

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน **beta-Neurexin 1, Neuroligin 3 (NLGN3)** และ
Neuroligin 4X (NLGN4X) ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

**Mutation screening of Beta-Neurexin 1 (β -NRXN1), Neuroligin 3 (NLGN3)
and Neuroligin 4X (NLGN4X) genes in Thai Children with
Autism Spectrum Disorder**

Researchers

Thai researcher

Pornprot Limprasert M.D., Ph.D.

Department of Pathology, Faculty of Medicine

Prince of Songkla University

Canadian researcher

John B. Vincent, Ph.D.

Molecular Neuropsychiatry & Development Lab, Neurogenetics Section

The Campbell Family Brain Research Institute,

Centre for Addiction and Mental Health, Toronto

and

Department of Psychiatry, University of Toronto

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2552 รหัส โครงการ **MED520235S**

Researchers

Thai researcher

Pornprot Limprasert M.D., Ph.D.

Associate Professor

Human Genome Diagnostic Center

Department of Pathology, Faculty of Medicine

Prince of Songkla University, Hat Yai,

Songkhla, Thailand

Canadian researcher

John B. Vincent, Ph.D.

Senior Scientist

Molecular Neuropsychiatry & Development Lab

Neurogenetics Section

The Campbell Family Brain Research Institute,

Centre for Addiction & Mental Health,

250 College St,

Toronto, ON, M5T 1R8

Canada

and

Associate Professor

Department of Psychiatry

University of Toronto

Canada

Contents

	Page
List of tables	2
List of figures	3
Acknowledgements (in Thai)	4-5
Abstract Part I	6-7
Abstract Part II	8-9
Report Part I	10-20
Screening of <i>NLGN3</i> and <i>NLGN4X</i> genes in Thai children with autism spectrum disorder	
Report Part II	21-38
Screening of beta-Neurexin 1 (<i>β-NRXN1</i>) gene in Thai children with autism spectrum disorder	
Appendix	39
Reprint 1	
Yangngam S, Limprasert P. Mutation Screening of the alpha-neurexin1 (<i>α-NRXN1</i>) gene in Thai children with Autism Spectrum Disorders. The First Asean Plus Three Graduate Research Congress. The Empress hotel, Chaing Mai, March, 1st - 2nd, 2012.	
Reprint 2	
Mikhailov A, Fennell A, Plong-on O, Sripo T, Hansakunachai T, Roongpraiwan R, Sombuntham T, Ruangdaraganon N, Vincent JB, Limprasert P (2014). Screening of <i>NLGN3</i> and <i>NLGN4X</i> genes in Thai children with Autism Spectrum Disorder. <i>Psychiatric Genetics</i> 24:42-43.	

List of Tables

	Page
Table 1.1 Nucleotide changes found in the <i>NLGN3</i> and <i>NLGN4X</i> genes from 143 Thai children with ASD	17
Table 1.2 Variants of the <i>NLGN3</i> gene in ASD patients.	18
Table 1.3 Variants of the <i>NLGN4X</i> gene in ASD patients.	19
Table 2.1 Forward and reverse primers for each exon of <i>NRXN1</i> gene	23
Table 2.2 PCR ingredients for β - <i>NRXN1</i> gene	23
Table 2.3 Thermal cyclers of the PCR for <i>NRXN1</i> gene	23
Table 2.4 Variants identified in the β - <i>NRXN1</i> gene in this study	33
Table 2.5 Missense variants of the β - <i>NRXN1</i> gene in ASD patients shown in Figure 2.2	35
Table 2.6 Summary of the p.S14L variant in ASD cases and controls	36

List of Figures

	Page
Figure 2.1 The <i>NRXN1</i> gene encloses two major forms, α -NRXN1 and β -NRXN, with different promoters (* indicates alternative splicing sites)	21
Figure 2.2 RFLP study for (c.41C>T) (p.S14L) variant in the beta-Neurexin gene	25
Figure 2.3 RFLP study for c.490G>A (p.A164T) variant in the beta-Neurexin gene	26
Figure 2.4 RFLP study for c.816G>C (p.E272D) variant in the beta-Neurexin gene	27
Figure 2.5 The sequencing and fragment analysis of GGC repeats for 5 GGC repeats deletion (1A, 1B), 4 GGC repeats deletion (2A, 2B) and 1 GGC repeat insertion (3A, 3B).	28-29
Figure 2.6 DNA sequencing shows c.490G>A or p.A164T	30
Figure 2.7 DNA sequencing shows c.41C>T (p.S14L) in the family	31
Figure 2.8 DNA sequencing c.816G>C (p.E272D) in the family	31
Figure 2.9 Alignment of the amino acid at position 14 of the beta-Neurexin 1 protien	32

