rs7573698	50183193	+	A/C	0.492	0.467 : 0.533	0.5 : 0.5	0.308 : 0.692	0.491 : 0.509	intron
rs7574241	50183506	+	A/G	0.489	0.466 : 0.534	0.5 : 0.5	0.308 : 0.692	0.458 : 0.542	intron
rs17491776	50183818	+	C/T	0.398	0.633 : 0.367	0.611 : 0.389	0.692 : 0.308	0.9 : 0.1	intron
rs6713560	50184099	+	A/G	0.493	0.476 : 0.533	0.5 : 0.5	0.308 : 0.692	0.525 : 0.475	intron
rs6713940	50184372	+	A/G	0.494	0.477 : 0.523	0.465 : 0.535	0.35 : 0.65	0.489 : 0.511	intron
rs2193868	50184641	-	A/C	0.415	0.389 : 0.611	0.4 : 0.6	0.308 : 0.692	0.125 : 0.875	intron
rs17039564	50186504	+	C/T	0.489	0.522 : 0.478	0.489 : 0.511	0.7 : 0.3	0.533 : 0.467	intron
rs80066956	50186791	+	G/T	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.220.78	intron
rs17039573	50189288	+	C/T	0.493	0.522 : 0.478	0.522 : 0.478	0.308 : 0.692	0.483 : 0.517	intron
rs17039575	50189317	+	C/G	0.495	0.5 : 0.5	0.489 : 0.511	0.692 : 0.308	0.458 : 0.542	intron
rs55899917	50189419	+	A/T	0.500	0.511 : 0.489		0.681 : 0.319	0.42 : 0.58	intron
rs56325957	50189420	+	A/C	0.500	0.511 : 0.489		0.681 : 0.319	0.42 : 0.58	intron
rs17039577	50189738	+	C/T	0.495	0.533 ; 0.467	0.533 ; 0.467	0.317 : 0.683	0.483 : 0.517	intron
rs12621581	50190353	+	A/G	0.490	0.467 : 0.533	0.511 : 0.489	0.308 : 0.692	0.483 : 0.517	intron
rs1421586	50191100	-	A/G	0.495	0.478 : 0.522	0.511 : 0.489	0.308 : 0.692	0.517 : 0.483	intron
rs983094	50193119	+	A/T	0.423	0.389 : 0.611	0.422 : 0.578	0.308 : 0.692	0.142 : 0.858	intron
rs17039581	50193483	+	C/T	0.305	0.333 : 0.667	0.378 : 0.622	0.158 : 0.842	0.008 : 0.992	intron
rs17039582	50193756	+	A/T	0.498	0.523 : 0.477	0.533 : 0.467	0.317 : 0.683	0.55 : 0.45	intron
rs725323	50194630	-	A/G	0.495	0.455 : 0.545	0.511 : 0.489	0.308 : 0.692	0.542 : 0.458	intron
rs17439140	50195048	+	C/T	0.401	0.648 : 0.352	0.6 : 0.4	0.695 : 0.305	0.867 : 0.133	intron
rs9679140	50195564	+	C/T	0.495	0.533 : 0.467	0.489 : 0.511	0.692 : 0.308	0.442 : 0.558	intron
rs11125280	50197075	+	C/T	0.482	0.567 : 0.433	0.578 : 0.422	0.783 : 0.217	0.433 : 0.567	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs79455050	50197264	+	C/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs17439328	50197285	+	C/T	0.340	0.911 : 0.089	0.956 : 0.044	0.675 : 0.325	0.683 : 0.317	intron
rs56889513	50200748	+	C/T	0.448	0.818 : 0.182		0.597 : 0.407	0.48 : 0.52	intron
rs13025736	50200793	+	A/T	0.477	0.57 : 0.43	0.593 : 0.407	0.341 : 0.659	0.255 : 0.745	intron
rs4971883	50201383	+	A/G	0.484	0.511 : 0.489	0.589 : 0.411	0.425 : 0.575	0.258 : 0.742	intron
rs6761463	50201547	+	C/G	0.302	0.822 : 0.178	0.933 : 0.067	0.858 : 0.142	0.675 : 0.325	intron
rs6719571	50201744	+	C/T	0.481	0.311 : 0.689	0.33 : 0.67	0.433 : 0.567	0.417 : 0.583	intron
rs17439468	50202021	+	C/T	0.404	0.8 : 0.2	0.778 : 0.222	0.625 : 0.375	0.733 : 0.267	intron
rs11899849	50202469	+	A/G	0.479	0.689 : 0.311	0.679 : 0.321	0.567 : 0.433	0.592 : 0.409	intron
rs11889551	50202953	+	G/T	0.474	0.678 : 0.322	0.67 : 0.33	0.567 : 0.433	0.575 : 0.425	intron
rs12615365	50205064	+	G/T	0.375	N.D.	N.D.	0.5 : 0.5	N.D.	intron
rs1895127	50205780	+	A/G	0.462	0.7 : 0.3	0.667 : 0.333	0.567 : 0.433	0.642 : 0.358	intron
rs2882594	50206732	+	C/T	0.468	0.256 : 0.744	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.417 : 0.583	intron
rs7608575	50207044	+	G/T	0.342	0.898 : 0.102		0.639 : 0.361	N.D.	intron
rs2351146	50207322	+	C/T	0.460	0.744 : 0.256	0.722 : 0.278	0.567 : 0.433	0.583 : 0.417	intron
rs58619206	50207909	+	C/T	0.435	0.261 : 0.739		0.333 : 0.667	0.4 : 0.6	intron
rs60267441	50207942	+	C/G	0.500	0.716 : 0.284		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs57707897	50208138	+	C/G	0.500	0.239 : 0.761		0.389 : 0.611	0.46 : 0.54	intron
rs57193820	50208274	+	A/T	0.500	0.364 : 0.636		0.389 : 0.611	0.46 : 0.54	intron
rs59781568	50208400	+	C/G	0.500	0.193 : 0.807		0.389 : 0.611	0.46 : 0.54	intron
rs72887815	50208558	+	A/T	0.478	0.375 : 0.625		0.375 : 0.625	0.46 : 0.54	intron
rs72887817	50208680	+	C/T	0.444	0.773 : 0.227		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs72887819	50208787	+	C/G	0.500	0.727 : 0.273		0.611 : 0.389	0.54 : 0.46	intron
rs72887820	50208809	+	C/T	0.500	0.75 : 0.25		0.611 : 0.389	0.54 : 0.46	intron
rs7565688	50209180	+	C/T	0.460	0.733 : 0.267	0.722 : 0.278	0.568 : 0.432	0.642 : 0.358	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs7565706	50209219	+	A/C	0.451	0.267 : 0.733	0.278 : 0.722	0.432 : 0.568	0.358 : 0.642	intron
rs2112073	50209558	+	C/T	0.467	0.733 : 0.267	0.727 : 0.273	0.567 : 0.433	0.608 : 0.392	intron
rs2351148	50209635	+	C/T	0.461	0.733 : 0.267	0.722 : 0.278	0.568 : 0.432	0.642 : 0.358	intron
rs7569617	50210244	+	C/G	0.447	0.267 : 0.733	0.278 : 0.722	0.415 : 0.585	0.358 : 0.642	intron
rs7595904	50210299	+	A/G	0.461	0.7 : 0.3	0.667 : 0.333	0.569 : 0.431	0.642 : 0.358	intron
rs58564477	50210555	+	C/G	0.500	0.716 : 0.284		0.625 : 0.375	0.56 : 0.44	intron
rs12470829	50210597	+	A/G	0.261	0.83 : 0.17	0.922 : 0.078	0.817 : 0.129	0.767 : 0.233	intron
rs12478797	50210702	+	A/G	0.293	0.167 : 0.833	0.67 : 0.933	0.136 : 0.864	0.325 : 0.675	intron
rs62134607	50210842	+	C/T	0.454	0.75 : 0.25		0.597 : 0.403	0.56 : 0.44	intron
rs78907042	50211153	+	A/G	0.500	0.83 : 0.17		0.889 : 0.111	0.78 : 0.22	intron
rs62134608	50211174	+	C/T	0.500	N.D.	N.D.	0.639 : 0.361	0.56 : 0.44	intron
rs11896576	50212829	+	A/C	0.447	0.211 : 0.789	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.358 : 0.642	intron
rs11896677	50213031	+	C/T	0.453	0.789 : 0.211	0.727 : 0.273	0.592 : 0.408	0.642 : 0.358	intron
rs6545137	50213678	+	C/T	0.309	0.822 : 0.178	0.9 : 0.1	0.873 : 0.127	0.65 : 0.35	intron
rs6713466	50214157	+	A/G	0.500	0.239 : 0.761		0.361 : 0.639	N.D.	intron
rs62134611	50214251	+	C/G	0.500	0.25 : 0.75		0.361 : 0.639	N.D.	intron
rs1435090	50214739	+	C/T	0.477	0.622 : 0.378	0.656 : 0.344	0.458 : 0.542	0.15 : 0.85	intron
rs1836545	50214802	+	G/T	0.455	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.375 : 0.625	intron
rs61405508	50215329	+	G/T	0.412	0.136 : 0.864		0.375 : 0.625	0.44 : 0.56	intron
rs1363025	50215373	+	A/G	0.442	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.373 : 0.627	intron
rs1363026	50215806	+	G/T	0.452	0.211 : 0.789	0.273 : 0.727	0.408 : 0.592	0.358 : 0.642	intron
rs1363027	50215900	+	C/G	0.443	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.375 : 0.625	intron
rs7569404	50215987	+	C/G	0.444	0.205 : 0.795	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.373 : 0.627	intron
rs7421423	50216699	+	A/G	0.436	0.205 : 0.795	0.261 : 0.739	0.408 : 0.592	0.358 : 0.642	intron
rs62134612	50216774	+	C/T	0.412	0.818 : 0.182		0.681 : 0.319	0.56 : 0.44	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs6722600	50216966	+	A/G	0.440	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.358 : 0.642	intron
rs6740669	50217240	+	A/T	0.444	0.25 : 0.75		0.361 : 0.639	0.44 : 0.56	intron
rs6754304	50217439	+	A/T	0.440	0.778 : 0.222	0.722 : 0.278	0.592 : 0.408	0.642 : 0.358	intron
rs72887838	50217474	+	C/T	0.363	0.818 : 0.182		0.667 : 0.333	0.8 : 0.2	intron
rs57609733	50217659	+	A/G	0.500	0.193 : 0.807		0.375 : 0.625	0.44 : 0.56	intron
rs1421567	50217995	+	C/T	0.317	0.833 : 0.167	0.932 : 0.068	0.867 : 0.133	0.633 : 0.367	intron
rs62134614	50218154	+	A/C	0.500	0.739 : 0.261		0.639 : 0.361	0.56 : 0.44	intron
rs11886516	50218224	+	A/C	0.500	0.83 : 0.17		0.639 : 0.361	0.46 : 0.54	intron
rs11897428	50218369	+	A/C	0.448	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.4 : 0.6	intron
rs57655336	50218564	+	A/T	0.500	0.102 : 0.898		0.361 : 0.639	0.44 : 0.56	intron
rs1592722	50218730	+	A/G	0.443	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.408 : 0.592	0.377 : 0.623	intron
rs1592723	50218908	+	A/C	0.446	0.784 : 0.216	0.722 : 0.278	0.592 : 0.408	0.608 : 0.392	intron
rs11125281	50219270	+	A/G	0.496	0.633 : 0.367	0.656 : 0.344	0.458 : 0.542	0.475 : 0.525	intron
rs75556941	50219773	+	A/C	0.335	N.D.	N.D.	0.25 : 0.75	0.160 : 0.84	intron
rs11689893	50219857	+	C/T	0.408	0.567 : 0.433	0.511 : 0.489	0.7 : 0.3	1.0 : 0.0	intron
rs58384284	50219991	+	A/G	0.448	0.261 : 0.739		0.361 : 0.639	0.44 : 0.56	intron
rs1592725	50220108	+	A/G	0.437	0.784 : 0.216	0.722 : 0.278	0.595 : 0.405	0.644 : 0.356	intron
rs74795167	50220111	+	C/T	0.283	0.17 : 0.83		N.D.	N.D.	intron
rs1592726	50220244	+	A/G	0.440	0.784 : 0.216	0.722 : 0.278	0.592 : 0.408	0.642 : 0.358	intron
rs1421568	50220777	+	A/G	0.449	0.768 : 0.232	0.709 : 0.291	0.585 : 0.415	0.625 : 0.375	intron
rs1363031	50220904	+	C/G	0.441	0.784 : 0.216	0.722 : 0.278	0.592 : 0.408	0.625 : 0.375	intron
rs1363032	50220996	+	A/G	0.440	0.789 : 0.211	0.722 : 0.278	0.592 : 0.408	0.633 : 0.367	intron
rs10495990	50221175	+	A/T	0.387	0.857 : 0.143	0.744 : 0.256	0.604 : 0.396	0.748 : 0.252	intron
rs6741686	50221222	+	C/T	0.454	0.784 : 0.216	0.727 : 0.273	0.592 : 0.408	0.633 : 0.367	intron
rs6545138	50221507	+	A/G	0.454	0.198 : 0.802	0.291 : 0.709	0.487 : 0.513	0.415 : 0.585	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs6545139	50221656	+	A/G	0.500	0.273 : 0.727		0.347 : 0.653	0.46 : 0.54	intron
rs6545140	50221979	+	A/T	0.442	0.789 : 0.211	0.727 : 0.273	0.568 : 0.432	0.642 : 0.358	intron
rs62134646	50222397	+	A/T	0.500	0.75 : 0.25		0.611 : 0.389	0.56 : 0.44	intron
rs62134647	50222408	+	A/G	0.500	0.727 : 0.273		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs17492942	50222599	+	C/G	0.452	0.789 : 0.211	0.722 : 0.278	0.583 : 0.417	0.642 : 0.358	intron
rs17493005	50223313	+	A/T	0.453	0.216 : 0.784	0.722 : 0.278	0.417 : 0.583	0.353 : 0.642	intron
rs1897924	50223434	+	A/G	0.396	0.14 : 0.86	0.262 : 0.738	0.407 : 0.593	0.262 : 0.738	intron
rs6747457	50224226	+	G/T	0.442	0.211 : 0.789	0.273 : 0.727	0.417 : 0.583	0.375 : 0.625	intron
rs17493081	50224566	+	A/G	0.453	0.211 : 0.789	0.278 : 0.722	0.417 : 0.583	0.358 : 0.642	intron
