

การศึกษาเครือข่ายควบคุมยีนโดยภาวะเหนือพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม  
ด้วยการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

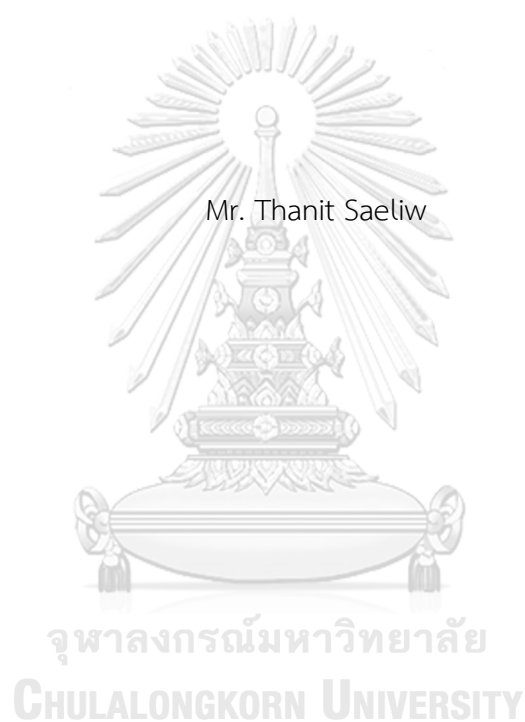
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INVESTIGATION OF EPIGENETIC GENE REGULATORY NETWORKS ASSOCIATED  
WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD) BY GLOBAL METHYLATION ANALYSIS  
OF THE TRANSPOSABLE ELEMENT ALU



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular  
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาเครือข่ายควบคุมยีนโดยภาวะเหนือพันธุกรรมที่  
เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วยการวิเคราะห์ระดับ  
เมธิเลชันของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu

โดย

นายธนิต แซ่หลิว

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.पालนี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เจตน์สว่าง)



# # 5776657037 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: AUTISM SPECTRUM DISORDER / ALU ELEMENTS / RETROTRANSPOSON / DNA METHYLATION / EPIGENETIC REGULATION / GENE EXPRESSION PROFILES / SUBGROUPING / LYMPHOBLASTOID CELL LINES

THANIT SAELIW: INVESTIGATION OF EPIGENETIC GENE REGULATORY NETWORKS ASSOCIATED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD) BY GLOBAL METHYLATION ANALYSIS OF THE TRANSPOSABLE ELEMENT ALU. ADVISOR: TEWARIT SARACHANA, Ph.D., 108 pp.

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of complex neurodevelopmental disorders with a wide variety of risk factors. The alteration of gene expression profiles in ASD patient blood or blood-derived cell lines has been reported, along with differential methylation in many tissues, including the brain and blood. Alu elements are a group of repetitive elements that can influence gene expression through CpG residues for DNA methylation that control gene expression. However, no studies have identified an association between Alu elements and gene expression in ASD. In this study, we demonstrate that Alu repetitive elements were associated with divergent gene expression profiles in blood or blood-derived cell lines from ASD patients by multiple integrated data analysis. We identified 423 genes that were differentially expressed, and predictions of the biological function of these genes indicated neurological functions and pathways involved with the molecular pathology of ASD. We further investigated Alu methylation levels and patterns in lymphoblastoid cell lines (LCLs) derived from ASD patients by the COBRA method. Our results showed that Alu methylation patterns in ASD subgroup-based individual phenotypic analysis were significantly altered, consistent with the gene expression profile analysis, which revealed differentially expressed genes among ASD subgroups with differential methylation. Our findings provide a new evidence suggesting that DNA methylation of Alu elements is associated with ASD, possibly by causing alterations of gene expression in different ASD subgroups based on individual phenotypes. We also suggest that classification of ASD patients into subgroups based on phenotypes of individual heterogeneous patients may help improve our understanding of ASD etiology or susceptibility.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature .....

Field of Study: Clinical Biochemistry and  
Molecular Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาของ อาจารย์ ดร. เทวฤทธิ์ สาระชนะ ซึ่งทำหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักในงานวิจัยครั้งนี้ ที่คอยให้ คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการดำเนินการวิจัยและแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในตลอดระยะเวลาที่ได้ดำเนินการวิจัย ตลอดจนถึงติดตามความก้าวหน้า พร้อมกับให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ศิษย์ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. Valarie W. Hu จากมหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน สหรัฐฯ ที่ให้คำแนะนำ และสนับสนุนเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ที่ใช้เป็นโมเดลในการศึกษานี้ รวมถึง โปรแกรมวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ และขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิ รางกูร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ และที่ให้คำแนะนำ และสนับสนุนงาน ทางด้านการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เจตน์สว่าง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภายนอกมหาวิทยาลัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ ประธานกรรมการในการ สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้รวมถึง คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญ พระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา และ ทุน ๙๐ ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ ความสะดวกในด้านสถานที่ และอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจส่งผลให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย .....	3
1.3 คำถามงานวิจัย .....	3
1.4 สมมติฐานงานวิจัย .....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.6 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
1.7 กรอบแนวคิดการวิจัย .....	5
1.8 แผนภาพระเบียบวิธีการวิจัย (Experimental workflow) .....	6
บทที่ 2 .....	7
ทบทวนวรรณกรรม .....	7
2.1 ออทิสซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder, ASD).....	7
2.2 ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมในโรคออทิสซึมสเปกตรัม .....	9
2.3 ความสำคัญของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในโรคออทิสซึมสเปกตรัม .....	12
2.4 บทบาทของ Alu elements ในมนุษย์.....	16

บทที่ 3 .....	23
วิธีดำเนินการวิจัย .....	23
3.1 กลุ่มตัวอย่าง และโมเดลที่ใช้ในการศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออก ของยีนที่ผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม .....	23
3.1.1 Lymphoblastoid cell lines .....	23
3.1.2 ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างสำหรับการทดลอง .....	23
3.2 การเก็บรวบรวม และคัดเลือกข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Data collection for Bioinformatics analysis).....	25
3.2.1 การเก็บรวบรวมข้อมูลรูปแบบการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึม สเปกตรัม .....	25
3.3.2 การรวบรวมรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ภายในส่วนต่าง ๆ ของ ยีน.....	25
3.3 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนเพื่อหาความเกี่ยวข้องของ Alu elements กับ การแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม Connection up and down-regulation expression analysis for microarrays (CU-DREAMx).....	26
3.4 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยตัววิเคราะห์ทางสถิติสำหรับเทคนิค microarrays (Significant Analysis of Microarrays, SAM).....	28
3.5 การวิเคราะห์เพื่อหา biological functions และ gene regulatory networks ของยีน ที่แสดงออกผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ Alu elements ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....	29
3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ lymphoblastoid .....	30
3.7 การสกัดดีเอ็นเอและ อาร์เอ็นเอ (DNA and RNA Extraction).....	31
3.8 การศึกษาระดับปฏิกิริยาเมธิเลชันของ AluS subfamilies ด้วยเทคนิค Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) .....	32
3.9 การคำนวณระดับและรูปแบบของดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu (Alu methylation level and pattern analysis).....	35



3.10 การวิเคราะห์ระดับแสดงออกของยีน และของ AluS subfamilies ด้วยเทคนิค  
Quantitative RT-PCR .....37

3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis).....39

บทที่ 4 .....40

ผลการศึกษาวิจัย .....40

4.1 ผลการรวบรวมข้อมูลชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูล.....40

4.1.1 ข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ทำศึกษาในเลือดของผู้ป่วยออทิซึม  
สเปกตรัม .....40

4.1.2 รายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในส่วนประกอบของยีน (Alu-inserted  
genes) 41

4.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน (gene expression profiles) ในเลือด หรือ  
เซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม CU-  
DREAMx .....43

