รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน Alpha-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม

Mutation Screening of Alpha-Neurexin 1 in Thai Children with Autism Spectrum Disorders

รศ.ดร.นพ.พรพรต ลิ้มประเสริฐ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2554 รหัสโครงการ MED540647S

ชื่อโครงการวิจัย:

การตรวจกรองการกลายพันธุ์ของยีน Alpha-Neurexin 1 ในเด็กไทยที่เป็นออทิซึมสเปคตรัม
(Mutation Screening of Alpha-Neurexin 1 in Thai Children with Autism Spectrum Disorders)

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.นพ. พรพรต ลิ้มประเสริฐ
หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	3
รายการภาพประกอบ	4
กิตติกรรมประกาศ	5-6
บทคัดย่อ	7-8
บทนำ	9-10
วิธีการดำเนินการวิจัย	10-14
ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา	15-36
สรุปผลการศึกษา	37-38
เอกสารอ้างอิง	39-40
ภาคผนวก	41-51
บทความที่ได้รับการตีพิมพ์ และ supplementary data	

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบนยีน *NRXN1* ในผู้ป่วย 16
2. จีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.2713T>A ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และกลุ่มควบคุม 20
3. จีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.3485-109939C>T ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และกลุ่มควบคุม 24
4. จีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.3715G>A (p.A1239T) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และกลุ่มควบคุม 27
5. จีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.4131G>C (p.E1377D) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และกลุ่มควบคุม 31
6. จีโนไทป์ของการเปลี่ยนแปลง c.573C>T (p.S191S) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปคตรัม และกลุ่มควบคุม 34
7. สนิปส์ที่พบบนยีน *NRXN1* ในผู้ป่วยออทิซึมชาวไทยและในกลุ่มประชากรอื่น 36

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	ขั้นตอนการตรวจกรองการกลายพันธุ์บนยีน Alpha-*NRXN1* ในผู้ป่วยออทิซึม	12
2.	ขอบเขตยีน Alpha-*NRXN1* ที่ทำการศึกษาในการศึกษานี้ทั้งหมด 24 exons	12
3.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.2713T>A, p.F905I	17
4.	โครงสร้างของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนไอโซลิวซีน	18
5.	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 905 ของโปรตีน Alpha-Neurexin 1 ในมนุษย์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	18
6.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลง c.2713T>A (p.F905I)	19
7.	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Alpha-Neurexin 1 ที่พบการเปลี่ยนแปลง p.F905I	20
8.	ผลการทำนายโอกาสที่การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.2713T>A (p.F905I) จะส่งผลต่อการทำหน้าที่ของโปรตีนด้วยโปรแกรม PolyPhen-2	21
9.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.3485-109939C>T (p.S14L)	22
10.	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 14 ของโปรตีน Beta-Neurexin 1 ในมนุษย์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	23
11.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลง p.S14L	24
12.	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Beta-Neurexin 1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง p.S14L	25
13.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมแสดงการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบ c.3175G>A (p.A1239T)	26
14.	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 1239 ของโปรตีน Alpha-Neurexin 1 ในมนุษย์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	26
15.	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Alpha-Neurexin 1 ที่พบการเปลี่ยนแปลง p.A1239T เปรียบเทียบกับแบบที่พบบ่อย	27
16.	ผลการทำนายโอกาสที่การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.3715G>A (p.A1239T) จะส่งผลต่อการทำหน้าที่ของโปรตีนด้วยโปรแกรม PolyPhen-2	28
17.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการเปลี่ยนแปลงแบบ c.4131G>C (p.E1377D)	29
18.	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 1377 ของโปรตีน Alpha-Neurexin 1 ในมนุษย์และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	30
19.	การถ่ายทอดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ c.4131G>C (p.E1377D)	30
20.	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน Alpha-Neurexin 1 ที่พบการเปลี่ยนแปลง p.E1377D	31
21.	ผลการทำนายโอกาสที่การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.4131G>C (p.E1377D) จะส่งผลต่อการทำหน้าที่ของโปรตีนด้วยโปรแกรม PolyPhen-2	32
22.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ c.537C>T, p.S191S	33
23.	อิเล็กโตรเฟอโรแกรมการถ่ายทอด c.573C>T, p.S191S ในครอบครัว PS23-3	33
24	ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโน	38

กิตติกรรมประกาศ

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

คณะบุคลากรกลุ่มสำคัญคือแพทย์ในโครงการวิจัย ได้แก่ รศ. พญ. นิชรา เรืองดารกานนท์ ผศ. พญ. รวิวรรณ รุ่งไพรวัลย์ นพ. ทัศนวัต สมบุญธรรม (คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี) รศ. พญ. ทิพวรรณ หรรษคุณาชัย (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์) พญ.จุฑามาส วรโชติกำจร (คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) เพราะข้อมูลทางคลินิกเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในโครงการนี้

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

ผู้วิจัยต้องขอบคุณคณะอาจารย์และนักจิตวิทยาที่ช่วยเหลือการตรวจ non verbal IQ และ Vineland Adaptive Behavior Scales ดังรายนามต่อไปนี้ คุณสุปรียา เพ็งสถิตย์ 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) เป็นที่ปรึกษาด้านการตรวจวิเคราะห์ยีนและผู้ร่วมวิจัยในโครงการที่เกี่ยวเนื่องกัน (4) Prof. Dr. Josef Gezc (Women's and Children's Hospital, Adelaide, Australia) ช่วยเหลือเรื่องเทคนิคการตรวจยีน *ARX*