rs6733024	50224602	+	C/T	0.496	0.789 : 0.211	0.722 : 0.278	0.583 : 0.417	0.25 : 0.75	intron
rs17493116	50224701	+	A/G	0.456	0.211 : 0.789	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.375 : 0.625	intron
rs4508640	50224825	+	C/T	0.386	0.852 : 0.148	0.778 : 0.222	0.642 : 0.358	0.725 : 0.275	intron
rs4404319	50225012	+	A/T	0.455	0.216 : 0.784	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.358 : 0.642	intron
rs62134650	50225125	+	G/T	0.454	0.261 : 0.739		0.375 : 0.625	0.46 : 0.54	intron
rs62134651	50225127	+	C/G	0.500	0.75 : 0.25		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs17440201	50225226	+	G/T	0.455	0.789 : 0.211	0.722 : 0.278	0.583 : 0.417	0.625 : 0.375	intron
rs61073961	50225508	+	C/T	0.500	0.784 : 0.216		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs7559968	50225812	+	A/T	0.500	0.761 : 0.239		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs2216522	50225988	-	A/G	0.443	0.8 : 0.2	0.727 : 0.273	0.567 : 0.433	0.625 : 0.375	intron
rs2193867	50226094	-	C/T	0.455	0.8 : 0.2	0.722 : 0.278	0.567 : 0.433	0.625 : 0.375	intron
rs2193866	50226140	-	C/T	0.455	0.8 : 0.2	0.722 : 0.278	0.567 : 0.433	0.619 : 0.382	intron
rs7603788	50226335	+	C/T	0.451	0.193 : 0.807	0.237 : 0.272	0.433 : 0.567	0.358 : 0.642	intron
rs7563354	50226389	+	A/C	0.437	0.821 : 0.179	0.733 : 0.267	0.569 : 0.431	0.64 : 0.36	intron
rs7604126	50226623	+	C/T	0.388	0.144 : 0.856	0.222 : 0.778	0.375 : 0.625	0.233 : 0.767	intron
rs1421585	50226736	-	C/T	0.454	0.2 : 0.8	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.375 : 0.625	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1421584	50226823	-	C/G	0.456	0.2 : 0.8	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.375 : 0.625	intron
rs56792051	50226846	+	C/T	0.500	0.807 : 0.193		0.681 : 0.319	0.8 : 0.2	intron
rs1421583	50226918	-	A/C	0.455	0.795 : 0.205	0.722 : 0.278	0.567 : 0.433	0.634 : 0.366	intron
rs1895126	50227098	-	A/G	0.456	0.205 : 0.795	0.273 : 0.727	0.433 : 0.567	0.371 : 0.629	intron
rs1421582	50227423	-	C/T	0.455	0.2 : 0.8	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.375 : 0.625	intron
rs17493390	50227527	+	A/G	0.457	0.8 : 0.2	0.722 : 0.278	0.567 : 0.433	0.619 : 0.381	intron
rs72887870	50227635	+	C/T	0.438	0.193 : 0.807		0.375 : 0.625	0.48 : 0.52	intron
rs17493439	50227712	+	A/T	0.456	0.2 : 0.8	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.375 : 0.625	intron
rs10495991	50227864	+	C/T	0.444	0.2 ; 0.8	0.278 : 0.722	0.433 : 0.567	0.375 : 0.625	intron
rs62134654	50227997	+	A/G	0.500	0.761 : 0.239		0.639 : 0.361	0.52 : 0.48	intron
rs6706472	50228332	+	C/T	0.500	0.622 : 0.378	0.656 : 0.344	0.433 : 0.567	0.442 : 0.558	intron
rs6706484	50228366	+	C/T	0.252	0.822 : 0.178	0.933 : 0.067	0.867 : 0.133	0.842 : 0.158	intron
rs6706613	50228459	+	C/T	0.370	0.822 : 0.178	0.933 : 0.067	0.867 : 0.133	0.842 : 0.158	intron
rs1543823	50228632	-	G/T	0.500	0.378 : 0.622	0.344 : 0.565	0.55 : 0.45	0.558 : 0.442	intron
rs62134656	50229127	+	A/G	0.500	N.D.	N.D.	0.625 : 0.375	N.D.	intron
rs62134657	50229144	+	C/T	0.500	0.091 : 0.909		0.375 : 0.625	0.54 : 0.46	intron
rs1865488	50230781	+	A/C	0.457	0.744 : 0.256	0.722 : 0.278	0.567 : 0.433	0.65 : 0.35	intron
rs1865489	50230912	+	C/T	0.459	0.705 : 0.295		0.639 : 0.361	0.54 : 0.46	intron
rs59887674	50231294	+	C/G	0.500	0.216 : 0.784		0.347 : 0.653	0.2 : 0.8	intron
rs10173664	50231543	+	C/G	0.420	0.443 : 0.557		0.597 : 0.403	0.62 : 0.38	intron
rs2216521	50231614	+	A/G	0.420	N.D.	N.D.	0.417 : 0.583	N.D.	intron
rs1369294	50232133	+	C/T	0.450	0.267 : 0.733	0.289 : 0.711	0.432 : 0.568	0.345 : 0.655	intron
rs1421579	50232145	+	A/G	0.497	0.567 : 0.433	0.644 : 0.356	0.433 : 0.567	0.25 : 0.75	intron
rs72887883	50232521	+	C/G	0.456	0.727 : 0.273		0.639 : 0.361	0.52 : 0.48	intron
rs12713081	50232780	+	C/G	0.499	0.433 : 0.567	0.352 : 0.648	0.57 : 0.43	0.526 : 0.474	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs9941548	50232894	+	C/G	0.449	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.569 : 0.431	0.655 : 0.345	intron
rs1159136	50233372	+	C/G	0.449	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.569 : 0.431	0.655 : 0.345	intron
rs1159137	50233541	+	C/T	0.458	0.267 : 0.733	0.289 : 0.711	0.432 : 0.568	0.35 : 0.65	intron
rs7590237	50234000	+	A/G	0.450	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.568 : 0.432	0.655 : 0.345	intron
rs59032342	50234023	+	C/T	0.500	0.716 : 0.284		0.625 : 0.375	0.54 : 0.46	intron
rs7573338	50234303	+	A/G	0.445	0.733 : 0.267	0.716 : 0.284	0.569 : 0.431	0.676 : 0.324	intron
rs79944261	50234343	+	A/C	0.424	N.D.	N.D.	0.694 : 0.306	N.D.	intron
rs1145523	50234755	+	A/T	0.354	N.D.	N.D.	0.77 : 0.23	N.D.	intron
rs6545142	50235119	+	A/G	0.500	0.261 : 0.739		0.375 : 0.625	0.54 : 0.46	intron
rs74410944	50235204	+	C/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs17441066	50235264	+	A/T	0.458	0.267 : 0.733	0.289 : 0.711	0.43 : 0.57	0.336 : 0.664	intron
rs11891637	50236033	+	C/T	0.375	N.D.	N.D.	0.25 : 0.75	0.2 : 0.8	intron
rs11887101	50236137	+	G/T	0.446	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.57 : 0.43	0.667 : 0.333	intron
rs10196324	50236619	+	A/T	0.499	0.422 : 0.578	0.356 : 0.644	0.568 : 0.432	0.525 : 0.475	intron
rs1363038	50236641	+	A/G	0.500	0.693 : 0.307		0.625 : 0.375	0.52 : 0.48	intron
rs17494124	50237179	+	A/G	0.459	0.267 : 0.733	0.311 : 0.689	0.432 : 0.568	0.35 : 0.65	intron
rs10495992	50237329	+	G/T	0.448	0.267 : 0.733	0.284 : 0.716	0.433 : 0.567	0.35 : 0.65	intron
rs12620898	50237641	+	A/T	0.450	0.733 : 0.267	0.7 : 0.3	0.568 : 0.432	0.667 : 0.333	intron
rs17441242	50237902	+	A/G	0.456	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.568 : 0.432	0.658 : 0.342	intron
rs10495993	50238115	+	A/G	0.459	0.733 : 0.276	0.698 : 0.302	0.5 : 0.5	0.589 : 0.411	intron
rs79725739	50238433	+	A/T	0.385	N.D.	N.D.	N.D.	0.25 : 0.74	intron
rs6710767	50238480	+	A/C	0.458	0.267 : 0.733	0.302 : 0.698	0.496 : 0.504	0.411 : 0.589	intron
rs12615426	50238565	+	C/T	0.379	0.789 : 0.211	0.773 : 0.227	0.638 : 0.362	0.809 : 0.191	intron
rs10495994	50238617	+	A/C	0.458	0.276 : 0.733	0.306 : 0.694	0.496 : 0.504	0.404 : 0.596	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1469002	50238962	+	A/G	0.320	N.D.	N.D.	0.194 : 0.806	0.14 : 0.86	intron
rs1469004	50239387	+	A/G	0.499	0.422 : 0.578	0.344 : 0.656	0.57 : 0.43	0.526 : 0.474	intron
rs17441396	50239667	+	C/T	0.460	0.267 : 0.733	0.289 : 0.711	0.441 : 0.559	0.339 : 0.661	intron
rs76552827	50240068	+	C/T	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.78 : 0.22	intron
rs3796036	50240644	-	A/G	0.446	0.267 : 0.733	0.289 : 0.711	0.412 : 0.588	0.345 : 0.655	intron
rs3796035	50240947	-	C/G	0.415	0.611 : 0.389	0.511 : 0.489	0.728 : 0.272	0.949 : 0.051	intron
rs1421599	50241002	+	C/T	0.320	0.523 : 0.477		0.417 : 0.583	0.32 : 0.68	intron
rs11125282	50241244	+	G/T	0.375	0.511 : 0.489		0.764 : 0.236	N.D.	intron
rs7573331	50241268	+	A/G	0.480	0.267 : 0.733	0.291 : 0.709	0.407 : 0.593	0.567 : 0.433	intron
rs7587669	50241698	+	A/T	0.500	0.318 : 0.682		0.375 : 0.625	0.48 : 0.52	intron
rs62132490	50241896	+	A/G	0.500	0.705 : 0.295		0.625 : 0.375	0.52 : 0.48	intron
rs7591097	50242423	+	G/T	0.461	0.267 : 0.733	0.489 : 0.711	0.433 : 0.567	0.342 : 0.658	intron
rs6755887	50242834	+	A/G	0.489	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.559 : 0.441	0.424 : 0.576	intron
rs12713082	50243099	+	C/G	0.491	0.567 : 0.433	0.644 : 0.356	0.431 : 0.569	0.259 : 0.741	intron
rs6730770	50243181	+	C/T	0.478	0.733 : 0.267	0.711 : 0.289	0.617 : 0.383	0.45 : 0.55	intron
rs13003111	50243386	+	G/T	0.399	0.622 : 0.378	0.522 : 0.478	0.717 : 0.283	0.95 : 0.05	intron
rs6731061	50243402	+	C/T	0.453	0.83 : 0.17	0.811 : 0.189	0.633 : 0.367	0.45 : 0.55	intron
rs1469794	50244721	+	A/T	0.476	0.333 : 0.667	0.256 : 0.744	0.367 : 0.633	0.567 : 0.433	intron
rs59557443	50245115	+	C/T	0.295	N.D.	N.D.	N.D.	0.82 : 0.18	intron
rs58906199	50245140	+	A/G	0.295	N.D.	N.D.	N.D.	0.82 : 0.18	intron
rs6545145	50245211	+	G/T	0.329	0.756 : 0.244	0.811 : 0.189	0.783 : 0.217	0.805 : 0.195	intron
rs10208220	50245231	+	A/G	0.491	0.322 : 0.678	0.244 : 0.756	0.374 : 0.626	0.708 : 0.292	intron
rs6753833	50247149	+	A/G	0.480	0.307 : 0.693	0.244 : 0.756	0.356 : 0.644	0.586 : 0.414	intron
rs10192012	50247620	+	A/G	0.361	0.722 : 0.278	0.781 : 0.219	0.758 : 0.242	0.8 : 0.2	intron
rs6754803	50247942	+	A/G	0.375	0.284 : 0.716		0.264 : 0.736	N.D.	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs768249	50248355	+	A/T	0.409	0.722 : 0.278	0.789 : 0.211	0.758 : 0.242	0.65 : 0.35	intron
rs1363036	50248461	+	C/G	0.331	0.156 : 0.844	0.056 : 0.944	0.142 : 0.858	0.017 : 0.983	intron
rs768250	50248519	+	G/T	0.399	0.722 : 0.278	0.795 : 0.205	0.758 : 0.242	0.65 : 0.35	intron
rs1363037	50248648	+	C/T	0.378	0.318 : 0.682		0.264 : 0.736	N.D.	intron
rs10495995	50248913	+	A/G	0.450	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.233 : 0.767	0.2 : 0.8	intron
rs12233251	50249774	+	C/T	0.481	0.667 : 0.333	0.767 : 0.233	0.653 : 0.347	0.4 : 0.6	intron
rs4971634	50250335	+	A/G	0.377	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.233 : 0.767	0.283 : 0.717	intron
rs4971636	50250919	+	A/T	0.343	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.229 : 0.771	0.153 : 0.847	intron
rs9677968	50251100	+	A/G	0.441	0.322 : 0.678	0.233 : 0.767	0.347 : 0.653	0.4 : 0.6	intron
rs6712970	50251363	+	A/T	0.349	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.233 : 0.767	0.158 : 0.842	intron
rs1035342	50252452	-	C/T	0.379	0.722 : 0.278	0.8 : 0.2	0.767 : 0.233	0.717 : 0.283	intron
rs13013447	50253694	+	C/T	0.343	0.722 : 0.278	0.8 : 0.2	0.767 : 0.233	0.85 : 0.15	intron
rs12987268	50253909	+	C/T	0.345	0.289 : 0.711	0.2 : 0.8	0.233 : 0.767	0.15 : 0.85	intron