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 , Neuroligin 3 (NLGN3) และ Neuroligin 4X (NLGN4X) ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม สำเร็จลุล่วงได้ดีด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวผู้ป่วยทุกครอบครัวที่เสียสละเวลาอันมีค่าให้โครงการวิจัย

คณะบุคลากรกลุ่มสำคัญคือแพทย์ในโครงการวิจัย ได้แก่ รศ. พญ. นิชรา เรืองดารกานนท์ ผศ. พญ. รวีวรรณ รุ่งไพรวลัย นพ. ทศนวัต สมบุญธรรม (คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี) รศ. พญ. ทิพวรรณ หรรษคุณาศัย (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์) พญ. จุฬามาส วรโชติกำจร (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) เพราะข้อมูลทางคลินิกเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในโครงการนี้

ขณะดำเนินโครงการวิจัยผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนอย่างดียิ่งจาก นพ. วีระยุทธ ประพันธ์พจน์ (สถาบันราชานุกูล) ในการตรวจโครโมโซมและการเก็บ lymphoblastoid cell line นอกจากนี้ นพ. วีระยุทธ ได้อนุญาตให้สถานที่ในการฝึกอบรมนักศึกษาปริญญาโทและผู้ช่วยวิจัย ผู้วิจัยต้องขอบคุณ นพ. วีระยุทธเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยต้องขอบคุณคณะอาจารย์และนักจิตวิทยาที่ช่วยเหลือการตรวจ non verbal IQ และ Vineland Adaptive Behavior Scales ดังรายนามต่อไปนี้ คุณสุปรียา เฟิงสถิตย์ คุณสิริจันทร์ เดชปัญญาวัฒน์ คุณอารีย์ แก้วเผือก คุณสิริจันทร์ เดชปัญญาวัฒน์ คุณปราณี ชาญณรงค์ คุณกุลนรี พิมพ์สังกุล และ คุณดุจเดือน ชินเจริญทรัพย์

โครงการวิจัยได้รับการช่วยเหลือจากนักวิจัยจากต่างประเทศหลายท่าน คือ (1) Assoc. Prof. Dr. Xiuqing Guo และ Mr. Jinrui Cui (Medical Genetics Institute, Cedars-Sinai Medical Center, USA) เป็นวิทยากรฝึกอบรมการวิเคราะห์ข้อมูล Genetic association และที่ปรึกษาด้าน Statistical genetics (2) Prof. Dr. Wendy Roberts (University of Toronto, Canada) เป็นวิทยากรฝึกอบรมการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมโดยใช้ ADOS และ ADI-R (3) Assoc. Prof. Dr. John Vincent (Centre for Addiction & Mental Health, Canada) เป็นที่ปรึกษาด้านการตรวจวิเคราะห์ยีนและผู้ร่วมวิจัยในโครงการที่เกี่ยวข้องกัน (4) Prof. Dr. Josef Gezc (Women's and Children's Hospital, Adelaide, Australia) ช่วยเหลือเรื่องเทคนิคการตรวจยีน ARX

การดำเนินงานธุรการและการประสานงานโครงการวิจัยราบรื่นและเรียบร้อยด้วยความช่วยเหลือของคุณคุณยุพา กระแจ่ม และ คุณบุณชริกา เทพสุภา นอกจากนี้มีรายนามอีกมากมายที่ไม่อาจกล่าวได้หมดในส่วนของคุณเด็กของโรงพยาบาลรามาธิบดี โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ผู้วิจัยต้องขอบคุณทุกท่านที่เกี่ยวข้อง