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่รวบรวมจากงานวิจัยต่าง ๆ เพื่อ  
ค้นหากลุ่มยีนที่มี Alu elements อยู่ภายในยีน และมีการแสดงออกที่ผิดปกติใน  
เลือด หรือเซลล์ไลน์ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม .....43

4.2.2 ผลการเปรียบเทียบรายชื่อยีนที่มี Alu elements และมีการแสดงออกที่ผิดปกติ  
ระหว่างงานวิจัยทั้ง 5 ที่ถูกคัดเลือกมาจากฐานข้อมูล .....45

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs จำนวน 56  
เซลล์ที่ใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการ  
แสดงออกของยีน .....46

4.3 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยตัววิเคราะห์ทางสถิติสำหรับเทคนิค  
microarrays (Significant Analysis of Microarrays, SAM).....48

4.4 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีน (biological functions and gene regulatory networks) ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกของยีนผิดปกติในเลือดจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ meta-analysis.....	50
4.4.1 บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม .....	50
4.4.2 เครือข่ายควบคุมยีน (gene regulatory networks) ที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม .....	52
4.5 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีน (biological functions and gene regulatory networks) ของกลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกของยีนผิดปกติในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M.....	55
4.6 ผลการวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs เพื่อศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีนผ่านทางกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชัน .....	59
4.7 ผลการวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR.....	65
4.8 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs.....	66
4.9 ผลการวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic (ROC) เพื่อใช้ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements ในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม .....	73
บทที่ 5 .....	75
อภิปรายผลการทดลอง.....	75
บทที่ 6 .....	82

สรุปผลการทดลอง ข้อเสนอแนะ และข้อจำกัดงานวิจัย.....82

รายการอ้างอิง .....84

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ..... 108



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

**สารบัญตาราง**

ตารางที่ 1 Prevalence of Autism Spectrum Disorder (ASD) จัดทำโดยหน่วยงาน The Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network ของ CDC .....8

ตารางที่ 2 สมการการคำนวณระดับดีเอ็นเอเมธิเลชัน และรูปแบบเมธิเลชัน CpG 2 ตำแหน่งบน AluS subfamilies จากเทคนิค COBRA .....36

ตารางที่ 3 รายละเอียดของ primers ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และ AluS subfamilies ด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR .....38

ตารางที่ 4 รายละเอียดของแต่ละงานวิจัยที่คัดเลือกเพื่อนำรูปแบบการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูล GEO DataSets .....41

ตารางที่ 5 รายชื่อยีน และจำนวนของยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน ที่รวบรวมจากฐานข้อมูล TranspoGenes Database .....42

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ระหว่างรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ กับรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยที่รวบรวมจากการศึกษาวิจัยต่าง ๆ .....44

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ระหว่างรายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ กับรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (n=36) และกลุ่มควบคุม (n=20) .....47

ตารางที่ 8 รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ (all insertion type) และมีระดับการแสดงออกผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M ที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง (high confidence level, SAM analysis) และยืนยันผลด้วย qRT-PCR.....49

ตารางที่ 9 รายชื่อโรค และหน้าที่ทางชีวภาพ (diseases and function) ของยีนที่ได้คัดเลือกมาทั้งหมด 423 ยีนผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....51

ตารางที่ 10 Canonical pathways ของยีนที่ได้คัดเลือกมาทั้งหมด 423 ยีนจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ซึ่งเป็น pathway ที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม .....52

ตารางที่ 11 Gene regulatory networks ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) โดยใช้รายชื่อที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และการแสดงออกของ ยีนที่ผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม .....53

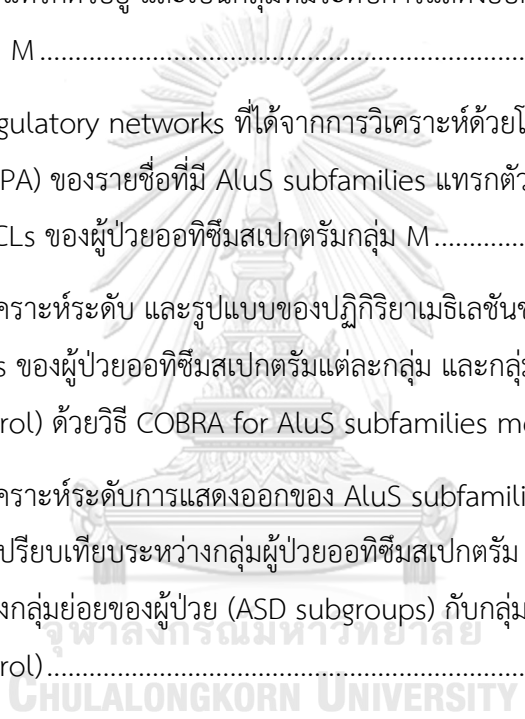
ตารางที่ 12 หน้าที่ทางชีวภาพ และโรคต่าง ๆ (biological functions and diseases) ที่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ ในเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M.....56

ตารางที่ 13 Canonical pathways ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA โดยใช้รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และเป็นกลุ่มที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติในเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่ม M .....57

ตารางที่ 14 Gene regulatory networks ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ของรายชื่อที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติใน LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M.....58

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ระดับ และรูปแบบของปฏิกิริยาเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่ม และกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่ต่างกัน (age-matched control) ด้วยวิธี COBRA for AluS subfamilies method.....60

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ด้วยวิธี quantitative RT-PCR ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (ASD) กับกลุ่มควบคุม (control) และระหว่างกลุ่มย่อยของผู้ป่วย (ASD subgroups) กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่ต่างกัน (age-matched control).....65



## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 DNA methylation pathways .....	13
ภาพที่ 2 การกระจายตัวของ CpG dinucleotide ในจีโนมมนุษย์ .....	17
ภาพที่ 3 Alu structure and mechanism (A) โครงสร้างทางพันธุกรรมของ Alu elements	19
ภาพที่ 4 ความสำคัญของระดับเมธิเลชันของ Alu elements ต่อกลไกทางอณูชีววิทยาภายใน เซลล์ .....	21
ภาพที่ 5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของโปรแกรม CU-DREAMx .....	27
ภาพที่ 6 Bisulfite Conversion แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของ DNA กับสารไบซัลไฟต์ หลังจากนั้นทำการ purify bisulfite-treated DNA.....	33
ภาพที่ 7 โครงสร้าง และการวัดระดับเมธิเลชันของ Alu elements .....	35
ภาพที่ 8 แผนภาพ Venn diagram ของรายชื่อยีนที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ระหว่างรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ (all Alu insertion type) และ รูปแบบการแสดงออกของยีนจากเซลล์เม็ดเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มควบคุม .....	45
ภาพที่ 9 แสดงรูปแบบการแสดงออกของยีน (expression Image) ของกลุ่มยีนมีระดับการแสดงออกแตกต่างกับกลุ่มคนปกติอย่างที่มีนัยสำคัญที่ระดับความผิดพลาด %FDR 5 .....	49
ภาพที่ 10 Gene regulatory network ที่เกี่ยวข้องกับ Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization และ Nervous System Development and Function.....	54
ภาพที่ 11 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่าง ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม กับกลุ่มควบคุม (A vs C) .....	61
ภาพที่ 12 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่าง ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่แตกต่างกัน (age-matched controls) .....	62
ภาพที่ 13 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่าง ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่แตกต่างกัน (age-matched controls).....	63

ภาพที่ 14 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่แตกต่างกัน (age-matched controls) .....64

ภาพที่ 15 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มควบคุม (n=55).....67

ภาพที่ 16 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมทั้งหมด (ASD, n=36) .....68

ภาพที่ 17 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของกลุ่มควบคุม (n=19).....69