rs6736816	50255589	+	C/G	0.321	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.195 : 0.805	0.15 : 0.85	intron
rs17039676	50256939	+	C/T	0.340	0.956 : 0.044	0.956 : 0.044	0.883 : 0.117	0.433 : 0.567	intron
rs17039678	50257180	+	C/T	0.410	0.122 : 0.878	0.057 : 0.943	0.375 : 0.625	0.433 : 0.567	intron
rs12469906	50257479	+	A/G	0.333	0.044 : 0.956	0.044 : 0.956	0.208 : 0.792	0.475 : 0.525	intron
rs6745029	50257635	+	C/G	0.311	0.044 : 0.956	0.044 : 0.956	0.117 : 0.883	0.492 : 0.508	intron
rs17039682	50258675	+	A/T	0.427	0.111 : 0.889	0.044 : 0.956	0.364 : 0.636	0.558 : 0.442	intron
rs67002105	50258802	+	C/T	0.320	0.068 : 0.932		0.167 : 0.833	0.48 : 0.52	intron
rs1895130	50259939	-	C/T	0.393	0.291 : 0.709	0.189 : 0.811	0.237 : 0.763	0.362 : 0.638	intron
rs7601845	50260053	+	A/G	0.360	0.702 : 0.298	0.811 : 0.189	0.763 : 0.237	0.763 : 0.237	intron
rs4971640	50260872	+	A/G	0.378	0.317 : 0.683	0.189 : 0.811	0.184 : 0.816	0.333 : 0.667	intron
rs2351152	50262230	+	C/T	0.358	0.289 : 0.711	0.2 : 0.8	0.283 : 0.717	0.158 : 0.842	intron
rs2351153	50262298	+	A/G	0.310	0.261 : 0.739	0.17 : 0.83	0.2 : 0.8	0.153 : 0.847	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs10176824	50262386	+	A/C	0.388	0.111 : 0.889	0.044 : 0.956	0.325 : 0.675	0.483 : 0.517	intron
rs17442274	50262402	+	C/T	0.283	0.111 : 0.889	0.044 : 0.956	0.322 : 0.678	0.108 : 0.892	intron
rs77214107	50262734	+	G/T	0.387	N.D.	N.D.	0.778 : 0.222	0.68 : 0.32	intron
rs2117560	50262972	+	C/T	0.393	0.11 : 0.89	0.049 : 0.951	0.339 : 0.661	0.425 : 0.575	intron
rs1421597	50263845	+	A/G	0.382	0.111 : 0.889	0.044 : 0.956	0.317 : 0.683	0.467 : 0.533	intron
rs67418468	50265861	+	C/T	0.389	N.D.	N.D.	0.264 : 0.736	N.D.	intron
rs72834744	50265991	+	A/C	0.401	N.D.	N.D.	0.722 : 0.278	N.D.	intron
rs1882296	50266845	-	A/G	0.407	0.878 : 0.122	0.933 : 0.067	0.633 : 0.367	0.576 : 0.424	intron
rs7571851	50267142	+	C/T	0.407	0.122 : 0.878	0.067 : 0.933	0.367 : 0.633	0.425 : 0.575	intron
rs1819971	50267994	+	C/G	0.489	0.378 : 0.622	0.25 : 0.75	0.556 : 0.444	0.608 : 0.392	intron
rs1819972	50268228	+	G/T	0.340	0.744 : 0.256	0.818 : 0.182	0.792 : 0.208	0.767 : 0.233	intron
rs10191808	50268555	+	G/T	0.496	0.622 : 0.378	0.767 : 0.233	0.425 : 0.575	0.458 : 0.542	intron
rs10191989	50268711	+	C/T	0.315	0.756 : 0.244	0.822 : 0.178	0.792 : 0.208	0.842 : 0.158	intron
rs1363048	50269304	+	A/T	0.495	0.367 : 0.633	0.244 : 0.756	0.567 : 0.433	0.533 : 0.467	intron
rs10182887	50269687	+	A/G	0.401	N.D.	N.D.	0.278 : 0.722	N.D.	intron
rs1421571	50270925	+	A/G	0.549	0.378 : 0.622	0.333 : 0.667	0.35 : 0.65	0.417 : 0.583	intron
rs9309174	50271210	+	C/T	0.485	0.378 : 0.622	0.333 : 0.667	0.35 : 0.65	0.433 : 0.567	intron
rs7599813	50271600	+	A/G	0.456	0.378 : 0.622	0.333 : 0.667	0.336 : 0.664	0.377 : 0.623	intron
rs10169067	50272736	+	A/G	0.446	0.784 : 0.216		0.528 : 0.472	0.8 : 0.2	intron
rs1421573	50273429	+	C/T	0.350	0.677 : 0.333	0.589 : 0.411	0.875 : 0.125	0.9 : 0.1	intron
rs11688779	50273887	+	C/G	0.375	0.307 : 0.693		0.111 : 0.889	N.D.	intron
rs13003633	50273897	+	C/T	0.444	0.364 : 0.636		0.431 : 0.569	0.44 : 0.56	intron
rs1421574	50274067	+	A/C	0.468	0.633 : 0.367	0.667 : 0.333	0.653 : 0.347	0.54 : 0.46	intron
rs1421575	50274113	+	G/T	0.433	0.646 : 0.354	0.698 : 0.302	0.704 : 0.296	0.64 : 0.36	intron
rs1035343	50274422	-	A/G	0.376	0.367 : 0.633	0.341 : 0.659	0.317 : 0.683	0.044 : 0.956	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1037427	50274714	-	A/G	0.453	0.33 : 0.67		0.431 : 0.569	0.36 : 0.64	intron
rs1037426	50274774	-	A/G	0.468	0.633 : 0.367	0.667 : 0.333	0.65 : 0.35	0.559 : 0.441	intron
rs3861560	50274961	-	A/T	0.379	0.633 : 0.367	0.667 : 0.333	0.65 : 0.35	0.967 : 0.033	intron
rs3861561	50275078	-	C/T	0.459	0.367 : 0.633	0.341 : 0.659	0.35 : 0.65	0.442 : 0.558	intron
rs3909275	50275688	+	A/T	0.451	0.375 : 0.625	0.338 : 0.662	0.348 : 0.652	0.479 : 0.521	intron
rs12470518	50276061	+	C/T	0.332	0.633 : 0.367	0.6 : 0.4	0.925 : 0.075	0.9 : 0.1	intron
rs11125283	50276116	+	A/G	0.480	0.352 : 0.648		0.417 : 0.583	N.D.	intron
rs7421418	50277060	+	C/G	0.368	0.367 : 0.633	0.333 : 0.667	0.314 : 0.686	0.025 : 0.975	intron
rs1452773	50277949	-	A/C	0.405	0.607 : 0.393	0.58 : 0.42	0.836 : 0.164	N.D.	intron
rs1363050	50280283	-	A/G	0.363	0.367 : 0.633	0.333 : 0.667	0.305 : 0.695	0 : 1	intron
rs1363049	50280338	-	C/T	0.483	0.367 : 0.633	0.341 : 0.659	0.35 : 0.65	0.558 : 0.442	intron
rs74714098	50280469	+	C/T	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	coding-synon
rs77665267	50280522	+	G/T	0.129	N.D.	N.D.	0.069 : 0.931	N.D.	missense
rs79970751	50280604	-	A/G	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	coding-synon
rs55776596	50280682	-	C/T	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	coding-synon
rs10469913	50280975	+	A/G	0.320	0.33 : 0.67		0.44 : 0.56	0.44 : 0.56	intron
rs4971644	50281638	+	C/T	0.396	0.622 : 0.378	0.659 : 0.341	0.69 : 0.31	0.881 : 0.119	intron
rs4971551	50283485	+	G/T	0.469	0.622 : 0.378	0.659 : 0.341	0.65 : 0.35	0.567 : 0.433	intron
rs12617823	50283623	+	A/C	0.420	0.398 : 0.602		0.431 : 0.569	0.32 : 0.68	intron
rs6708181	50283888	+	A/T	0.482	0.67 : 0.33		0.569 : 0.431	0.58 : 0.42	intron
rs6545147	50284017	+	C/T	0.370	0.622 : 0.378	0.667 : 0.337	0.686 : 0.314	0.983 : 0.017	intron
rs1363045	50284321	-	C/T	0.457	0.6 : 0.4	0.651 : 0.349	0.667 : 0.333	0.76 : 0.24	intron
rs1363044	50284519	-	C/T	0.375	0.67 : 0.33		0.569 : 0.431	0.76 : 0.24	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1421592	50284770	-	A/G	0.401	0.341 : 0.659		0.431 : 0.569	0.14 : 0.86	intron
rs1421591	50284790	-	A/C	0.398	0.364 : 0.636		0.431 : 0.569	0.08 : 0.92	intron
rs12053096	50284911	+	C/T	0.446	0.239 : 0.761		0.472 : 0.528	0.28 : 0.72	intron
rs1363043	50285638	-	AC/C/GT/T	0.402	0.622 : 0.378	0.659 : 0.341	0.65 : 0.35	0.933 : 0.067	intron
rs57916003	50285638	+	A/G	0.375	0.318 : 0.682		0.431 : 0.569	0.08 : 0.92	intron
rs1363042	50285639	-	A/G	0.375	0.148 : 0.852		0.181 : 0.819	0.2 : 0.8	intron
rs1363040	50289617	-	A/G	0.454	0.378 : 0.622	0.341 : 0.659	0.35 : 0.65	0.342 : 0.658	intron
rs1421589	50290153	-	C/T	0.364	0.628 : 0.372	0.667 : 0.333	0.102 : 0.298	0.991 : 0.009	intron
rs1421588	50290328	-	G/T	0.368	0.341 : 0.659		0.361 : 0.639	0.04 : 0.96	intron
rs1363039	50290491	-	C/T	0.361	0.307 : 0.693		0.375 : 0.625	N.D.	intron
rs12621366	50290804	+	C/T	0.381	0.557 : 0.443		0.972 : 0.028	N.D.	intron
rs10166472	50290908	+	C/T	0.449	0.659 : 0.341		0.569 : 0.431	0.6 : 0.4	intron
rs10187516	50293860	+	A/T	0.482	0.378 : 0.622	0.341 : 0.659	0.35 : 0.65	0.558 : 0.442	intron
rs75690373	50295540	+	C/T	0.487	0.42 : 0.58		N.D.	N.D.	intron
rs1563021	50296401	-	A/G	0.456	0.622 : 0.378	0.667 : 0.333	0.65 : 0.35	0.65 : 0.35	intron
rs1563022	50298113	+	C/T	0.483	0.614 : 0.386	0.667 : 0.333	0.65 : 0.35	0.446 : 0.554	intron
rs1563023	50298261	+	C/T	0.437	0.366 : 0.634	0.329 : 0.671	0.355 : 0.645	0.296 : 0.731	intron
rs6748208	50298963	+	C/T	0.441	0.389 : 0.611	0.344 : 0.656	0.35 : 0.65	0.259 : 0.741	intron
rs10469915	50302097	+	A/G	0.474	0.611 : 0.389	0.656 : 0.344	0.65 : 0.35	0.534 : 0.466	intron
rs10469916	50302483	+	G/T	0.375	0.364 : 0.636		0.431 : 0.569	0.46 : 0.54	intron
rs4971552	50302978	+	A/G	0.500	0.6 : 0.4	0.578 : 0.422	0.508 : 0.492	0.375 : 0.625	intron
rs4971646	50303022	+	C/T	0.415	0.667 : 0.333	0.6 : 0.4	0.767 : 0.233	0.758 : 0.242	intron
rs12476530	50303700	+	A/G	0.481	0.656 : 0.344	0.611 : 0.389	0.767 : 0.233	0.383 : 0.617	intron
rs10490244	50303940	-	A/G	0.472	0.563 : 0.464	0.467 : 0.533	0.931 : 0.069	0.74 : 0.26	intron
rs6711623	50304010	+	C/G	0.468	0.625 : 0.375	0.656 : 0.344	0.592 : 0.408	0.967 : 0.033	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs962332	50305055	+	A/T	0.392	0.911 : 0.089	0.944 : 0.056	0.967 : 0.033	0.475 : 0.525	intron
rs6545149	50305785	+	A/G	0.471	0.644 : 0.356	0.614 : 0.386	0.767 : 0.233	0.456 : 0.544	intron
rs1377237	50306217	+	A/G	0.357	0.727 : 0.273		0.917 : 0.083	0.56 : 0.44	intron
rs6545151	50306229	+	A/T	0.500	0.307 : 0.693		0.083 : 0.917	0.44 : 0.56	intron
rs2218979	50306306	+	A/C	0.480	0.648 : 0.352	0.616 : 0.384	0.767 : 0.233	0.39 : 0.61	intron
rs2218980	50306319	+	A/G	0.345	N.D.	N.D.	0.931 : 0.069	0.56 : 0.44	intron
rs12613363	50306377	+	C/T	0.471	0.648 : 0.352	0.614 : 0.386	0.767 : 0.233	0.458 : 0.542	intron
rs7606811	50306723	+	C/T	0.375	0.375 : 0.625		0.375 : 0.625	0.38 : 0.62	intron
rs17039764	50306935	+	C/T	0.410	0.356 : 0.644	0.386 : 0.614	0.233 : 0.767	0.246 : 0.754	intron
rs2351155	50307245	+	A/G	0.433	0.276 : 0.723	0.256 : 0.744	0.432 : 0.568	0.283 : 0.717	intron
rs4343503	50307329	+	A/G	0.500	0.693 : 0.307		0.917 : 0.089	0.74 : 0.26	intron
rs970896	50308985	+	A/C	0.480	0.356 : 0.644	0.386 : 0.614	0.233 : 0.767	0.6 : 0.4	intron
rs72891449	50310358	+	C/T	0.342	0.693 : 0.307		0.917 : 0.087	0.74 : 0.26	intron
rs72891452	50310628	+	A/G	0.347	0.318 : 0.682		0.083 : 0.917	0.26 : 0.74	intron
rs11892979	50310730	+	C/G	0.396	0.225 : 0.775	0.231 : 0.769	0.386 : 0.614	0.188 : 0.812	intron
rs79612320	50311174	+	C/T	0.375	N.D.	N.D.	0.75 : 0.25	N.D.	intron
rs78770390	50311177	+	C/T	0.375	N.D.	N.D.	0.75 : 0.25	N.D.	intron
rs79239366	50311178	+	A/T	0.469	N.D.	N.D.	0.667 : 0.333	N.D.	intron
rs12986904	50311318	+	A/G	0.399	0.3 : 0.7	0.352 : 0.648	0.233 : 0.767	0.233 : 0.767	intron
rs6740554	50312181	+	A/T	0.500	0.239 : 0.761		0.444 : 0.556	0.28 : 0.72	intron
rs12476825	50312191	+	A/T	0.488	0.295 : 0.705		0.042 : 0.958	0.54 : 0.46	intron
rs12472712	50312562	+	A/G	0.405	0.31 : 0.69	0.35 : 0.65	0.233 : 0.767	0.254 : 0.746	intron
rs12472743	50312605	+	G/T	0.396	0.709 : 0.291	0.655 : 0.345	0.767 : 0.233	0.763 : 0.237	intron
rs2123388	50313284	+	G/T	0.397	0.7 : 0.3	0.648 : 0.352	0.767 : 0.233	0.767 : 0.233	intron