ผู้วิจัยมีผู้ร่วมงานที่ดีเป็นกำลังสำคัญในการดำเนินงานไม่ว่าจะทางตรงหรือทางอ้อม คือ ผศ. พญ. ดร. สนิชธร รุจิระบรรเจิด และ ดร. ธัญญา ศรีโพธิ์ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาและผู้ช่วยวิจัยทุกคนที่มีส่วนร่วมในการสร้างสรรค์งานวิจัยอันทรงคุณค่าจนสำเร็จด้วยดี ได้แก่ พญ. ฉริยวรรณ

จรัสสวัสดิ์ นางสาวจรียา ข่ายมาน นางสาวจันทร์เพ็ญ ธนกิจโกเศรษฐ์ นางสาวจารุณี มหารัตน์ นางสาวสุภาภรณ์ แทนพ้อ นางสาวกอบกุล ทองสีพัญญู นางสาววรทัย ไหมศรีขาว นางสาวอรุณวรรณ ปลั่งอ่อน นายชฎตุพล พูลจันทร์ นางสาวสุภาภรณ์ ยางงาม นายฟาเทล หะยีดีอระ และนายดาร์เนี่ย เจ๊ะหะ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยหลักจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BT-B-01-MG-18-4814) และทุนวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวเนื่องกัน คือ ทุนมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (MED520235S and MED540647S) และทุนวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (48/364-006, 48/364-006-1 and 48/364-006-2) ทุนส่งเสริมบัณฑิตมูลนิธิอานันทมหิดล ทุนพัฒนา นักวิจัยสกว (RSA5180021) ทุน Fulbright Thai Visiting Scholar และทุนประชุมวิชาการ International Society for Autism Research (INSAR)

ผู้วิจัยระลึกในพระคุณของผู้บริหารของสถาบันต้นสังกัด คือ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้อิสระและส่งเสริมการทำวิจัยอย่างเต็มที่ และผู้วิจัยไม่อาจลืมที่จะเอ่ยนามบุคคลที่ผู้วิจัยถือว่าเป็นแบบอย่างในการทำงาน คือ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิจารณ์ พานิช อาจารย์ผู้สอนมนุษยพันธุศาสตร์คนแรกของผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พรพต ลีมีประเสริฐ
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ ส่วนที่ 1

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน **Neuroigin 3 (NLGN3)** และ **Neuroigin 4X (NLGN4X)** ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดออทิซึมรายงานว่าจะเกี่ยวข้องกับโครโมโซมเอกซ์ โดยเฉพาะการรายงานพบการผ่าเหล่าแบบ nonsense และ missense ในยีนบนโครโมโซมเอกซ์สองยีน คือ neuroigin 3 (*NLGN3*) และ neuroigin 4X (*NLGN4X*) จากผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม ยีน neuroigin สร้างโปรตีนสำหรับยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลบริเวณไซแนปติคของระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเมื่อมีความผิดปกติอาจจะส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทได้ การศึกษานี้จึงตรวจกรองลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณแอกซอนและส่วนรอยต่อแอกซอนและอินทรอนของยีน *NLGN3* และ *NLGN4X* ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม 143 คน ผลการตรวจพบการเปลี่ยนแปลง 6 แบบในยีน *NLGN3* คือ ไม่เคยมีรายงานมาก่อน 3 แบบ (c.597T>A, c. 2475C>T, c.727+69A>T) และ Single nucleotide polymorphism (SNP) 3 แบบ (rs190142919, rs185402974, rs7051693) และพบการเปลี่ยนแปลงแบบ SNP 5 แบบในยีน *NLGN4X* (rs7049300, rs199769855, rs3747333, rs3747334, rs4018000) การเปลี่ยนแปลงที่พบทั้งหมดเป็นแบบไม่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (silent หรือ synonymous) โดยสรุป การเปลี่ยนแปลงในบริเวณแอกซอนที่สร้างกรดอะมิโนของยีน *NLGN3* และ *NLGN4X* ไม่น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคออทิซึมสเปคตรัม

Abstract Part I

Screening of Neuroligin 3 (*NLGN3*) and Neuroligin 4X (*NLGN4X*) genes in Thai children with autism spectrum disorder