ภาพที่ 18 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M (n=10).....70

ภาพที่ 19 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L (n=6).....71

ภาพที่ 20 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S (n=20).....72

ภาพที่ 21 Receiver operating characteristic (ROC) ของรูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies ใน LCLs ของผู้ป่วยกลุ่ม M และกลุ่ม S.....74

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

ออทิซึมสเปกตรัม (autism spectrum disorder) เป็นความผิดปกติของพัฒนาการทางระบบประสาท (neurodevelopment disorder) ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความผิดปกติทางด้านพฤติกรรมหลัก 2 ด้านได้แก่ ความผิดปกติทางด้านสังคมและการใช้ภาษาในการสื่อสาร (social interaction and language communication) และ ด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมแบบซ้ำ (repetitive-restrictive behavior) ซึ่งในหลายปีที่ผ่านมาความชุก (prevalence) ของโรคออทิซึมสเปกตรัมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ตามรายงานล่าสุดของกรมควบคุมและป้องกันโรคสหรัฐ (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) พบว่าเด็กจำนวน 1 ใน 68 คนจะป่วยเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของจำนวนผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทำให้นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากพยายามที่จะหาสาเหตุที่เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาทและพฤติกรรมในโรคออทิซึมสเปกตรัม

การศึกษาทางด้านพันธุกรรมในโรคออทิซึมสเปกตรัมทำให้มีความรู้ความเข้าใจถึงความซับซ้อนของชีวพยาธิสภาพ (biopathological conditions) และกลไกทางอณูวิทยา (molecular mechanism) ที่ทำให้เกิดโรค หรือทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเพิ่มมากขึ้น โดยปัจจัยทางด้านพันธุกรรม (genetic factors) เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาทได้ อย่างไรก็ตามความรู้ที่ได้จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมสามารถใช้อธิบายสาเหตุของความผิดปกติในผู้ป่วยได้เพียงแค่ 10-20% ของผู้ป่วยเท่านั้น ต่อมาได้มีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งหมด (gene expression profiling) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม (idiopathic cases) ได้แสดงให้เห็นรูปแบบการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมว่ามีรูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างจากคนปกติ ซึ่งความผิดปกติของระดับการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมอาจเกิดมาจากปัจจัยบางอย่างที่ไปรบกวนการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษากลไกดีเอ็นเอเมธิเลชันในโรคออทิซึมสเปกตรัมซึ่งเป็นกลไกที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนในจีโนม

ในปีค.ศ.2010 Nguyen และคณะได้ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันของดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีนในจีโนมมนุษย์โดยใช้เซลล์จากเลือดของแฝดร่วมไข่ที่คนหนึ่งเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมรุนแรงแต่อีกคนหนึ่งไม่เป็น (discordant monozygotic twins) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CpG island microarray พบว่าแฝดผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมจะมีระดับเมธิเลชันของ CpG islands กว่า 70 ตำแหน่งเปลี่ยนแปลงไป (Nguyen, Rauch, Pfeifer, & Hu, 2010) ทำให้เกิด



ข้อสันนิษฐานว่าความผิดปกติของระดับเมธิเลชันของดีเอ็นเอในผู้ป่วยโรคออทิซึม ไม่น่าจะเกิดที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Nguyen และคณะไม่ครอบคลุมในบริเวณที่อื่น ๆ ของจีโนมไม่ใช่มิวติ ซึ่งถือบริเวณเหล่านี้เป็นบริเวณส่วนใหญ่ของจีโนมที่ครอบคลุมพื้นที่มากกว่าครึ่งของจีโนม

Alu elements จัดเป็นสารพันธุกรรมประเภทดีเอ็นเอที่มีลักษณะจำวนซ้ำ ๆ ภายในจีโนม ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนและสามารถเคลื่อนที่ไปแทรกตัวในบริเวณต่าง ๆ ได้ ซึ่งปัจจุบันประมาณการว่าจำนวนของ Alu elements คิดเป็น 13% ของจีโนม นอกจากนี้ Alu elements ยังสามารถที่จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนในบริเวณที่แทรกตัว หรือยีนข้างเคียงได้ซึ่ง CpG ในลำดับเบสของ Alu elements ทั้งจีโนมคิดเป็นร้อยละ 23 ของทั้งหมดดังนั้นปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements ที่เปลี่ยนแปลงไปอาจมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อระดับการแสดงออกของยีน ในปัจจุบันการศึกษาทบทวนของ Alu elements ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมยังมีไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตาม มีหลักฐานว่า Alu elements อาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางระบบประสาทต่าง ๆ รวมถึงโรคออทิซึมสเปกตรัม โดย Mbarek และคณะได้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของ Alu elements ที่อยู่ใน intron 27b ของยีน Neurofibromatosis type 1 (NF1) มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม (Mbarek et al., 1999) ยิ่งไปกว่านั้น Fruhmesser และคณะพบว่าในผู้ป่วยที่มีการพัฒนาการล่าช้าและมีลักษณะทางพฤติกรรมคล้ายผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีความผิดปกติของ Alu elements ในบริเวณ intron 1 ของยีน exocyst complex component 6B (EXOC6B) (Fruhmesser et al., 2013) การค้นพบเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของ Alu elements อาจเป็นสาเหตุของโรคหรือเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมได้

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีผู้ทำการศึกษาระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม ดังนั้นผู้ทำวิจัยมีจุดประสงค์ที่จะทำการศึกษาปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements และความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีนที่มีความผิดปกติ (gene expression) ในเซลล์จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ไม่ทราบสาเหตุหรือไม่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม เพื่อหวังว่าข้อมูลจากการศึกษาวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงสาเหตุหรือกลไกที่เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติในการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเหล่านั้นมากขึ้น นอกจากนั้นผู้ทำวิจัยยังหวังว่าผลจากการศึกษานี้อาจพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในเลือดที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ของโรคออทิซึมสเปกตรัมในอนาคตได้

## 1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม ด้วยการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ Alu elements
2. เพื่อวิเคราะห์เครือข่ายควบคุมยีน (gene regulatory networks) ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่ไม่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อน

## 1.3 คำถามงานวิจัย

ปฏิกิริยาเมธิเลชัน และการแทรกตัวของ Alu elements ในจีโนมเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของรูปแบบการแสดงออกของกลุ่มยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยโรคออทิสซึมสเปกตรัมหรือไม่ และกลุ่มยีนที่มีการแทรกตัวของ Alu elements และแสดงออกผิดปกติ มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันและเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพระดับอนุชีววิทยาของออทิสซึมสเปกตรัมอย่างไร

## 1.4 สมมติฐานงานวิจัย

ปฏิกิริยาเมธิเลชัน และการแทรกตัวของ Alu elements ในจีโนม มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของรูปแบบการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคออทิสซึมสเปกตรัมในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