rs1563024	50313811	+	G/T	0.475	0.3 : 0.7	0.356 : 0.644	0.229 : 0.711	0.633 : 0.367	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs4641977	50313837	+	A/G	0.362	0.291 : 0.709	0.345 : 0.655	0.233 : 0.767	0.127 : 0.873	intron
rs1563026	50314038	+	C/G	0.472	0.7 : 0.3	0.644 : 0.356	0.767 : 0.233	0.392 : 0.608	intron
rs1563027	50314099	+	C/T	0.469	0.291 : 0.709	0.356 : 0.644	0.237 : 0.763	0.62 : 0.38	intron
rs12473119	50314455	+	G/T	0.393	0.3 : 0.7	0.356 : 0.644	0.233 : 0.767	0.222 : 0.778	intron
rs11125286	50314967	+	A/G	0.383	0.378 : 0.622	0.344 : 0.656	0.342 : 0.658	0.344 : 0.656	intron
rs12615968	50315048	+	C/T	0.405	0.739 : 0.261	0.756 : 0.244	0.608 : 0.392	0.8 : 0.2	intron
rs10490243	50315302	-	C/T	0.385	0.7 : 0.3	0.656 : 0.344	0.778 : 0.222	0.875 : 0.125	intron
rs12470002	50315387	+	C/T	0.428	0.7 : 0.3	0.644 : 0.356	0.767 : 0.233	0.667 : 0.333	intron
rs10490242	50315495	-	A/G	0.386	0.267 : 0.733	0.244 : 0.756	0.392 : 0.608	0.2 : 0.8	intron
rs1452778	50316386	+	A/G	0.371	0.3 : 0.7	0.352 : 0.648	0.233 : 0.767	0.125 : 0.875	intron
rs1452779	50316597	+	A/T	0.396	0.269 : 0.731	0.338 : 0.662	0.233 : 0.767	0.28 : 0.72	intron
rs2045003	50317285	+	A/G	0.441	0.311 : 0.689	0.356 : 0.644	0.229 : 0.771	0.425 : 0.575	intron
rs7609169	50319796	+	A/G	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.76 : 0.24	intron
rs71407582	50320596	+	A/T	0.500	0.864 : 0.136		0.5 : 0.5	N.D.	intron
rs12713085	50320611	+	A/G	0.386	0.261 : 0.739		N.D.	N.D.	intron
rs9677302	50321293	+	G/T	0.472	0.523 : 0.477	0.523 : 0.471	0.575 : 0.425	0.796 : 0.204	intron
rs1452781	50321355	+	A/T	0.356	0.291 : 0.709	0.338 : 0.662	0.218 : 0.782	0.115 : 0.885	intron
rs1452783	50321649	+	C/T	0.369	0.7 : 0.3	0.64 : 0.36	0.767 : 0.233	0.875 : 0.125	intron
rs17039801	50322063	+	A/C	0.371	0.3 : 0.7	0.367 : 0.633	0.229 : 0.771	0.125 : 0.875	intron
rs17039807	50322332	+	G/T	0.376	0.3 : 0.7	0.356 : 0.644	0.233 : 0.767	0.125 : 0.875	intron
rs12477934	50322457	+	C/T	0.357	0.709 : 0.291	0.659 : 0.341	0.771 : 0.229	0.828 : 0.112	intron
rs58188895	50322702	+	A/G	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.76 : 0.24	intron
rs1961358	50322880	+	A/G	0.364	0.3 : 0.7	0.341 : 0.659	0.237 : 0.767	0.125 : 0.875	intron
rs7558542	50323583	+	G/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs2045004	50324872	+	C/T	0.320	0.489 : 0.511		0.681 : 0.319	N.D.	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs79214764	50326512	+	A/T	0.403	N.D.	N.D.	N.D.	0.72 : 0.28	intron
rs2218978	50327134	+	A/G	0.320	0.5 : 0.5		0.681 : 0.319	0.64 : 0.36	intron
rs974827	50327489	+	A/G	0.415	0.267 : 0.733	0.239 : 0.761	0.392 : 0.608	0.2 : 0.8	intron
rs1523355	50328062	-	A/C	0.469	0.522 : 0.478	0.478 : 0.522	0.575 : 0.425	0.85 : 0.15	intron
rs13430861	50328375	+	A/C	0.412	0.278 : 0.722	0.267 : 0.733	0.39 : 0.61	0.2 : 0.8	intron
rs1377233	50328634	+	A/C	0.357	0.733 : 0.267	0.656 : 0.344	0.771 : 0.229	0.875 : 0.125	intron
rs11125287	50328799	+	A/G	0.375	0.795 : 0.205		0.778 : 0.222	0.56 : 0.44	intron
rs72878105	50329566	+	A/G	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs1452762	50330068	+	A/G	0.459	0.478 : 0.522	0.5 : 0.5	0.381 : 0.619	0.15 : 0.85	intron
rs17039291	50330318	+	A/T	0.411	0.267 : 0.733	0.244 : 0.756	0.392 : 0.608	0.2 : 0.8	intron
rs10169371	50330486	+	A/G	0.486	0.455 : 0.545		0.681 : 0.319	0.9 : 0.1	intron
rs10169425	50330682	+	C/T	0.444	0.5 : 0.5		0.319 : 0.681	0.1 : 0.9	intron
rs10181939	50330724	+	G/T	0.486	0.557 : 0.443		0.681 : 0.319	N.D.	intron
rs7604009	50330759	+	C/T	0.375	0.5 : 0.5		0.319 : 0.681	0.1 : 0.9	intron
rs72878113	50331279	+	C/T	0.351	0.227 : 0.773		N.D.	N.D.	intron
rs72878115	50331354	+	C/T	0.245	0.182 : 0.818		0.125 : 0.875	0.1 : 0.9	intron
rs10490241	50332310	-	A/G	0.383	0.278 : 0.722	0.304 : 0.656	0.233 : 0.767	0.125 : 0.875	intron
rs9309176	50332400	+	C/T	0.470	0.522 : 0.478	0.5 : 0.5	0.617 : 0.383	0.858 : 0.142	intron
rs1452764	50333215	+	C/T	0.460	0.478 : 0.522	0.5 : 0.5	0.383 : 0.617	0.15 : 0.85	intron
rs921572	50334088	+	A/C	0.364	0.733 : 0.267	0.678 : 0.322	0.733 : 0.267	0.875 : 0.125	intron
rs921573	50334183	+	A/C	0.364	0.267 : 0.733	0.322 : 0.678	0.267 : 0.733	0.125 : 0.875	intron
rs75537819	50335184	+	C/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs6755305	50335901	+	C/G	0.481	0.261 : 0.739		0.486 : 0.514	0.3 : 0.7	intron
rs930752	50336493	+	A/C	0.369	0.267 : 0.733	0.307 : 0.693	0.233 : 0.767	0.125 : 0.875	intron
rs72878118	50337155	+	C/T	0.471	N.D.	N.D.	N.D.	0.38 : 0.62	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs72878120	50337176	+	C/T	0.362	0.693 : 0.307		0.847 : 0.153	N.D.	intron
rs72878124	50338052	+	A/C	0.308	0.739 : 0.261		0.861 : 0.139	0.86 : 0.14	intron
rs4971648	50339516	+	A/G	0.372	0.3 : 0.7	0.352 : 0.648	0.25 : 0.75	0.125 : 0.875	intron
rs12469244	50339755	+	C/T	0.382	0.716 : 0.284		0.917 : 0.083	0.96 : 0.04	intron
rs17039848	50340073	+	A/C	0.371	0.284 : 0.716		0.182 : 0.818	0.14 : 0.86	intron
rs72878125	50340481	+	A/C	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs4971556	50341055	+	A/T	0.389	0.693 : 0.307		0.847 : 0.153	0.98 : 0.02	intron
rs75867968	50342757	+	A/C	0.313	N.D.	N.D.	0.194 : 0.806	N.D.	intron
rs7590544	50342983	+	C/T	0.456	0.295 : 0.705	0.352 : 0.648	0.139 : 0.861	0.408 : 0.592	intron
rs17039863	50343748	+	A/G	0.386	0.705 : 0.295		0.861 : 0.139	0.86 : 0.14	intron
rs13028133	50344014	+	C/T	0.401	0.267 : 0.733	0.189 : 0.811	0.424 : 0.576	0.192 : 0.808	intron
rs6741087	50344723	+	A/G	0.423	0.433 : 0.567	0.456 : 0.544	0.3 : 0.7	0.108 : 0.892	intron
rs11901625	50344982	+	A/G	0.441	0.727 : 0.273		0.861 : 0.139	0.62 : 0.38	intron
rs6716404	50345280	+	C/G	0.445	0.3 : 0.7	0.356 : 0.644	0.238 : 0.717	0.4 ; 0.6	intron
rs78614485	50345591	+	C/T	0.449	0.659 : 0.341		N.D.	N.D.	intron
rs896683	50345959	+	A/G	0.373	0.7 : 0.3	0.656 : 0.344	0.75 : 0.25	0.867 : 0.133	intron
rs78835633	50346288	+	C/T	0.054	N.D.	N.D.	0.28 : 0.972	N.D.	intron
rs896684	50346875	+	C/T	0.376	0.7 : 0.3	0.659 : 0.341	0.75 : 0.25	0.875 : 0.125	intron
rs1880075	50346988	-	A/G	0.401	0.352 : 0.648		0.229 : 0.771	0.14 : 0.86	intron
rs896685	50347044	+	A/G	0.419	0.761 : 0.239		0.861 : 0.139	0.86 : 0.14	intron
rs17039900	50351490	+	A/G	0.362	0.739 : 0.261		0.895 : 0.105	N.D.	intron
rs12479057	50353338	+	A/G	0.405	0.295 : 0.705		0.139 : 0.861	0.14 : 0.86	intron
rs1037428	50353801	+	C/T	0.308	0.693 : 0.307		0.917 : 0.083	0.86 : 0.14	intron
rs13034607	50353839	+	C/T	0.456	0.284 : 0.716		0.528 : 0.472	0.32 : 0.68	intron
rs985131	50354203	+	G/T	0.438	0.205 : 0.795		0.486 : 0.514	0.26 : 0.74	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs985132	50354280	+	C/T	0.408	0.733 : 0.267	0.807 : 0.193	0.583 : 0.417	0.808 : 0.192	intron
rs17039905	50354742	+	A/G	0.371	0.659 : 0.341		0.87 : 0.13	N.D.	intron
rs72878157	50354848	+	A/G	0.305	0.318 : 0.682		0.028 : 0.972	N.D.	intron
rs72878159	50355025	+	A/G	0.302	0.75 : 0.25		0.861 : 0.139	0.86 : 0.14	intron
rs12151722	50355125	+	C/T	0.357	0.625 : 0.375		0.917 : 0.083	N.D.	intron
rs12151727	50355388	+	C/G	0.347	0.341 : 0.659		0.139 : 0.861	0.14 : 0.86	intron
rs72878160	50355627	+	C/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs11125288	50355711	+	A/G	0.405	0.716 : 0.284		0.861 : 0.139	N.D.	intron
rs73932944	50357180	+	C/T	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.24 : 0.76	intron
rs73932946	50357230	+	C/T	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.24 : 0.76	intron
rs12622844	50357298	+	C/G	0.363	0.3 : 0.7	0.444 : 0.556	0.158 : 0.842	0.117 : 0.883	intron
rs12622858	50357507	+	C/T	0.388	0.7 : 0.3	0.556 : 0.444	0.75 : 0.25	0.867 : 0.133	intron
rs7606758	50357734	+	C/T	0.439	0.267 : 0.733	0.189 : 0.811	0.4 : 0.6	0.383 : 0.617	intron
rs73932947	50357766	+	C/T	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.76 : 0.24	intron
rs12478732	50358318	+	A/G	0.392	0.3 : 0.7	0.444 : 0.556	0.25 : 0.75	0.133 : 0.867	intron
rs13008902	50358675	+	G/T	0.452	0.261 : 0.739	0.189 : 0.811	0.397 : 0.603	0.438 : 0.562	intron
rs17039935	50358867	+	A/G	0.385	0.682 : 0.318		0.861 : 0.139	0.92 : 0.08	intron
rs17039940	50359270	+	C/T	0.358	0.7 : 0.3	0.557 : 0.443	0.842 : 0.158	0.892 : 0.108	intron
rs4971649	50360379	+	C/G	0.381	0.28 : 0.72	0.43 : 0.57	0.145 : 0.855	0.08 : 0.92	intron
rs17039947	50360605	+	A/T	0.373	0.291 : 0.709	0.417 : 0.583	0.155 : 0.845	0.208 : 0.792	intron
rs6545153	50361388	+	C/T	0.396	0.733 : 0.267	0.807 : 0.193	0.6 : 0.4	0.808 : 0.192	intron
rs77619919	50361431	+	A/G	0.435	N.D.	N.D.	0.319 : 0.681	N.D.	intron
rs10490240	50361463	-	C/T	0.388	0.28 : 0.72	0.443 : 0.557	0.251 : 0.849	0.17 : 0.83	intron
rs7607863	50361857	+	C/T	0.463	0.7 : 0.3	0.556 : 0.444	0.839 : 0.161	0.4 : 0.6	intron
rs11125289	50361949	+	C/T	0.422	0.352 : 0.648		0.125 : 0.875	0.34 : 0.66	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs11125290	50362429	+	C/T	0.442	0.705 : 0.295	0.556 : 0.444	0.847 : 0.153	0.534 : 0.466	intron
rs11125291	50362447	+	G/T	0.359	0.7 : 0.3	0.556 : 0.444	0.847 : 0.153	0.927 : 0.073	intron
rs11125292	50362480	+	A/C	0.379	0.732 : 0.268	0.558 : 0.442	0.816 : 0.139	0.821 : 0.175	intron
rs12468151	50363100	+	C/T	0.349	0.705 : 0.295		0.972 : 0.028	N.D.	intron
rs12468252	50363229	+	A/G	0.357	0.3 : 0.7	0.443 : 0.557	0.158 : 0.842	0.108 : 0.892	intron
rs72878193	50365208	+	A/G	0.442	0.33 : 0.67		N.D.	N.D.	intron
rs17039976	50365846	+	A/G	0.379	0.311 : 0.689	0.443 : 0.557	0.158 : 0.842	0.192 : 0.808	intron
rs17039979	50366158	+	A/G	0.379	0.311 : 0.689	0.444 : 0.556	0.158 : 0.842	0.192 : 0.808	intron
rs12713088	50366181	+	C/T	0.399	0.578 : 0.422	0.633 : 0.367	0.7 : 0.3	0.933 : 0.067	intron
rs17039985	50367294	+	C/T	0.473	0.7 : 0.3	0.567 : 0.433	0.842 : 0.158	0.633 : 0.367	intron
rs73932949	50367930	+	A/G	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.76 : 0.24	intron
rs11125294	50368204	+	G/T	0.362	0.7 : 0.3	0.568 : 0.432	0.842 : 0.158	0.892 : 0.108	intron