การดำเนินงานธุรการและการประสานงานโครงการวิจัยราบรื่นและเรียบร้อยด้วยความช่วยเหลือของ คุณคุณยุพา กระแจ่ม และ คุณบุณฑริกา เทพสุภา นอกจากนี้มีรายนามอีกมากมายที่ไม่อาจกล่าวได้หมดในส่วนของคลินิกเด็กของโรงพยาบาลรามาธิบดี โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ผู้วิจัยต้องขอบคุณทุกท่านที่เกี่ยวข้อง

ผู้วิจัยมีผู้ร่วมงานที่ดีเป็นกำลังสำคัญในการดำเนินงานไม่ว่าจะทางตรงหรือทางอ้อม คือ ผศ. พญ. ดร. สินิจธร รุจิระบรรเจิด และ ดร. ธัญญา ศรีโพธิ์ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอบใจนักศึกษาและผู้ช่วยวิจัยทุกคนที่มีส่วนร่วมในการสร้างสรรค์งานวิจัยอันทรงคุณค่าจนสำเร็จด้วยดี ได้แก่ พญ. ฉริยาวรรณ

จรัลสวัสดิ์ นางสาวจริยา ข่ายม่าน นางสาวจันทร์เพ็ญ ธนกิจโกเศรษฐ์ นางสาวจารุณี มหารัตน์ นางสาวสุภาภรณ์ แทนพ่อ นางสาวกอบกุล ทองสิพพัญญู นางสาววรทัย ไหมศรีขาว นางสาวออรฎาวรรณ ปล้องอ่อน นายเชฐตุพล พูลจันทร์ นางสาวสุภาภรณ์ ยางงาม นายฟาเดล หะยีดือเระ และนายดาร์เนีย เจ๊ะหะ

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

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

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พรพรต ลิ้มประเสริฐ
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

Neurexin 1 เป็นโปรตีนกลุ่ม cell adhesion molecule เกิดจากการถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *NRXN1* โปรตีน Neurexin 1 ทำหน้าที่จับกับโปรตีน Neuroligin โดยอาศัยแคลเซียมไอออนเกิดเป็นโครงสร้าง Neurexin-Neuroligin ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการรับส่งสารสื่อประสาท โปรตีน Neurexin 1 มีสองไอโซฟอร์มหลักคือ Alpha-Neurexin 1 (α-NRXN1*)* และ Beta-Neurexin 1 (β-NRXN1*)* การศึกษายีน *NRXN1* หลายรายงานพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะออทิซึมสเปคตรัม การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความถี่และชนิดของการกลายพันธุ์บนยีน α-*NRXN1* ในเด็กไทยที่มีภาวะออทิซึมสเปคตรัม โดยศึกษาบริเวณเอกซอนทั้ง 24 เอกซอนและรอยต่อระหว่างเอกซอนอินทรอนของยีน α-*NRXN1* ในผู้ป่วย 170 ราย ด้วยวิธี direct sequencing และศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มควบคุม 310 คน สำหรับการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนที่พบใหม่ ซึ่งอาจเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือการเปลี่ยนแปลงที่พบได้น้อยหรือการกลายพันธุ์ ผลการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 26 แบบ ประกอบด้วยสนิปส์ 11 แบบ การเปลี่ยนแปลงในอินทรอนที่พบใหม่ 7 แบบ (c.889+119T>C, c.932-60C>T, c.2467+60G>A, c.3667-38A>C, c.3485-110728T>A, c.3485-110654G>T และ c.3485-110196G>C) ความหลากหลายของจำนวนซ้ำ GGC 3 แบบ การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบไม่เปลี่ยนกรดอะมิโนที่พบใหม่ 1 แบบคือ c.573C>T หรือ p.S191S การเปลี่ยนแปลงที่พบได้น้อยและเคยมีรายงานมาแล้ว 3 แบบ คือ p.S14L p.A1239T และ p.E1377D และการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์แบบเปลี่ยนกรดอะมิโนที่พบใหม่ 1 แบบคือ c. 2713T>A (p.F905I) ซึ่งพบในผู้ป่วยเด็กชายออทิซึมสเปคตรัม 1 คน แต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม 310 คน การทำนายผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิโปรตีนด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศสองโปรแกรม (DromPred และ PolyPhen-2) พบว่าโปรตีนในแบบที่มีกรดอะมิโนไอโซลิวซีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและอาจส่งผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาเพิ่มเติมในระดับการทำหน้าที่ของโปรตีนจะทำให้ได้ข้อสรุปที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

ABSTRACT

Neurexin 1 has two major protein isoforms using alternative promoters, coding for the alpha-neurexin 1 (*α-NRXN1*) and beta-neurexin 1 (*β-NRXN1*) genes. This study is to explore the possibility that variants of the *NRXN1* gene predispose to autism spectrum disorder (ASD). The coding regions in 24 exons and exon-intron boundaries of the *NRXN1* gene were investigated in 170 Thai patients with ASD by direct DNA sequencing. Twenty-six variants were identified including 11 single nucleotide polymorphisms, 7 novel intronic variants (c.889+119T>C, c.932-60C>T, c.2467+60G>A, c.3667-38A>C, c.3485-110728T>A, c.3485-110654G>T and c.3485-110196G>C), 3 variants of GGC repeats, one novel silent variant (c.573C>T or p.S191S), 3 rare known variants (p.S14L, p.A1239T and p.E1377D) and one novel missense variant (c. 2713T>A or p.F905I). The p.F905I variant was found in a boy with ASD but it was not found in 310 controls. The two bioinformatic programs, DromPred and PolyPhen-2, have shown that the p.F905I variant changes the secondary structure of the α-NRXN1 protein and damages the protein function. However, further studies utilizing protein functional analysis of the novel variants are required for a more definite conclusion.