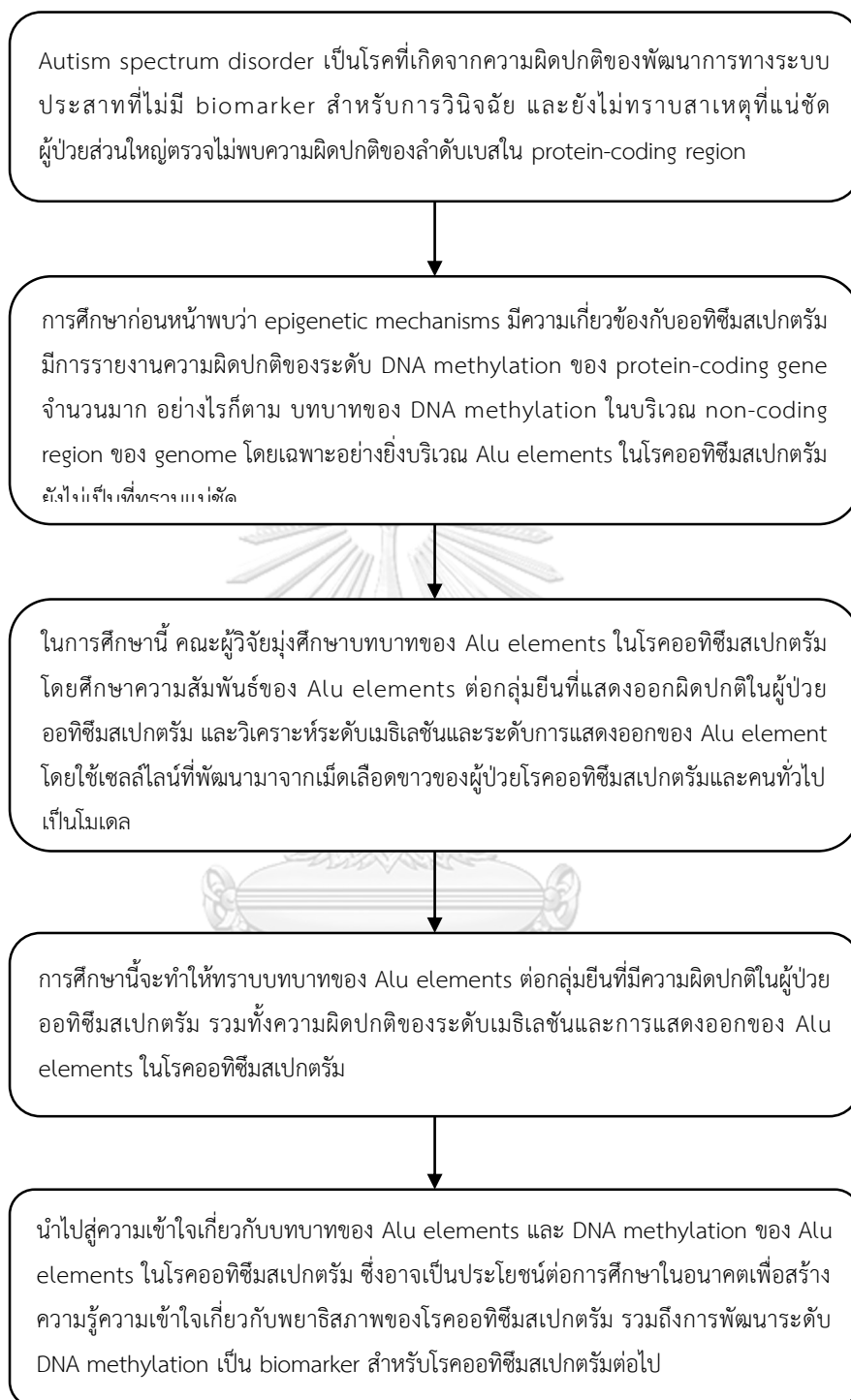
## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบระดับและรูปแบบของปฏิกิริยาเมธิเลชันของ Alu elements ในเซลล์ไลน์จากผู้ป่วยออทิสซึมที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม (idiopathic case) เทียบกับคนปกติ
2. ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างระดับปฏิกิริยาเมธิเลชันของ Alu elements กับระดับการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์จากผู้ป่วยออทิสซึมที่ไม่ทราบสาเหตุพันธุกรรม
3. ทำให้ทราบเครือข่ายการควบคุมยีนแบบเอพิเจเนติกและหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ Alu elements ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่ไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic case)
4. ความรู้ที่ได้อาจพัฒนาเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคออทิสซึมสเปกตรัมได้ในอนาคต

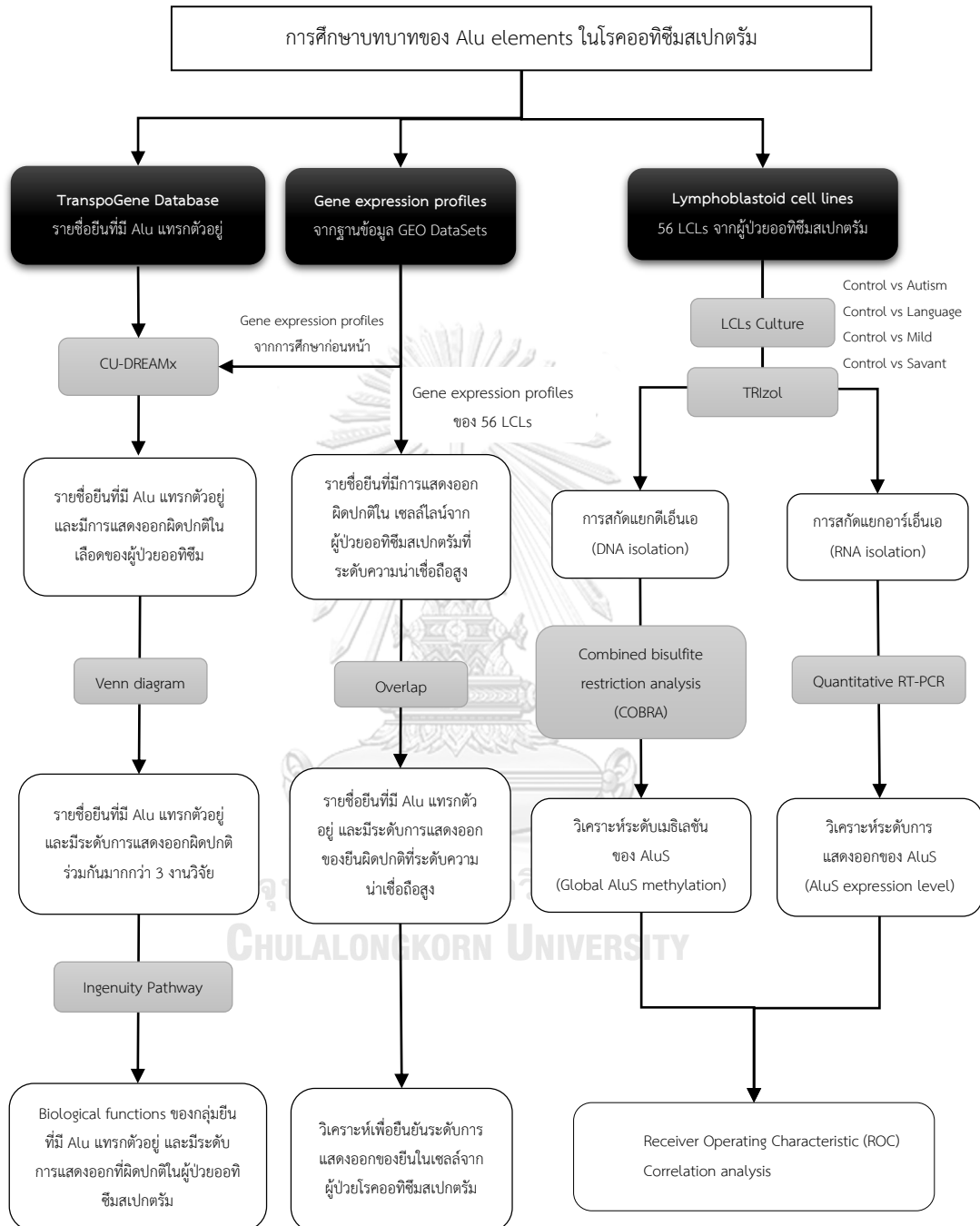
## 1.6 ขอบเขตงานวิจัย

1. การศึกษาผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 56 รายถูกแบ่งออกเป็นสามกลุ่มตามที่ Dr.Hu และคณะได้ดำเนินการในปี 2009 โดยอาศัยข้อมูลการวินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัม (ADI-R) ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมหลักเกณฑ์ แบ่งได้เป็นผู้ป่วยกลุ่ม Severe Language type (L) Mild type (M) และ Savant type (S)
2. การศึกษานี้เป็นการศึกษาระดับปฏิกิริยาเมธิเลชันในบริเวณ promoter ของ AluS subfamilies โดยใช้ lymphoblastoid cell lines (LCLs) ที่พัฒนามากจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ยังไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม (idiopathic case) และคนปกติ โดยทำการศึกษาดังวิธี Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)
3. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันของ AluS subfamilies กับรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ของผู้ป่วย จะอาศัยการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์มาช่วยในการคัดเลือกยีนที่มีการแทรกตัวของ Alu elements และมีรูปแบบการแสดงออกผิดปกติด้วยโปรแกรม Connection up and down-regulation expression analysis (CU-DREAMx)