rs72881239	50368420	+	A/G	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs1584763	50369150	+	A/G	0.426	0.3 : 0.7	0.433 : 0.567	0.158 : 0.842	0.364 : 0.636	intron
rs72881242	50369594	+	C/G	0.487	N.D.	N.D.	N.D.	0.420 : 0.580	intron
rs10184716	50370382	+	C/T	0.444	0.411 : 0.589	0.389 : 0.611	0.358 : 0.642	0.25 : 0.75	intron
rs77167185	50371069	+	A/T	0.480	N.D.	N.D.	N.D.	0.4 : 0.6	intron
rs72881247	50371083	+	A/G	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs1563020	50372774	+	C/T	0.361	0.3 : 0.7	0.432 : 0.568	0.175 : 0.825	0.108 : 0.892	intron
rs10490239	50373620	-	C/T	0.382	0.262 : 0.738	0.206 : 0.794	0.371 : 0.629	0.221 : 0.779	intron
rs972847	50374275	+	A/G	0.392	0.4 : 0.6	0.367 : 0.633	0.283 : 0.717	0.067 : 0.933	intron
rs973364	50375695	+	A/G	0.414	0.711 : 0.289	0.8 : 0.2	0.575 : 0.425	0.808 : 0.192	intron
rs2678228	50376687	-	A/C	0.481	0.578 : 0.422	0.633 : 0.367	0.567 : 0.433	0.62 : 0.38	intron
rs1517827	50377588	-	G/T	0.352	0.678 : 0.322	0.557 : 0.443	0.908 : 0.092	0.9 : 0.1	intron
rs73932956	50378829	+	C/G	0.471	N.D.	N.D.	N.D.	0.62 : 0.38	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs10209998	50379868	+	G/T	0.442	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.417 : 0.583	0.22 : 0.78	intron
rs4971650	50381383	+	A/G	0.406	0.3 : 0.7	0.433 : 0.567	0.158 : 0.842	0.08 : 0.92	intron
rs17040013	50381859	+	C/T	0.394	0.7 : 0.3	0.567 : 0.433	0.842 : 0.158	N.D.	intron
rs10207450	50382594	+	A/G	0.301	0.233 : 0.676	0.216 : 0.784	0.125 : 0.875	0.1 : 0.9	intron
rs2688891	50383127	-	A/T	0.404	0.722 : 0.278	0.795 : 0.205	0.6 : 0.4	0.808 : 0.192	intron
rs75178614	50383160	+	A/T	0.496	0.455 : 0.545		N.D.	N.D.	intron
rs73932957	50383813	+	C/G	0.385	N.D.	N.D.	N.D.	0.26 : 0.74	intron
rs12468477	50384213	+	G/T	0.354	0.7 : 0.3	0.567 : 0.433	0.842 : 0.158	0.914 : 0.086	intron
rs17040034	50386165	+	A/T	0.375	0.356 : 0.644	0.489 : 0.511	0.158 : 0.842	0.088 : 0.912	intron
rs7583858	50386231	+	C/T	0.449	N.D.	N.D.	N.D.	0.34 : 0.66	intron
rs12475100	50386543	+	C/T	0.385	0.367 : 0.633	0.489 : 0.511	0.175 : 0.825	0.088 : 0.912	intron
rs970784	50386627	+	C/T	0.495	0.5 : 0.5	0.422 : 0.578	0.653 : 0.347	0.6 : 0.4	intron
rs79055968	50386993	+	A/G	0.305	0.705 : 0.295		0.944 : 0.056	N.D.	intron
rs6751528	50387243	+	A/T	0.500	0.489 : 0.511	0.556 : 0.444	0.342 : 0.658	0.65 : 0.35	intron
rs6723207	50387276	+	C/T	0.500	0.489 : 0.511	0.556 : 0.444	0.342 : 0.658	0.653 : 0.347	intron
rs973354	50387896	+	C/T	0.500	0.489 : 0.511	0.557 : 0.443	0.342 : 0.658	0.65 : 0.35	intron
rs13410042	50388064	+	A/C	0.335	0.244 : 0.756	0.233 : 0.767	0.25 : 0.75	0.133 : 0.867	intron
rs2688890	50388475	-	C/T	0.408	0.722 : 0.278	0.778 : 0.222	0.592 : 0.408	0.8 : 0.2	intron
rs2688889	50388830	-	A/G	0.500	0.429 : 0.511	0.556 : 0.444	0.342 : 0.658	0.653 : 0.347	intron
rs6731397	50389105	+	C/G	0.477	0.356 : 0.644	0.467 : 0.533	0.175 : 0.825	0.635 : 0.365	intron
rs17040064	50389153	+	A/G	0.379	0.644 : 0.356	0.533 : 0.467	0.825 : 0.175	0.912 : 0.088	intron
rs7599263	50390615	+	C/T	0.468	0.6 : 0.4	0.625 : 0.375	0.425 : 0.575	0.867 : 0.133	intron
rs2678224	50391920	-	A/T	0.391	0.722 : 0.278	0.778 : 0.222	0.569 : 0.431	0.792 : 0.208	intron
rs4971652	50392158	+	A/G	0.378	0.622 : 0.378	0.522 : 0.478	0.839 : 0.161	0.917 : 0.083	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs11125295	50392970	+	C/G	0.378	0.622 : 0.378	0.522 : 0.478	0.842 : 0.158	0.917 : 0.083	intron
rs73932965	50393141	+	G/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs2678223	50393271	-	A/G	0.347	0.756 : 0.244	0.779 : 0.221	0.583 : 0.417	0.825 : 0.175	intron
rs11125296	50394831	+	C/G	0.379	0.378 : 0.622	0.489 : 0.511	0.149 : 0.851	0.083 : 0.917	intron
rs4971653	50395217	+	A/G	0.376	0.378 : 0.622	0.477 : 0.523	0.150 : 0.850	0.083 : 0.917	intron
rs1452771	50395717	-	A/G	0.377	0.622 : 0.378	0.523 : 0.477	0.842 : 0.158	0.924 : 0.076	intron
rs1452769	50396135	-	A/G	0.462	0.633 : 0.367	0.568 : 0.432	0.842 : 0.158	0.492 : 0.508	intron
rs17040090	50396454	+	A/G	0.369	0.367 : 0.633	0.433 : 0.567	0.153 : 0.847	0.076 : 0.924	intron
rs79065081	50396867	+	A/G	0.361	N.D.	N.D.	0.236 : 0.764	N.D.	intron
rs72887703	50397304	+	C/T	0.487	N.D.	N.D.	N.D.	0.42 : 0.58	intron
rs72887704	50397738	+	A/T	0.295	N.D.	N.D.	N.D.	0.82 : 0.18	intron
rs1377238	50398902	-	C/T	0.417	0.36 : 0.64	0.459 : 0.541	0.142 : 0.858	0.112 : 0.888	intron
rs7572610	50399684	+	A/T	0.368	0.716 : 0.284	0.733 : 0.277	0.569 : 0.431	0.818 : 0.182	intron
rs60244997	50399793	+	A/C	0.497	N.D.	N.D.	N.D.	0.46 : 0.54	intron
rs78327515	50400564	+	G/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs77689222	50400586	+	A/C	0.349	0.398 : 0.602		0.014 : 0.986	N.D.	intron
rs77915829	50400719	+	A/G	0.449	0.341 : 0.659		N.D.	N.D.	intron
rs2678220	50401618	-	G/T	0.345	N.D.	N.D.	0.208 : 0.792	0.24 : 0.76	intron
rs79682120	50402441	+	C/T	0.320	0.659 : 0.341		0.972 : 0.028	N.D.	intron
rs76190974	50402442	+	A/G	0.320	0.659 : 0.341		0.972 : 0.028	N.D.	intron
rs1823768	50402782	+	C/T	0.358	0.08 : 0.92		0.25 : 0.75	0.48 : 0.52	intron
rs61586910	50403090	+	A/C	0.337	0.955 : 0.045		0.764 : 0.236	0.52 : 0.48	intron
rs72887721	50403727	+	A/C	0.499	N.D.	N.D.	N.D.	0.48 : 0.52	intron
rs4971654	50406004	+	A/G	0.493	0.614 : 0.368		N.D.	0.46 : 0.54	intron
rs6732453	50407159	+	A/T	0.391	0.636 : 0.364		0.986 : 0.014	0.54 : 0.46	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs73932976	50408392	+	A/T	0.392	0.648 : 0.352		N.D.	0.88 : 0.12	intron
rs995624	50408668	+	C/T	0.415	0.733 : 0.267	0.761 : 0.239	0.575 : 0.425	0.808 : 0.192	intron
rs6712102	50409279	+	A/C	0.444	0.367 : 0.633	0.443 : 0.557	0.153 : 0.847	0.398 : 0.602	intron
rs6712119	50409327	+	C/G	0.452	0.633 : 0.367	0.544 : 0.456	0.847 : 0.153	0.567 : 0.433	intron
rs6712423	50409417	+	A/G	0.429	0.35 : 0.65	0.436 : 0.564	0.147 : 0.853	0.46 : 0.54	intron
rs11896556	50409450	+	C/T	0.371	0.367 : 0.633	0.444 : 0.556	0.147 : 0.853	0.1 : 0.9	intron
rs17040117	50409803	+	C/T	0.494	0.556 : 0.444	0.489 : 0.511	0.972 : 0.028	0.536 : 0.464	intron
rs1563028	50411568	+	A/C	0.459	0.648 : 0.352	0.5 : 0.5	0.845 : 0.155	0.567 : 0.433	intron
rs17040123	50413159	+	C/T	0.427	0.375 : 0.625	0.512 : 0.488	0.158 : 0.842	0.294 : 0.706	intron
rs4971655	50414229	+	A/G	0.380	0.625 : 0.375	0.533 : 0.467	0.842 : 0.158	0.905 : 0.095	intron
rs4971656	50414297	+	C/T	0.432	0.622 : 0.378	0.523 : 0.477	0.842 : 0.158	0.692 : 0.308	intron
rs1563018	50414613	+	C/T	0.418	0.267 : 0.733	0.211 : 0.789	0.45 : 0.55	0.19 : 0.81	intron
rs1452786	50416835	+	A/G	0.389	0.186 : 0.814	0.186 : 0.814	0.208 : 0.792	0.039 : 0.961	intron
rs76369082	50418971	+	A/T	0.474	0.682 : 0.318		0.972 : 0.028	N.D.	intron
rs4971658	50420238	+	A/G	0.435	0.622 : 0.378	0.511 : 0.489	0.842 : 0.158	0.683 : 0.317	intron
rs17040138	50421939	+	C/G	0.418	0.628 : 0.372	0.522 : 0.478	0.824 : 0.158	0.746 : 0.254	intron
rs539260	50423607	-	A/G	0.414	0.356 : 0.644	0.307 : 0.693	0.3 : 0.7	0.25 : 0.75	intron
rs17040141	50424350	+	C/T	0.456	0.372 : 0.628	0.478 : 0.522	0.158 : 0.842	0.442 : 0.558	intron
rs17040147	50424477	+	C/T	0.454	0.372 : 0.628	0.467 : 0.533	0.158 : 0.842	0.441 : 0.559	intron
rs17040160	50425110	+	C/T	0.465	0.378 : 0.622	0.467 : 0.533	0.161 : 0.839	0.5 : 0.5	intron
rs12466807	50425184	+	A/C	0.454	0.636 : 0.364	0.533 : 0.467	0.842 : 0.158	0.559 : 0.441	intron
rs17040169	50425302	+	G/T	0.454	0.372 : 0.628	0.467 : 0.533	0.158 : 0.842	0.441 : 0.559	intron
rs4971659	50425636	+	C/T	0.441	0.622 : 0.378	0.523 : 0.477	0.842 : 0.158	0.558 : 0.442	intron
rs4971660	50425835	+	A/G	0.371	0.307 : 0.693		N.D.	0.14 : 0.86	intron
rs4971661	50425842	+	A/G	0.339	0.216 : 0.784		N.D.	N.D.	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs73930305	50426707	+	C/T	0.391	0.398 : 0.602		0.028 : 0.972	0.38 : 0.62	intron
rs9309178	50427701	+	A/G	0.428	0.267 : 0.733	0.197 : 0.807	0.475 : 0.525	0.192 : 0.808	intron
rs12478603	50428926	+	C/G	0.449	0.381 : 0.619	0.489 : 0.511	0.211 : 0.789	0.314 : 0.686	intron
rs10490233	50429128	-	A/T	0.325	0.678 : 0.322	0.511 : 0.489	0.908 : 0.092	1.00 : 0	intron
rs6545155	50429861	+	C/T	0.455	0.378 : 0.622	0.467 : 0.533	0.217 : 0.783	0.375 : 0.625	intron
rs7599349	50429916	+	A/C	0.422	0.378 : 0.622	0.467 : 0.533	0.158 : 0.842	0.275 : 0.725	intron
rs1563019	50430305	+	C/T	0.439	0.622 : 0.378	0.523 : 0.477	0.842 : 0.158	0.642 : 0.358	intron
rs689174	50431223	-	A/G	0.426	0.733 : 0.267	0.784 : 0.216	0.525 : 0.475	0.8 : 0.2	intron
rs73930308	50431498	+	G/T	0.348	0.784 : 0.216		N.D.	0.76 : 0.24	intron
rs73930309	50431502	+	G/T	0.405	0.727 : 0.273		N.D.	0.7 : 0.3	intron
rs1712886	50432392	-	G/T	0.475	0.267 : 0.733	0.211 : 0.789	0.533 : 0.467	0.408 : 0.592	intron
rs564365	50432556	-	A/G	0.427	0.644 : 0.356	0.678 : 0.322	0.692 : 0.308	0.717 : 0.283	intron
rs598426	50432727	+	A/G	0.436	0.267 : 0.733	0.211 : 0.789	0.475 : 0.525	0.258 : 0.742	intron
rs598474	50432756	+	G/T	0.415	0.756 : 0.244	0.789 : 0.211	0.526 : 0.474	0.816 : 0.184	intron
rs11888330	50432765	+	C/T	0.427	0.641 : 0.359	0.533 : 0.467	0.847 : 0.153	0.681 : 0.319	intron
rs610969	50433297	-	A/G	0.429	0.261 : 0.739	0.205 : 0.795	0.475 : 0.525	0.241 : 0.759	intron
rs613166	50433751	-	A/G	0.432	0.267 : 0.733	0.211 : 0.789	0.475 : 0.525	0.242 : 0.758	intron
rs527673	50434266	+	A/T	0.424	0.733 : 0.267	0.789 : 0.211	0.525 : 0.475	0.8 : 0.2	intron
rs17040207	50434381	+	A/G	0.305	0.289 : 0.711	0.444 : 0.556	0.092 : 0.908	0.033 : 0.967	intron
rs17040210	50434741	+	C/T	0.468	0.611 : 0.389	0.533 : 0.467	0.792 : 0.208	0.542 : 0.458	intron
rs17040212	50435324	+	A/G	0.461	0.567 : 0.433	0.456 : 0.544	0.775 : 0.225	0.667 : 0.333	intron
rs57411637	50435731	+	A/G	0.416	0.443 : 0.557		0.097 : 0.903	0.32 : 0.68	intron
rs77427321	50435768	+	C/T	0.399	0.58 : 0.42		0.903 : 0.097	N.D.	intron