Involvement of genetic factors in autism has been established by many studies, and several X chromosomal loci have been suggested. A number of studies have implicated nonsense and missense mutations in the two X-linked neuroligin genes, *NLGN3* and *NLGN4X*, in autism spectrum disorders (ASD). Neuroligins are synaptic adhesion molecules expressed in the central nervous system and interruption of their function is likely to have pathological consequences. This study is to identify potentially etiologic variants of the *NLGN3* and *NLGN4X* genes in Thai children with ASD. We analyzed the coding regions and exon-intron boundaries of the *NLGN3* and *NLGN4X* genes in 143 Thai children with ASD by direct sequencing. We found 3 novel variants (c.597T>A, c. 2475C>T, c.727+69A>T) and 3 SNPs (rs190142919, rs185402974, rs7051693) in the *NLGN3* and 5 SNPs (rs7049300, rs199769855, rs3747333, rs3747334, rs4018000) in the *NLGN4X*. All variants identified in the coding region are silent or synonymous changes. In conclusion, coding mutations in *NLGN3* and *NLGN4X* genes are a rare cause of ASD.

บทคัดย่อ ส่วนที่ 2

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

ออทิซึมสเปคตรัมคือกลุ่มอาการความผิดปกติด้านพัฒนาการระบบประสาท มีความรุนแรงแตกต่างกันใน 3 ด้าน คือ ความผิดปกติด้านปฏิสัมพันธ์กับสังคม ความบกพร่องด้านการสื่อสาร และพฤติกรรมความสนใจแบบจำเพาะซ้ำเติม มีหลักฐานชัดเจนว่าเป็นโรคทางพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับหลายยีนร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ยีน beta-Neurexin 1 (β -NRXN1) เป็นยีนหนึ่งทีคาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เนื่องจากยีน β -NRXN1 สร้างโปรตีนไซแนปส์ของเซลล์ประสาท จากรายงานการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน β -NRXN1 ในผู้ป่วยออทิซึมเชื้อสายคอเคเซียน พบร้อยละ 2 (4/203) มีความผิดปกติของยีน β -NRXN1 จำนวน 2 แบบ คือ p.S14L และ p.T40S การศึกษานี้เพื่อหาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน beta-Neurexin 1 ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัมตามเกณฑ์วินิจฉัยของ DSM-IV จำนวน 170 ราย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบ variant แบบใหม่ 5 แบบในยีน β -NRXN1 คือ 3 แบบที่ตำแหน่ง 5' UTR (c.-749T>A, c.-675G>T, c.-217G>C), 1 แบบของ 6 GGC repeats ในแอกซอน 1 และ 1 แบบในอินทรอน 19 (c.442-38A>C) นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วยออทิซึม 1 รายมีการเปลี่ยนแปลงแบบ c.41C>T (p.S14L) ที่มีเคยรายงานมาแล้ว การเปลี่ยนแปลงนี้ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่ที่ไม่มีอาการ แต่การศึกษาในประชากรไทยปกติ 310 คน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวด้วยวิธี PCR-RFLP หรือการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ การศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ แสดงว่า p.S14L น่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงพบได้น้อย แต่อยู่ในบริเวณสำคัญที่เรียกว่า signal peptide domain การเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 14 จาก เซอรีนเป็นลิซีน อาจส่งผลกระทบต่อการไซแนปส์ของเซลล์ประสาท ทำให้มีผลต่อการเกิดภาวะออทิซึม อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่สามารถตัดสาเหตุจากยีนอื่นๆ ควรมีการศึกษาในระดับโปรตีนต่อไปเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

Abstract Part II
Mutation screening of the beta-Neurexin 1 gene
in Thai children with Autism Spectrum Disorders

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 (β -*NRXN1*) 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 β -*NRXN1* gene. The current study was undertaken to find the frequency of mutation in the β -*NRXN1* gene in 170 Thai children with ASD using direct sequencing. Five novel variants were found in the β -*NRXN1* gene, 3 variants at 5' UTR (c.-749T>A, c.-675G>T, c.-217G>C), one variant of 6 GGC repeats in exon 1 and one variant in intron 19 (c.442-38A>C). One known variant, c.41C>T or p.S14L, was found in a boy with autism which fulfilled the DSM-IV criteria. The p.S14L variant was found in his mother with no autistic symptoms but was not found in his father. To determine if the p.S14L variant is present in the general Thai population, we screened 310 healthy Thai controls using PCR-RFLP or direct sequencing, but we found only the common 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. Another study utilizing protein functional analysis may give a more definite conclusion.