### 1.7 กรอบแนวคิดการวิจัย



## 1.8 แผนภาพระเบียบวิธีการวิจัย (Experimental workflow)



## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ออทิสซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder, ASD)

ออทิสซึมสเปกตรัม (autism spectrum disorder, ASD) เป็นความผิดปกติทางด้านพัฒนาการของระบบประสาท (neurodevelopment disorder) ส่งผลผู้ป่วยมีความผิดปกติทางด้านพฤติกรรม 2 ด้านตามหลักเกณฑ์การวินิจฉัยของ Diagnostic and Statistical Manual of mental disorder, Fifth Edition (DSM-5) ประกอบด้วยความผิดปกติทางด้านสังคมและการใช้ภาษาในการสื่อสาร (social interaction and language communication) และ ด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมแบบซ้ำ (repetitive-restrictive behavior) ซึ่งตามหลักเกณฑ์ของ DSM-5 การวินิจฉัยโรคออทิสซึมสเปกตรัมจะอาศัยการสังเกตความผิดปกติทางด้านพฤติกรรมเป็นเกณฑ์โดยจัดความผิดปกติทางพฤติกรรมเป็น 2 ด้าน โดยผู้ป่วยจะต้องมีความผิดปกติทางพฤติกรรมในแต่ละหมวดตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนั้น DSM-V ยังได้แบ่งระดับความรุนแรงอาการเป็น 3 ระดับตั้งแต่ระดับ 1 ต้องให้การสนับสนุน จนถึงระดับ 3 ต้องให้การสนับสนุนอย่างมาก ซึ่งในการวินิจฉัยความผิดปกติทางพฤติกรรมตามคู่มือ DSM-V นั้นจำเป็นต้องอาศัยแบบสอบถามและความชำนาญของแพทย์เพื่อระบุความผิดปกติทางพฤติกรรม ในประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศที่พัฒนาแล้วใช้แบบสอบถาม Autism Diagnostic Interview - Revised (ADI-R) เป็น gold standard ในการวินิจฉัยโรคออทิสซึมสเปกตรัม โดย ADI-R เป็นชุดแบบสอบถาม 123 ประการ ซึ่งมีแพทย์เป็นผู้สอบถามผู้ปกครองของเด็ก ควบคู่กับการสังเกตพฤติกรรมของเด็กไปด้วย จากนั้นจะสรุปออกมาเป็นคะแนนในด้านพฤติกรรมประเภทต่าง ๆ (Arlington, 2013)

ในปัจจุบันพบว่าความชุก (prevalence) ของโรคออทิสซึมสเปกตรัมในประชากรเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในสหรัฐอเมริกาจากรายงานล่าสุดของหน่วยงาน The Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network ที่จัดตั้งโดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคสหรัฐ (CDC) พบว่าในปี 2010 ความชุกของโรคออทิสซึมสเปกตรัมสูงถึง 14.7 คนในประชากร 1,000 คน หรือจะพบเด็กที่มีความผิดปกติ 1 คนจากเด็กทั้งหมด 68 คน ซึ่งความชุกเพิ่มขึ้นเกือบเท่าตัวภายในระยะเวลาเพียง 6 ปีเมื่อเทียบกับรายงานในปี 2004 นอกจากนั้นยังพบภาวะออทิสซึมสเปกตรัมในเด็กผู้ชายได้มากกว่าเด็กผู้หญิงถึง 5 เท่า (Christensen et al., 2016) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของจำนวนผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมอย่างรวดเร็วนี้เองก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างแก่ภาครัฐที่ต้องสูญเสียทั้งทรัพยากรบุคคลที่มีคุณภาพ และรายจ่ายเป็นจำนวนเงินสูงถึง 11,500 – 60,900 ล้านดอลลาร์สหรัฐ เพื่อใช้ในการสนับสนุนดูแลเด็กที่ป่วยเป็นออทิสซึมสเปกตรัม โดยค่าใช้จ่ายส่วนมากใช้การการสนับสนุนระบบการศึกษาพิเศษ (special education service) สำหรับเด็กที่ต้อง

ได้รับการสนับสนุน นอกจากนั้นครอบครัวของเด็กที่มีความผิดปกติเองยังต้องแบกรับภาระในการดูแลเลี้ยงดูเด็กที่ป่วย 1 คนเป็นจำนวนเงินมากถึง 40,000 ถึง 60,000 เหรียญสหรัฐต่อครอบครัวต่อปี (Lavelle et al., 2014) ดังนั้นการศึกษาเพื่อที่เข้าใจลักษณะของชีวพยาธิสภาพ (biopathological conditions) และกลไกทางอณูวิทยา (molecular mechanism) ที่ทำให้เกิดโรคเป็นสิ่งที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากจนถึงปัจจุบันยังไม่มีสารบ่งชี้ทางชีวภาพใดๆ ที่สามารถใช้วินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัมได้อย่างมีประสิทธิภาพและจำเพาะเจาะจง

Surveillance Year	Birth Year	Number of ADDM Site Reporting	Prevalence per 1,000 Children (Range)	1 in x Children
2000	1992	6	6.7 (4.5-9.9)	1 in 150
2002	1994	14	6.6 (3.3-10.6)	1 in 150
2004	1996	8	8.0 (4.6-9.8)	1 in 125
2006	1998	11	9.0 (4.2-12.1)	1 in 110
2008	2000	14	11.3 (4.0-21.2)	1 in 88
2010	2002	11	14.7 (5.7-21.9)	1 in 68
2012	2004	11	14.6 (8.2-24.6)	1 in 68

ตารางที่ 1 Prevalence of Autism Spectrum Disorder (ASD) จัดทำโดยหน่วยงาน The Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network ของ CDC โดยมีเป้าหมายที่จะประมาณจำนวนเด็กที่ป่วยเป็นออทิซึมสเปกตรัมในรัฐต่างๆ ในสหรัฐอเมริกาซึ่งรายงานในปี 2000-2016 แสดงให้เห็นอัตราการเพิ่มขึ้นของโรคออทิซึมสเปกตรัมสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

## 2.2 ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมในโรคออทิซึมสเปกตรัม

ออทิซึมสเปกตรัมเป็นความผิดปกติทางระบบประสาทที่มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย (etiological heterogeneity) โดยสามารถเกิดได้ทั้งจากความผิดปกติทางพันธุกรรม และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม หรือเกิดได้จากทั้งสองปัจจัยร่วมกัน (gene x environment interactions) (Gardener, Spiegelman, & Buka, 2011; Hallmayer et al., 2011) มีการศึกษาจำนวนมากที่พบว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีความเกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม แต่ถึงอย่างไรก็ตามความผิดปกติทางระบบประสาทของโรคออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดยังไม่สามารถสรุป หรืออธิบายได้โดยอาศัยหลักฐานทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว จำเป็นต้องพิจารณาหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกัน เช่นปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม และกลไกที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม ในหัวข้อนี้ผู้ทวิวิจัยได้รวบรวมหลักฐานการค้นพบในระดับพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมเพียงบางส่วนเพื่อแสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวเนื่องของปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของโรค และความซับซ้อนของพยาธิสภาพในโรคออทิซึมสเปกตรัม