rs1915227	50436177	-	A/C	0.455	0.578 : 0.422	0.455 : 0.545	0.775 : 0.225	0.667 : 0.333	intron
rs1915226	50436306	-	A/G	0.467	0.422 : 0.578	0.544 : 0.456	0.258 : 0.742	0.342 : 0.658	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs13026006	50436850	+	C/T	0.431	0.289 : 0.711	0.211 : 0.789	0.483 : 0.517	0.19 : 0.81	intron
rs1915225	50437284	-	A/G	0.471	0.429 : 0.571	0.544 : 0.456	0.216 : 0.784	0.24 : 0.76	intron
rs1356885	50437602	-	A/G	0.433	0.422 : 0.578	0.544 : 0.456	0.208 : 0.792	0.242 : 0.758	intron
rs1402166	50437804	-	A/G	0.465	0.422 : 0.578	0.544 : 0.456	0.258 : 0.742	0.342 : 0.658	intron
rs1402165	50438026	-	C/G	0.438	0.544 : 0.456	0.422 : 0.578	0.75 : 0.25	0.892 : 0.108	intron
rs1915224	50438466	-	A/T	0.438	0.289 : 0.711	0.2 : 0.8	0.483 : 0.517	0.258 : 0.742	intron
rs1915223	50438540	-	C/G	0.411	0.568 : 0.432	0.449 : 0.551	0.759 : 0.241	0.929 : 0.071	intron
rs1915222	50438701	-	A/G	0.447	0.511 : 0.489	0.422 : 0.578	0.7 : 0.3	0.892 : 0.108	intron
rs7560239	50439009	+	A/C	0.436	0.278 : 0.722	0.2 : 0.8	0.483 : 0.517	0.258 : 0.742	intron
rs1915221	50439075	-	A/G	0.436	0.544 : 0.456	0.422 : 0.578	0.775 : 0.225	0.892 : 0.108	intron
rs1715983	50440176	-	A/G	0.428	0.711 : 0.289	0.789 : 0.211	0.517 : 0.489	0.8 : 0.2	intron
rs17040235	50441527	+	C/T	0.381	0.318 : 0.682	0.476 : 0.524	0.083 : 0.917	N.D.	intron
rs593468	50441688	-	A/G	0.424	0.284 : 0.716	0.209 : 0.791	0.474 : 0.526	0.211 : 0.789	intron
rs6545157	50442823	+	A/T	0.478	0.256 : 0.744	0.222 : 0.778	0.325 : 0.675	0.737 : 0.263	intron
rs1915220	50443600	-	C/T	0.311	0.344 : 0.656	0.456 : 0.544	0.067 : 0.933	0.017 : 0.983	intron
rs1915219	50443658	-	A/G	0.330	0.659 : 0.341	0.544 : 0.456	0.933 : 0.067	0.94 : 0.06	intron
rs11897191	50443908	+	A/G	0.348	0.322 : 0.678	0.444 : 0.556	0.058 : 0.942	0.117 : 0.883	intron
rs78513132	50444390	+	G/T	0.456	0.648 : 0.352		N.D.	N.D.	intron
rs74642083	50445628	+	C/T	0.316	N.D.	N.D.	0.708 : 0.292	0.94 : 0.06	intron
rs77986143	50446498	+	A/G	0.362	0.681 : 0.319		N.D.	0.88 : 0.12	intron
rs585144	50447871	-	A/T	0.438	0.689 : 0.311	0.773 : 0.227	0.558 : 0.442	0.72 : 0.28	intron
rs510853	50448106	+	A/C	0.375	0.42 : 0.58		0.556 : 0.444	N.D.	intron
rs587928	50448539	+	C/T	0.457	0.733 : 0.267	0.811 : 0.189	0.558 : 0.442	0.55 : 0.45	intron
rs588263	50448577	-	A/G	0.458	0.267 : 0.733	0.189 : 0.811	0.442 : 0.558	0.45 : 0.55	intron
rs601010	50449138	+	C/T	0.500	0.567 : 0.433	0.678 : 0.322	0.443 : 0.567	0.45 : 0.55	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCB	JPT	CEU	YRI	
rs523003	50450879	+	C/T	0.431	0.716 : 0.284	0.814 : 0.186	0.558 : 0.442	0.717 : 0.283	intron
rs1546655	50451121	+	A/G	0.499	0.422 : 0.578	0.322 : 0.678	0.567 : 0.433	0.683 : 0.317	intron
rs1546656	50451132	+	A/G	0.444	0.761 : 0.284		0.639 : 0.361	0.66 : 0.34	intron
rs663558	50452306	+	G/T	0.444	0.466 : 0.534		0.556 : 0.444	N.D.	intron
rs72891924	50453274	+	A/T	0.320	0.386 : 0.614		0.097 : 0.903	0.02 : 0.98	intron
rs594114	50453656	-	C/G	0.375	0.284 : 0.716		0.347 : 0.653	0.38 : 0.62	intron
rs1715972	50456190	-	A/G	0.448	0.722 : 0.278	0.811 : 0.189	0.558 : 0.442	0.62 : 0.38	intron
rs79929031	50456469	+	G/T	0.471	N.D.	N.D.	N.D.	0.62 : 0.38	intron
rs11681846	50457845	+	A/G	0.328	0.856 : 0.144	0.867 : 0.133	0.875 : 0.125	0.617 : 0.383	intron
rs11681950	50458008	+	A/G	0.327	0.856 : 0.144	0.867 : 0.133	0.875 : 0.125	0.619 : 0.381	intron
rs9309179	50458179	+	A/G	0.417	0.278 : 0.722	0.189 : 0.811	0.449 : 0.551	0.342 : 0.658	intron
rs72837433	50458375	+	A/C	0.325	0.205 : 0.795		N.D.	N.D.	intron
rs13429626	50458391	+	C/T	0.445	0.722 : 0.278	0.811 : 0.189	0.511 : 0.449	0.617 : 0.383	intron
rs10490232	50459077	-	C/G	0.493	0.14 : 0.86	0.128 : 0.872	0.146 : 0.845	0.188 : 0.812	intron
rs2681998	50459860	-	C/T	0.427	0.722 : 0.278	0.807 : 0.183	0.558 : 0.442	0.717 : 0.283	intron
rs1715971	50459963	-	C/T	0.440	0.317 : 0.683	0.198 : 0.802	0.44 : 0.56	0.33 : 0.67	intron
rs1400882	50460096	-	A/C	0.481	0.667 : 0.333	0.778 : 0.222	0.558 : 0.442	0.725 : 0.275	intron
rs1915217	50460655	-	A/C	0.460	0.284 : 0.716	0.189 : 0.811	0.492 : 0.508	0.4 : 0.6	intron
rs10171107	50461186	+	C/T	0.401	0.727 : 0.273		0.694 : 0.306	0.68 : 0.32	intron
rs13001290	50461684	+	A/C	0.440	0.278 : 0.722	0.189 : 0.811	0.442 : 0.558	0.364 : 0.636	intron
rs7556989	50462191	+	A/G	0.438	0.278 : 0.722	0.189 : 0.811	0.422 : 0.558	0.32 : 0.68	intron
rs80094872	50464065	+	C/T	0.113	N.D.	N.D.	N.D.	0.94 : 0.06	coding-synon
rs1715970	50464483	-	A/G	0.498	0.422 : 0.578	0.33 : 0.67	0.568 : 0.432	0.708 : 0.292	intron
rs1712904	50465522	+	C/T	0.430	0.722 : 0.278	0.807 : 0.193	0.56 : 0.44	0.703 : 0.297	intron
rs74497002	50465846	+	G/T	0.312	0.807 : 0.193		N.D.	N.D.	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1712905	50465966	+	C/T	0.457	0.722 : 0.278	0.818 : 0.182	0.56 : 0.44	0.551 : 0.449	intron
rs2222315	50467230	-	A/T	0.500	0.523 : 0.477		0.444 : 0.556	N.D.	intron
rs2681997	50467246	-	A/G	0.500	0.628 : 0.318		0.639 : 0.361	0.7 : 0.3	intron
rs2681996	50467391	-	A/T	0.500	0.628 : 0.318		0.639 : 0.361	0.7 : 0.3	intron
rs1712911	50468157	-	A/G	0.480	0.5 : 0.5		0.514 : 0.486	0.72 : 0.28	intron
rs694309	50468912	+	C/T	0.440	0.678 : 0.322	0.784 : 0.216	0.558 : 0.442	0.7 : 0.3	intron
rs548271	50470001	+	A/C	0.459	0.663 : 0.3367	0.789 : 0.211	0.553 : 0.447	0.72 : 0.28	intron
rs10183892	50470487	+	A/G	0.432	0.278 : 0.722	0.178 : 0.822	0.441 : 0.559	0.3 : 0.7	intron
rs62133087	50472169	+	C/T	0.500	0.125 : 0.875		0.153 : 0.847	0.12 : 0.88	intron
rs10469874	50472796	+	C/T	0.500	0.318 : 0.682		0.361 : 0.639	0.28 : 0.72	intron
rs34307425	50472890	+	A/T	0.500	0.125 : 0.875		0.139 : 0.861	0.24 : 0.76	intron
rs7601443	50472901	+	A/C	0.499	0.533 : 0.467	0.648 : 0.352	0.443 : 0.567	0.358 : 0.642	intron
rs7578756	50473624	+	C/G	0.499	0.422 : 0.578	0.311 : 0.689	0.568 : 0.432	0.717 : 0.283	intron
rs7578867	50473697	+	A/G	0.486	0.409 : 0.591		0.514 : 0.486	0.72 : 0.28	intron
rs575480	50473979	-	A/C	0.500	0.25 : 0.75		0.361 : 0.639	0.3 : 0.7	intron
rs548842	50474557	-	A/G	0.500	0.591 : 0.409		0.444 : 0.556	N.D.	intron
rs544303	50475043	-	C/G	0.495	0.535 : 0.465	0.565 : 0.344	0.433 : 0.567	0.242 : 0.758	intron
rs638259	50475419	-	A/G	0.500	0.682 : 0.318		0.639 : 0.361	0.7 : 0.3	intron
rs638275	50475428	-	C/T	0.500	0.682 : 0.318		0.639 : 0.361	0.7 : 0.3	intron
rs1712914	50476423	-	A/C	0.499	0.467 : 0.533	0.352 : 0.648	0.567 : 0.433	0.492 : 0.508	intron
rs80066188	50476537	+	A/G	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.78 : 0.22	intron
rs633128	50477156	-	A/C	0.426	0.682 : 0.318		0.639 : 0.361	0.7 : 0.3	intron
rs2882687	50480657	+	G/T	0.480	0.42 : 0.58		0.617 : 0.383	0.892 : 0.108	intron
rs79066085	50481173	-	C/T	0.444	N.D.	N.D.	0.667 : 0.333	N.D.	intron
rs78777740	50481565	-	A/G	0.444	N.D.	N.D.	0.333 : 0.667	N.D.	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs2678216	50482571	-	G/T	0.464	0.322 : 0.678	0.209 : 0.791	0.442 : 0.558	0.442 : 0.558	intron
rs2682005	50483637	-	C/T	0.471	0.478 : 0.522	0.356 : 0.644	0.617 : 0.383	0.925 : 0.075	intron
rs1915239	50484360	-	A/G	0.498	0.442 : 0.578	0.322 : 0.678	0.558 : 0.442	0.758 : 0.242	intron
rs1712879	50484908	-	C/T	0.416	0.778 : 0.222	0.833 : 0.167	0.567 : 0.433	0.7 : 0.3	intron
rs624753	50487105	-	A/G	0.477	0.267 : 0.733	0.2 : 0.8	0.433 : 0.567	0.592 : 0.408	intron
rs525115	50487213	+	A/C	0.427	0.267 : 0.733	0.2 : 0.8	0.433 : 0.567	0.3 : 0.7	intron
rs10153791	50488073	+	A/G	0.432	0.267 : 0.733	0.2 : 0.8	0.433 : 0.567	0.3 : 0.7	intron
rs78029909	50488290	+	C/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs1716005	50489162	-	A/G	0.496	0.411 : 0.589	0.318 : 0.682	0.558 : 0.442	0.783 : 0.217	intron
rs1712897	50489215	-	A/T	0.419	0.778 : 0.222	0.833 : 0.167	0.558 : 0.442	0.7 : 0.3	intron
rs13415902	50489929	+	C/T	0.325	0.822 : 0.178	0.856 : 0.144	0.875 : 0.125	0.655 : 0.345	intron
rs11897898	50489963	+	A/G	0.361	0.17 : 0.83	0.144 : 0.856	0.125 : 0.875	0.482 : 0.518	intron
rs1712896	50490608	-	C/T	0.416	0.778 : 0.222	0.833 : 0.167	0.567 : 0.433	0.7 : 0.3	intron
rs564491	50491825	-	A/G	0.469	0.489 : 0.511		0.444 : 0.556	N.D.	intron
rs648078	50491942	-	A/G	0.444	0.284 : 0.716		0.347 : 0.653	0.32 : 0.68	intron
rs648046	50491963	-	A/G	0.434	0.261 : 0.739	0.205 : 0.795	0.439 : 0.561	0.337 : 0.663	intron
rs694010	50492403	-	A/T	0.432	0.256 : 0.744	0.209 : 0.791	0.442 : 0.558	0.3 : 0.7	intron
rs61011011	50493712	+	C/T	0.435	N.D.	N.D.	N.D.	0.32 : 0.68	intron
rs13030223	50493806	+	A/G	0.415	0.778 : 0.222	0.844 : 0.156	0.559 : 0.441	0.702 : 0.298	intron
rs497562	50494567	-	A/C	0.444	0.761 : 0.284		0.639 : 0.361	0.64 : 0.36	intron
rs7579558	50494761	+	A/G	0.500	0.17 : 0.83		0.139 : 0.861	0.4 : 0.6	intron
rs669401	50494892	-	C/T	0.448	0.739 : 0.261		0.639 : 0.361	0.7 : 0.3	intron
rs11900135	50496489	+	G/T	0.375	N.D.	N.D.	0.75 : 0.25	0.8 : 0.2	intron
rs695073	50497171	-	C/G	0.375	0.443 : 0.557		0.556 : 0.444	N.D.	intron
rs563148	50498605	+	A/G	0.477	0.533 : 0.467	0.648 : 0.352	0.383 : 0.617	0.125 : 0.875	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs60738023	50499147	+	A/C	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.22 : 0.78	intron
rs58515366	50499178	+	C/T	0.500	0.818 : 0.182		0.875 : 0.125	0.76 : 0.24	intron
rs10187950	50499984	+	A/G	0.500	0.818 : 0.182		0.847 : 0.153	0.94 : 0.06	intron
rs9309180	50500361	+	A/G	0.500	0.58 : 0.42		0.486 : 0.514	0.34 : 0.66	intron
rs28375370	50501740	+	A/G	0.500	N.D.	N.D.	0.431 : 0.569	0.32 : 0.68	intron
rs604159	50503037	-	A/G	0.427	0.822 : 0.178	0.818 : 0.182	0.575 : 0.425	0.617 : 0.383	intron
rs13421566	50503807	+	A/T	0.500	0.807 : 0.193		0.903 : 0.097	N.D.	intron
rs75428626	50504525	+	C/T	0.330	N.D.	N.D.	0.208 : 0.792	N.D.	intron
rs80278163	50504652	+	C/T	0.315	0.83 : 0.17		N.D.	0.76 : 0.24	intron
rs68019345	50504962	+	C/T	0.500	0.773 : 0.227		0.667 : 0.333	0.7 : 0.3	intron
rs9710709	50505410	+	A/G	0.375	N.D.	N.D.	0.5 : 0.5	N.D.	intron
rs4032051	50505658	+	A/G	0.447	0.211 : 0.789	0.216 : 0.784	0.408 : 0.592	0.425 : 0.575	intron
rs7422036	50506284	+	A/G	0.455	0.589 : 0.411	0.467 : 0.533	0.867 : 0.133	0.625 : 0.375	intron
rs77461728	50506801	+	A/T	0.342	0.25 : 0.75		0.181 : 0.819	N.D.	intron
rs1520523	50506860	-	A/T	0.308	N.D.	N.D.	0.19 : 0.81	N.D.	intron
rs2139654	50507719	-	C/T	0.375	0.057 : 0.943		0.292 : 0.708	0.1 : 0.9	intron
rs72874413	50509216	+	A/G	0.418	0.364 : 0.636		N.D.	0.18 : 0.82	intron
rs72874415	50509256	+	C/T	0.377	0.545 : 0.455		0.944 : 0.056	0.82 : 0.18	intron
rs1915237	50509631	-	G/T	0.375	0.977 : 0.023		0.708 : 0.292	0.84 : 0.16	intron
rs1915236	50509697	-	A/G	0.500	0.511 : 0.489	0.622 : 0.378	0.442 : 0.558	0.525 : 0.475	intron
rs1915235	50509759	-	G/T	0.444	0.955 : 0.045		0.708 : 0.292	0.96 : 0.04	intron
rs7592364	50510272	+	A/G	0.347	0.636 : 0.364		0.917 : 0.083	0.82 : 0.18	intron
rs1716000	50510868	+	C/T	0.487	0.533 : 0.467	0.622 : 0.378	0.433 : 0.567	0.733 : 0.267	intron
rs1715999	50511020	-	G/T	0.496	0.467 : 0.533	0.356 : 0.644	0.567 : 0.433	0.408 : 0.592	intron
rs57052740	50511143	+	G/T	0.416	0.398 : 0.602		0.083 : 0.917	0.42 : 0.58	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1622701	50511655	+	C/G	0.500	0.467 : 0.533	0.356 : 0.644	0.575 : 0.425	0.583 : 0.417	intron
rs72874422	50511957	+	C/G	0.347	0.648 : 0.352		0.917 : 0.083	0.8 : 0.2	intron
rs60450811	50512361	+	G/T	0.459	0.386 : 0.614		0.125 : 0.875	0.64 : 0.36	intron
rs61689777	50512382	+	A/G	0.369	0.625 : 0.375		0.917 : 0.083	N.D.	intron
rs11895152	50512939	+	C/T	0.482	0.6 : 0.4	0.489 : 0.511	0.75 : 0.25	0.525 : 0.475	intron
rs1517831	50514027	-	A/C	0.403	0.6 : 0.4	0.489 : 0.511	0.867 : 0.133	0.833 : 0.167	intron
rs1517830	50514097	-	C/T	0.362	0.636 : 0.364		0.917 : 0.083	N.D.	intron
rs1517828	50514226	-	A/G	0.368	0.318 : 0.682		0.083 : 0.917	0.34 : 0.66	intron
rs1715998	50514307	-	C/G	0.469	0.943 : 0.057		0.75 : 0.25	0.84 : 0.16	intron
rs1914521	50515479	+	C/T	0.358	0.386 : 0.614		0.083 : 0.917	0.18 : 0.82	intron
rs77183442	50515491	+	A/C	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs2037394	50516052	+	C/T	0.374	0.6 : 0.4	0.489 : 0.511	0.864 : 0.136	0.95 : 0.05	intron
rs2037395	50516180	+	C/G	0.419	0.6 : 0.4	0.467 : 0.533	0.867 : 0.133	0.792 : 0.208	intron
rs1402170	50516226	+	A/G	0.418	0.6 : 0.4	0.467 : 0.533	0.867 : 0.133	0.792 : 0.208	intron
rs1356889	50516587	+	A/C	0.444	0.284 : 0.716		0.181 : 0.819	N.D.	intron
rs35900029	50516620	+	A/G	0.393	0.42 : 0.58		0.083 : 0.917	N.D.	intron
rs6545158	50517149	+	A/G	0.469	0.057 : 0.943		0.236 : 0.764	0.16 : 0.84	intron
rs1915233	50517511	-	C/T	0.444	0.102 : 0.898		0.278 : 0.722	0.14 : 0.86	intron
rs6722290	50517563	+	A/G	0.320	0.307 : 0.693		0.083 : 0.917	0.18 : 0.82	intron
rs1113099	50518334	+	A/G	0.481	0.4 : 0.6	0.511 : 0.489	0.25 : 0.75	0.067 : 0.933	intron
rs76391388	50518383	+	A/C	0.403	N.D.	N.D.	N.D.	0.72 : 0.28	intron
rs2351513	50518470	+	G/T	0.381	0.398 : 0.602		0.083 : 0.917	N.D.	intron
rs60291038	50520197	+	C/T	0.382	0.591 : 0.409		0.875 : 0.125	0.82 : 0.18	intron
rs6749530	50520743	+	C/T	0.427	0.386 : 0.614		0.125 : 0.875	0.44 : 0.56	intron
rs1715997	50522118	-	A/G	0.440	0.367 : 0.633	0.233 : 0.767	0.292 : 0.708	0.45 : 0.55	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs12622479	50522278	+	A/C	0.385	0.389 : 0.611	0.522 : 0.478	0.133 : 0.867	0.15 : 0.85	intron
rs7605803	50522963	+	G/T	0.452	0.389 : 0.611	0.522 : 0.478	0.108 : 0.892	0.408 : 0.592	intron
rs7592085	50523059	+	C/G	0.443	0.411 : 0.589	0.589 : 0.411	0.133 : 0.867	0.367 : 0.633	intron
rs1104980	50524624	-	C/T	0.446	0.411 : 0.589	0.589 : 0.411	0.133 : 0.867	0.325 : 0.675	intron
rs1104979	50524783	-	G/T	0.464	0.589 : 0.411	0.443 : 0.557	0.75 : 0.25	0.683 : 0.317	intron
rs10194978	50525067	+	A/G	0.499	0.5 : 0.5	0.4 : 0.6	0.625 : 0.375	0.475 : 0.525	intron
rs1879338	50525178	-	C/T	0.467	0.587 : 0.411	0.444 : 0.556	0.75 : 0.25	0.683 : 0.317	intron
rs6748646	50526029	+	A/T	0.416	0.411 : 0.589	0.589 : 0.411	0.133 : 0.867	0.233 : 0.767	intron
rs6545160	50526614	+	C/T	0.418	0.411 : 0.589	0.556 : 0.444	0.136 : 0.864	0.556 : 0.444	intron
rs6545161	50526667	+	C/T	0.405	0.411 : 0.589	0.567 : 0.433	0.133 : 0.867	0.188 : 0.812	intron
rs1474078	50526928	-	A/G	0.499	0.5 : 0.5	0.6 : 0.4	0.375 : 0.625	0.695 : 0.305	intron
rs1712880	50527550	-	C/G	0.496	0.5 : 0.5	0.6 : 0.4	0.375 : 0.625	0.783 : 0.217	intron
rs939428	50527729	-	A/T	0.422	0.589 : 0.411	0.444 : 0.556	0.867 : 0.133	0.802 : 0.198	intron
rs939426	50527753	-	A/G	0.494	0.5 : 0.5	0.58 : 0.42	0.371 : 0.629	0.409 : 0.591	intron
rs4142511	50528752	-	C/T	0.451	0.589 : 0.411	0.444 : 0.556	0.75 : 0.25	0.733 : 0.267	intron
rs17040451	50529534	+	A/T	0.403	0.411 : 0.589	0.556 : 0.444	0.133 : 0.867	0.192 : 0.808	intron
rs493879	50529604	-	A/G	0.495	0.5 : 0.5	0.4 : 0.6	0.625 : 0.375	0.217 : 0.783	intron
rs17040458	50529764	+	C/T	0.387	0.411 : 0.589	0.556 : 0.444	0.133 : 0.867	0.142 : 0.858	intron
rs1715993	50529982	-	C/G	0.495	0.5 : 0.5	0.4 : 0.6	0.625 : 0.375	0.217 : 0.783	intron
rs1712891	50530395	+	A/T	0.499	0.5 : 0.5	0.6 : 0.4	0.375 : 0.625	0.475 : 0.525	intron
rs7601648	50530596	+	C/G	0.500	0.5 : 0.5	0.4 : 0.6	0.627 : 0.373	0.433 : 0.567	intron
rs1554424	50530681	+	C/G	0.500	0.5 : 0.5	0.6 : 0.4	0.375 : 0.625	0.475 : 0.525	intron
rs72874461	50530859	+	A/G	0.479	0.398 : 0.602		N.D.	N.D.	intron
rs72874462	50530923	+	A/C	0.381	0.083 : 0.917	N.D.	N.D.	N.D.	intron
rs72874463	50531116	+	C/T	0.342	0.398 : 0.602		0.083 : 0.917	0.1 : 0.9	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs11125298	50531439	+	A/G	0.497	0.5 : 0.5	0.611 : 0.389	0.375 : 0.625	0.65 : 0.35	intron
rs7569759	50532297	+	A/T	0.358	0.389 : 0.611	0.311 : 0.689	0.283 : 0.717	0.0 : 1.0	intron
rs7569775	50532337	+	C/T	0.362	0.389 : 0.611	0.318 : 0.682	0.283 : 0.717	0.0 : 1.0	intron
rs1217438	50535478	-	A/G	0.320	0.648 : 0.352		0.861 : 0.139	N.D.	intron
rs1915168	50536695	-	A/G	0.487	0.556 : 0.444	0.6 : 0.4	0.308 : 0.692	0.858 : 0.142	intron
rs10490231	50537466	-	A/T	0.426	0 : 1	0 : 1	0.142 : 0.856	0.075 : 0.925	intron
rs13416474	50537511	+	A/G	0.496	0.42 : 0.58		0.875 : 0.125	0.24 : 0.76	intron
rs4971664	50537810	+	C/G	0.485	0.452 : 0.548	0.407 : 0.593	0.866 : 0.134	0.681 : 0.319	intron
rs1520522	50538254	+	C/T	0.320	0.943 : 0.057		0.403 : 0.597	N.D.	intron
rs7562269	50539289	+	C/G	0.472	0.523 : 0.477		0.097 : 0.903	0.54 : 0.46	intron
rs10203511	50540027	+	A/G	0.492	0.444 : 0.556	0.344 : 0.656	0.867 : 0.133	0.508 : 0.492	intron
rs79523699	50540674	+	C/G	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.22 : 0.78	intron
rs939425	50540740	+	C/T	0.432	0.279 : 0.721	0.279 : 0.721	0.562 : 0.438	0.014 : 0.986	intron
rs7577485	50543466	+	A/G	0.459	0.591 : 0.405		0.097 : 0.903	0.32 : 0.68	intron
rs7591346	50543469	+	C/T	0.454	0.557 : 0.443		0.097 : 0.903	0.34 : 0.66	intron
rs10178331	50544344	+	C/G	0.478	0.456 : 0.544	0.378 : 0.622	0.867 : 0.133	0.625 : 0.375	intron
rs6738658	50544768	+	A/C	0.448	0.477 : 0.523		0.903 : 0.097	0.64 : 0.36	intron
rs11897143	50545524	+	C/T	0.462	0.568 : 0.432		0.097 : 0.903	0.38 : 0.62	intron
rs12470453	50546440	+	A/G	0.444	N.D.	N.D.	0.028 : 0.972	0.24 : 0.76	intron
rs12470424	50546551	+	C/G	0.444	N.D.	N.D.	0.972 : 0.028	N.D.	intron
rs7572697	50547735	+	C/G	0.486	0.633 : 0.367	0.682 : 0.318	0.625 : 0.35	0.442 : 0.558	intron
rs76199927	50547771	+	A/G	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 : 0.8	intron
rs72874477	50548724	+	C/T	0.497	0.311 : 0.489		0.861 : 0.139	0.12 : 0.88	intron
rs79874915	50550698	+	C/T	0.320	N.D.	N.D.	N.D.	0.8 : 0.2	intron
rs7584172	50550940	+	C/T	0.493	0.456 : 0.545	0.389 : 0.611	0.692 : 0.308	0.217 : 0.783	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs6545163	50551568	+	A/G	0.487	0.5 : 0.5	0.356 : 0.644	0.717 : 0.283	0.125 : 0.875	intron
rs7564489	50552451	+	A/T	0.497	0.545 : 0.455		0.903 : 0.097	0.5 : 0.5	intron
rs7556697	50554046	+	C/T	0.499	0.544 : 0.456	0.625 : 0.375	0.308 : 0.692	0.658 : 0.342	intron
rs80070333	50554122	+	C/G	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.78 : 0.22	intron
rs6736896	50556550	+	C/G	0.499	0.489 : 0.511		0.889 : 0.111	0.06 : 0.94	intron
rs6737125	50556671	+	C/T	0.491	0.533 : 0.467	0.589 : 0.411	0.308 : 0.692	0.842 : 0.158	intron
rs1915167	50559758	-	C/G	0.498	0.5 : 0.5	0.398 : 0.602	0.708 : 0.292	0.407 : 0.593	intron
rs1915166	50559845	-	C/G	0.394	0.445 : 0.545		0.083 : 0.917	0.32 : 0.68	intron
rs77599634	50560433	+	A/G	0.365	N.D.	N.D.	N.D.	0.24 : 0.76	intron
rs75313241	50560499	+	G/T	0.313	N.D.	N.D.	0.806 : 0.194	N.D.	intron
rs28434008	50561721	+	A/G	0.320	0.705 : 0.295		0.917 : 0.083	N.D.	intron
rs79480679	50562389	+	A/C	0.343	N.D.	N.D.	N.D.	0.22 : 0.78	intron
rs28377408	50562453	+	A/T	0.358	0.716 : 0.284		0.785 : 0.125	0.7 : 0.3	intron
rs17040471	50562837	+	C/T	0.320	0.33 : 0.67		0.028 : 0.972	N.D.	intron
rs1217436	50562960	-	A/C	0.500	0.498 : 0.511	0.352 : 0.648	0.683 : 0.317	0.383 : 0.617	intron
rs9309181	50563905	+	G/T	0.500	0.476 : 0.524	0.593 : 0.407	0.208 : 0.792	0.826 : 0.174	intron
rs78183972	50564221	+	C/T	0.312	0.807 : 0.193		N.D.	N.D.	intron
rs13383372	50565103	+	C/T	0.308	0.75 : 0.25		0.972 : 0.028	0.68 : 0.32	intron
rs13397180	50565462	+	C/T	0.497	0.523 : 0.477		0.097 : 0.903	0.88 : 0.12	intron
rs72874490	50565912	+	C/G	0.480	N.D.	N.D.	N.D.	0.6 : 0.4	intron
rs6713614	50566338	+	C/T	0.499	N.D.	N.D.	N.D.	0.48 : 0.52	intron
rs59392224	50567305	+	C/G	0.335	0.375 : 0.625		0.014 : 0.986	N.D.	intron
rs17040473	50567723	+	A/C	0.383	0.682 : 0.318		0.944 : 0.056	0.92 : 0.08	intron
rs6545164	50567789	+	A/G	0.404	0.489 : 0.511	0.364 : 0.636	0.742 : 0.258	0.167 : 0.833	intron
rs6760667	50567883	+	A/G	0.493	0.5 : 0.5		0.097 : 0.903	0.84 : 0.16	intron