### 2.2.1 ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม กับความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

นักวิจัยต่างเชื่อว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมน่าจะเป็นสาเหตุของความผิดปกติทางพัฒนาการของระบบประสาทในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยมีผลการศึกษามากที่พบว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยในปี 2009 Rosenbergetal และคณะได้ทำการศึกษาความผิดปกติในฝาแฝด (twins study) พบว่าในฝาแฝดร่วมไข่ (monozygotic twins) โอกาสที่ฝาแฝดหนึ่งคนมีความผิดปกติเป็นโรคออทิซึมและฝาแฝดอีกคนมีโอกาที่จะเป็นโรคเหมือนกัน หรืออัตราของการเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมของฝาแฝดทั้งคู่ (concordance rate) สูงถึง 88% ในขณะที่อัตราของฝาแฝดแบบไข่คนละใบ (dizygotic twins) มีอัตราที่จะเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมทั้งคู่อยู่ 31% เท่านั้น (Rosenberg et al., 2009) ยิ่งไปกว่านั้น การพยายามในศึกษาสาเหตุทางพันธุกรรมในผู้ป่วยก็ได้สะท้อนให้เห็นว่ามีความผิดปกติทางพันธุกรรมจำนวนมากที่เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับความหลากหลายของพยาธิสภาพและระดับความรุนแรงของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

การศึกษาทางด้านพันธุกรรมในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม พบว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีความเกี่ยวข้องกับกลไกพัฒนาการทางระบบประสาทตัวอย่างเช่นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ presynaptic cell และ postsynaptic cell โดยยีนเหล่านี้มักเป็นยีนที่ทำหน้าสำคัญสำหรับโครงสร้างและการเรียงตัวของ transmembrane ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง synapses และ cellular signaling controlling ของเซลล์ประสาทในช่วงการพัฒนาการของระบบ



ประสาท (neurodevelopment) ตัวอย่างเช่นการมีเวชันของยีนในกลุ่ม adhesion protein บน presynaptic membrane เช่น Neurexin ที่ทำหน้าที่จับกับ adhesion protein บน post-synaptic membrane ในระหว่าง synapses โดยในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมพบว่ามี การ mutation บน axon ของ *NRXN1* (Dachtler et al., 2015) ต่อมา Grayton HM และคณะ ทำการ knock out ยีน *NRXN1* ในหนูพบว่าหนูมีความผิดปกติของพฤติกรรมทางด้านสังคม (social behaviors) ซึ่งเป็นอาการความผิดปกติอย่างหนึ่งของโรคออทิสซึมสเปกตรัม (Grayton, Missler, Collier, & Fernandes, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่ามีความผิดปกติของยีนที่อยู่ในโครงสร้างของ postsynaptic membrane สามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางระบบประสาทได้เช่นเดียวกัน เช่น โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเสมือนโครงสร้างยึดเกาะของ receptor หรือ adhesion molecule ต่าง ๆ ภายใน postsynaptic cells ได้แก่ Shank family protein หรือ ProSAP โดยมีรายงานว่า การมีเวชันยีน SHANK3 มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิสซึมสเปกตรัม (Durand et al., 2007) อย่างไรก็ตามไม่เพียงแค่อยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ประสาทเท่านั้นที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิสซึมสเปกตรัม แต่ยังมียีนอีกจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางอณูชีววิทยาอื่น ๆ ของระบบประสาท หรือการพัฒนากการที่พบว่ามีความผิดปกติในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม เช่น ความผิดปกติของยีน serotonin transporter มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิสซึมสเปกตรัม ทำให้การ reuptake serotonin เปลี่ยนแปลงไปและส่งผลต่อระดับ serotonin ในร่างกาย ซึ่งปกติแล้ว serotonin นั้นจะมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาการของสมองในช่วง prenatal และ postnatal period นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น neurotransmitter ที่เกี่ยวข้องกับด้านพฤติกรรม เช่น social behavior อีกด้วย (Abramson et al., 1989; Anderson, Hertzog, & McBride, 2012) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีที่มีความสามารถในการวิเคราะห์ที่หลากหลายทางพันธุกรรมอย่าง Genome-wide association study มาช่วยในการวินิจฉัยพบว่ามีการ copy number variations (CNVs) ของโครโมโซมบางตำแหน่งที่ขาดหายไป หรือเพิ่มขึ้นมา มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิสซึมสเปกตรัม เช่น duplications at 7q11.23, duplications at 15q11.13 และ deletions and duplications at 16p11.2 และยังพบว่า SNP variants ก็มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิสซึมสเปกตรัมเช่นกัน อย่างเช่น SNP เบส T ของยีน methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) (Ma et al., 2009; Ronald et al., 2010; Weiss & Arking, 2009)

การศึกษาทางด้านพันธุกรรมได้ให้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกทางอณูชีววิทยา (molecular mechanism) ที่เป็นสาเหตุ (etiology) ของโรคออทิสซึมสเปกตรัมมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความรู้ทางด้านพันธุกรรมต่อโรคออทิสซึมสเปกตรัมที่มีอยู่สามารถอธิบายสาเหตุของความผิดปกติในผู้ป่วยได้เพียงแค่ 10-20% ของผู้ป่วยโรคออทิสซึมสเปกตรัมทั้งหมด ซึ่งหมายความว่าผู้ป่วยมากกว่า 80% ที่ยังไม่สามารถระบุสาเหตุของโรคได้ (Idiopathic cases) (Schaefer & Mendelsohn, 2008) ยิ่งไป

กว่านั้นการศึกษาในฝาแฝดร่วมไข่ (monozygotic twin study) ไม่เพียงแต่เป็นหลักฐานชิ้นสำคัญที่สนับสนุนปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเป็นสาเหตุของความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมเท่านั้น แต่ยังแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมนั้นไม่สามารถที่จะอธิบายความผิดปกติดังกล่าวในฝาแฝดไข่ร่วมไข่ได้ทั้งหมด เพราะยังมีฝาแฝด monozygotic twins บางคู่ที่ฝาแฝดอีกคนไม่ได้มีความผิดปกติดังกล่าวเลย หรือในฝาแฝดที่มีความผิดปกติทั้งคู่ก็ไม่ได้มีระดับความรุนแรงของความผิดปกติทางด้านพฤติกรรมในระดับเดียวกันทั้ง ๆ ที่ฝาแฝดแบบร่วมไข่เหล่านั้นมีพื้นฐานทางด้านพันธุกรรมที่เหมือนกัน ซึ่งสิ่งนี้แสดงให้เห็นถึง etiological heterogeneity ของโรคออทิซึมสเปกตรัมได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงน่าจะมีปัจจัยบางอย่างหรือความผิดปกติของกลไกภายในเซลล์ในลักษณะอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีผลต่อความผิดปกติทางด้านการพัฒนาการของระบบประสาทในโรคออทิซึมสเปกตรัม

## 2.2.2 ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม กับความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