ตารางที่ 36 (ต่อ)

SNP ID	Chro. position	strand	observed	avHet	allele frequency				Func.
					HCN	JPT	CEU	YRI	
rs1543973	50569117	-	G/T	0.349	0.656 : 0.344	0.511 : 0.489	0.932 : 0.068	0.88 : 0.12	intron
rs13023114	50573817	+	C/T	0.375	N.D.	N.D.	0.50:5	N.D.	intron
rs13413205	50574038	+	A/C	0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	missense
rs13422484	50574485	+	A/G	0.487	0.5 : 0.5		0.972 : 0.028	0.16 : 0.84	5'UTR
rs74605123	50574508	+	A/C	0.180	N.D.	N.D.	N.D.	0.9:0.1	5'UTR
rs3732049	50574732	-	A/G	0.100	0.122 : 0.878	0.125 : 0.875	0.0 : 1	0.0 : 1	5'UTR

คำอธิบายตารางที่ 36

SNP ID คือ รหัสในฐานข้อมูลสไนป์ส์

Chro. Position คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซม 2 อ้างอิง contig Label: GRch37

avHet คือ ค่าเฉลี่ยของโอกาสเจอสไนป์ส์แบบเฮเทอโรไซกัส

HCN คือ ชาวจีน (Han Chinese)

JPT คือ ชาวญี่ปุ่น (Japanese)

CEU คือ ชาวคอเคเซียน (Northern and Western European)

YRI คือ ชาวแอฟริกา (Yoruba in Ibadan, Nigeria)

N.D. คือ ไม่มีข้อมูล

สไนป์ส์ในตารางที่ 36 ใช้ฐานข้อมูลอ้างอิงดังนี้

contig Label	Contig	mRNA	protein	mRNA orientation	transcript snp
GRch37	NT_022184.15	NM_138735.2	NP_620072.1	forward	plus strand

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวอรุณวรรณ ปลั่งอ่อน	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5110220101	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่จบการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2544

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษ)

- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ พ.ศ. 2552
- รับทุนผู้ช่วยวิจัย Molecular Biotechnology (MOBT) พ.ศ. 2551
- ทุนหลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ พ.ศ. 2552
- ทุนอุดหนุนการวิจัยจากรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2552
- ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์ พ.ศ.2552

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Plong-on, O., Worachotekamjorn, J., Hansakunachai, T., Roongpraiwan, R., Somboontham, T., Ruangdaraganon, N., Sripo, T. and Limprasert, P. 2010. Mutation screening of the beta-Neurexin 1 gene in Thai children with Autism Spectrum Disorders. Proceeding of 2nd Thailand Research Symposium of Thailand Research Expo 2010. The Office of the National Research Council of Thailand (NRCT), August 26-30, 2010. pp. 112-113.

Plong-on, O., Worachotekamjorn, J., Hansakunachai, T., Roongpraiwan, R., Somboontham, T., Ruangdaraganon, N., Sripo, T. and Limprasert, P. 2010. Mutation Screening of the beta-Neurexin 1 Gene (β -NRXN1) in Thai Children with Autism Spectrum Disorders. Abstract of 26th Faculty of Medicine Research Conference. Prince of Songkla University, August 4-6, 2010. pp. 150-151.