ในปัจจุบันมีผลการศึกษาที่พบว่าปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์กับกระบวนการพัฒนาการทางระบบประสาทที่ผิดปกติ ซึ่งเกิดได้จากความผิดปกติทางร่างกายของมารดาเช่น อายุหรือสิ่งแวดล้อมภายนอก นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณการได้รับ folate และ folic acid ของมารดาในระหว่างการตั้งครรภ์มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของโรคออทิซึมสเปกตรัม เช่นการศึกษาในเด็กจากพื้นที่ที่ไม่ได้รับอาหารเสริมประเภทที่มี folic acid พบว่าโรคออทิซึมสเปกตรัมมีความเกี่ยวข้องกับ polymorphisms ของ methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) ซึ่งอาจเนื่องมาจาก folate และ folic acid มีความสำคัญมากสำหรับกลไกทางชีววิทยาพื้นฐานของเซลล์ ได้แก่ DNA replication และกลไกทางเอพิเจเนติกอย่าง DNA methylation (Pu, Shen, & Wu, 2013; Suren et al., 2013) อย่างไรก็ตามการศึกษาทางด้านสิ่งแวดล้อมที่กล่าวมานั้นเป็นเพียงแค่การสังเกตความสัมพันธ์เพื่ออธิบายความเสี่ยงเท่านั้น ทำให้มีความจำเป็นต้องทำการศึกษากลไกที่จะอธิบายความสัมพันธ์เหล่านี้ ซึ่ง Epigenetic mechanism เป็นกลไกทางชีววิทยาพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาถึงผลกระทบของปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมต่อการตอบสนองทางพันธุกรรม อย่างเช่น ระดับการแสดงออกของยีน (the effects of environmental factors on gene expression) การศึกษาในหนูทดลองพบว่าการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม เช่น เมื่อทำการแยกลูกหนูออกจากแม่ (maternal separation) ตั้งแต่แรกเกิดจะเหนี่ยวนำลูกหนูเกิดความเครียดและแสดงพฤติกรรมเพื่อตอบสนองออกมา และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับของดีเอ็นเอเมธิเลชันในบริเวณ promoters ของหลาย ๆ ยีนในเซลล์สืบพันธุ์ (germline) ของลูกหนู และที่สำคัญการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้ (Franklin et al., 2010) จากผลการทดลองข้างต้น

แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของกลไกการควบคุมยีนแบบเอพิเจเนติกส์ โดยเฉพาะกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชัน (DNA methylation) ต่อการตอบสนองต่อปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมและเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมในโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติของการแสดงออกทางพันธุกรรมผ่านกลไกเอพิเจเนติกในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมอย่างเช่น รูปแบบการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในกลุ่มดังกล่าว

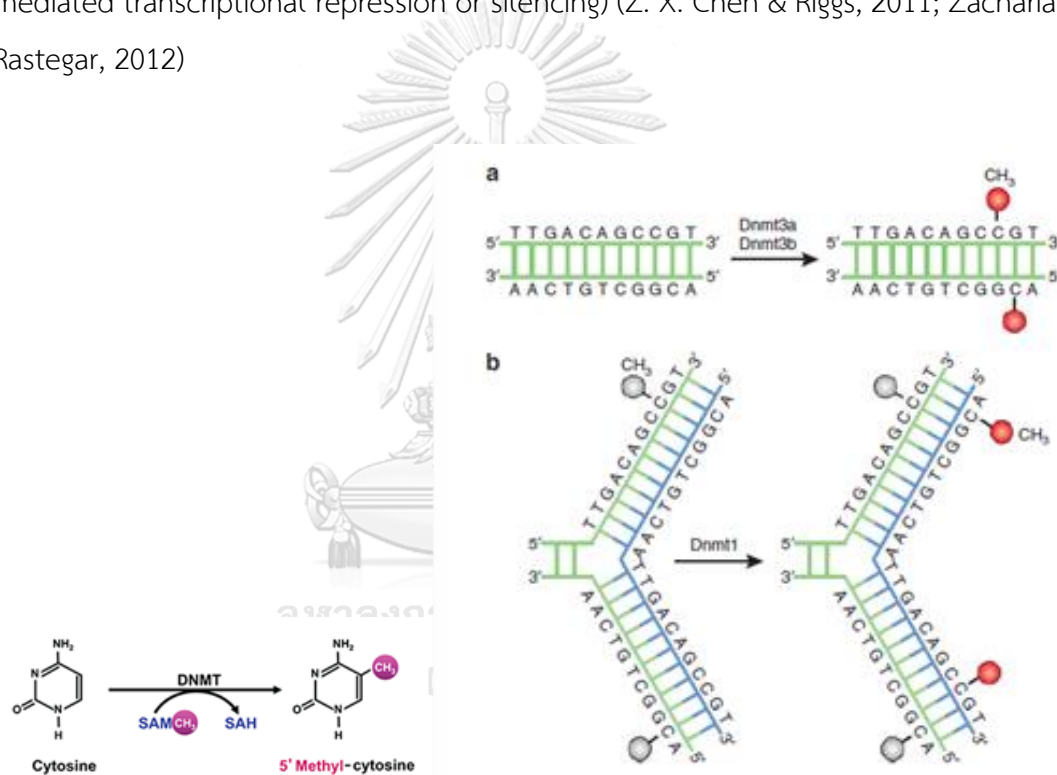
### 2.3 ความสำคัญของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในโรคออทิซึมสเปกตรัม

Epigenetic mechanism เป็นกลไกทางอณูชีววิทยาภายในเซลล์ที่ใช้ในการควบคุมหรือเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนโดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสของดีเอ็นเอ ซึ่งทำงานโดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของโครโมโซม (chromosome modification) หรือเปลี่ยนแปลงลักษณะคุณสมบัติของเบสบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งกลไกควบคุมยีนแบบเอพิเจเนติกส์ ประกอบด้วย Histone modification, DNA methylation และ RNA silencing กลไกเหล่านี้จะทำหน้าที่เพิ่มและลด (transcriptional activation and repression) ระดับการแสดงออกของยีนในจีโนม ซึ่งกลไกเอพิเจเนติกส์ถือเป็นกลไกตัวกลางที่ตอบสนองระหว่างปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรมดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ดังนั้นกลไกทางเอพิเจเนติกส์จึงมีความสำคัญอย่างมากในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ยังไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมซึ่งเป็นผู้ป่วยส่วนใหญ่ และคาดการณ์ว่าสิ่งแวดล้อมน่าจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความผิดปกติในผู้ป่วยกลุ่มนี้

#### 2.3.1 ปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน

ปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน (DNA methylation) เป็นกลไกทางอณูชีววิทยาที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ genomic imprinting genomic reprogramming and stability cellular differentiation X-chromosome inactivation (XCI) transposon silencing RNA splicing DNA repair และ transcriptional activation and repression โดยปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันเป็นปฏิกิริยาที่เติมหมู่เมธิล (CH<sub>3</sub>) จาก S-adenyl methionine (SAM) ลงบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (C) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) การเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันปกติแล้วมักจะเป็นการเติมหมู่เมธิลให้กับเบส C ที่อยู่ติดกับเบสกวานีน (G) หรือเรียกตำแหน่งนั้นว่า CpG โดยจะพบได้มากในบริเวณของ gene promoter หรือ transcription start sites ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน (5<sup>m</sup>C) บน gene promoter สามารถที่

เปลี่ยนแปลงระดับการแสดงของยีนโดยทำให้เกิดการ transcriptional repression โดย 5<sup>m</sup>C จะไปรบกวนการจับหรือทำให้การจดจำตำแหน่งของ transcription factor เปลี่ยนแปลงไป และนอกจากนั้น 5<sup>m</sup>C ยังทำให้เกิดการรวมตัวของโปรตีนที่ทำหน้าที่จับบน DNA บางชนิด (recruitment of DNA binding protein complexes) ได้แก่ methyl binding proteins (MBPs), co-repressor complexes และ chromatin remodeling factors โดยเฉพาะการจับบริเวณ 5<sup>m</sup>C ของโปรตีนในกลุ่ม methyl binding proteins อย่างเช่น Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) หรือตัวอื่นๆที่มี methyl-binding domain ภายในโมเลกุล การจับโดยโปรตีนเหล่านี้เป็นกลไกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน (DNA methylation-mediated transcriptional repression or silencing) (Z. X. Chen & Riggs, 2011; Zachariah & Rastegar, 2012)



ภาพที่ 1 DNA methylation pathways กลไกนี้อาศัยการทำงานของ DNA methyltransferases (Dnmts) ในการเติมหมู่เมธิล (CH<sub>3</sub>) จาก S-adenyl methionine (SAM) ให้กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (A) Dnmt3a และ Dnmt3b จะเป็นเอนไซม์ในการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอในตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่เคยเกิดเมธิเลชัน (de novo DNA methylation) (B) Dnmt1 เป็นเอนไซม์ที่เติมหมู่เมธิลเพื่อรักษารูปแบบของการเกิดเมธิเลชันให้กับดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดขึ้นในการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) (Moore, Le, & Fan, 2013)

### 2.3.2 ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในสมองและเลือด

โรคออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีระดับความรุนแรงไม่ถึงขั้นที่จะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ท้าทายอย่างมากที่จะทำการศึกษาค้นหาความผิดปกติที่เกิดขึ้นสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในขณะที่ยังมีชีวิต ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันซึ่งเป็นกลไกที่มีความจำเพาะ และมีรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อทำให้การศึกษาความผิดปกติของกลไกดังกล่าวทำได้ยากกว่าการศึกษาทางด้านพันธุกรรมที่วิเคราะห์หาความผิดปกติของลำดับเบสของดีเอ็นเอเป็นอย่างมาก และในปัจจุบันก็ยังไม่ได้มีการศึกษาที่ทำการเปรียบเทียบระดับและรูปแบบของการเกิดเมธิเลชันทั้งจีโนมโดยใช้สมองและเลือดจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมคนเดียวกันมาก่อน ซึ่งก็มีการศึกษาวิจัยส่วนหนึ่งที่เป็นหลักฐานว่าปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในสมองมีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในเลือด โดยในปี ค.ศ.2012 Horvath และคณะได้ทำการเปรียบเทียบระดับการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันทั้งจีโนมจากเลือด และสมองของมนุษย์ส่วนต่าง ๆ ได้แก่ frontal cortex temporal cortex pons และ cerebellum ซึ่งพบว่าสมองทั้ง 4 ส่วนมีความสัมพันธ์กับระดับเมธิเลชันที่เกิดขึ้นในเลือด (whole blood) (Horvath et al., 2012) นอกจากนี้ Masliah และคณะได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันในสมองส่วน frontal cortex และเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood leukocytes) จากผู้ป่วยโรค Parkinson โดยใช้เทคนิค genome-wide methylation profiling พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันในหลายตำแหน่งที่เพิ่มขึ้น และลดลงในผู้ป่วย Parkinson เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติทั้งในสมองและเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งที่มีระดับเมธิเลชันเปลี่ยนแปลงในสมองของและเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมีความสอดคล้องกัน (concordant methylation alterations) และมีความสัมพันธ์ระหว่างสมองและเลือด (Masliah, Dumaop, Galasko, & Desplats, 2013) ส่วนในโรคออทิซึมสเปกตรัมนั้น Nguyen และคณะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมในเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับคนปกติ และยังพบว่าระดับของโปรตีนที่ผลิตจากยีนนั้นมีระดับการแสดงออกในสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ผิดปกติไปด้วย (Nguyen et al., 2010) ซึ่งหลักฐานดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่าการศึกษาปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันโดยใช้เลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดนั้นสามารถเป็นตัวแทนในการศึกษาความผิดปกติในผู้ป่วยโรคทางระบบประสาทหรือสมองได้

### 2.3.3 การศึกษาปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในโรคออทิซึมสเปกตรัม

รูปแบบของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการพัฒนาการของระบบประสาท เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ประสาท เมื่อกลไกที่ทำหน้าที่สร้างและจดจำรูปแบบเมธิเลชันเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำได้ อย่างเช่น Rett syndrome หนึ่งในลักษณะของความบกพร่องทางสติปัญญา (mental retardation) ที่มีลักษณะความผิดปกติคล้ายคลึงกับโรคออทิซึมสเปกตรัม มีสาเหตุมาจากการมิวเทชันของยีน MeCP2 (Amir et al., 1999) และทำให้ยีนที่ถูกควบคุมด้วย MeCP2 ผ่านกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชันมีการแสดงออกที่ผิดปกติไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า MeCP2 ควบคุมหลาย ๆ ยีนที่มีความเกี่ยวข้อง กับ synaptic plasticity neuronal cell proliferation และ neuronal transcription factor เช่น brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความผิดปกติของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนจะทำให้การทำงานของยีนหรือการแสดงออกของยีนผิดปกติไป ในขณะที่ความผิดปกติของกลไกการควบคุมยีนในลักษณะอื่น ๆ เช่นการเปลี่ยนแปลงของระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน ในบริเวณยีนหรือส่วนที่ทำหน้าที่เป็น regulatory element ของยีนสามารถทำให้ยีนที่ถูกควบคุมผ่านกลไกนั้นมีระดับการแสดงออกผิดปกติไปด้วยเช่นกัน

การศึกษาระดับเมธิเลชันของยีนเดี่ยว (single gene) ในโรคออทิซึมสเปกตรัม พบว่ามียีนที่มีความเกี่ยวข้อง กับออทิซึมสเปกตรัมอย่างมาก (autism candidate genes) มีการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันทั้งในเลือดและในสมอง ตัวอย่างเช่นยีน *BCL2*, *EN2*, *MeCP2*, *SHANK3*, *UBE3A* และ *RORA* แต่ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดว่าอะไรเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และทำไมถึงเกิดขึ้นในยีนที่มีความสำคัญเหล่านี้ (Grayson & Guidotti, 2016) ในปีค.ศ.2010 Nguyen และคณะได้ทำการสำรวจการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันของดีเอ็นเอในบริเวณ promoter ของยีนในจีโนมมนุษย์ด้วยเทคนิค CpG island microarray มาวิเคราะห์เซลล์จากเลือดของแฝดร่วมไข่ที่คนหนึ่งเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมรุนแรงแต่อีกคนหนึ่งไม่เป็น (discordant monozygotic twins) พบว่าแฝดผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีระดับเมธิเลชันผิดปกติในบริเวณ CpG islands ของยีนกว่า 70 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hu และคณะในปี 2009 ที่ทำการศึกษาระดับ transcriptome ในเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยเทคนิค microarray พบว่าผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างจากคนปกติ (Hu, Sarachana, et al., 2009; Nguyen et al., 2010) หลักฐานการค้นพบดังกล่าวทำให้ทราบว่าความผิดปกติของกลไกเมธิเลชันในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมไม่ได้เกิดขึ้นในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่าความผิดปกติของระดับเมธิเลชันของดีเอ็นเอในผู้ป่วยโรคออทิซึม น่าจะเกิดขึ้นในหลาย ๆ บริเวณของจีโนมมากกว่าการเกิดที่ตำแหน่ง

เฉพาะเจาะจง อย่างไรก็ตาม CpG island microarray ที่ Nguyen และคณะใช้นั้นครอบคลุมพื้นที่แค่ 1-2% ในจีโนมเท่านั้น และการศึกษาในระดับมิเลชันส่วนมากสนใจไปที่ส่วนที่เป็น coding regions ซึ่งยังมีส่วนประกอบอื่นของจีโนมที่มี CpG island คิดเป็นร้อยละ 50 ของทั้งจีโนม โดย Alu elements เป็นสารพันธุกรรมส่วนหนึ่งของจีโนมที่มีจำนวน CpG มากถึง 23% ของทั้งจีโนม

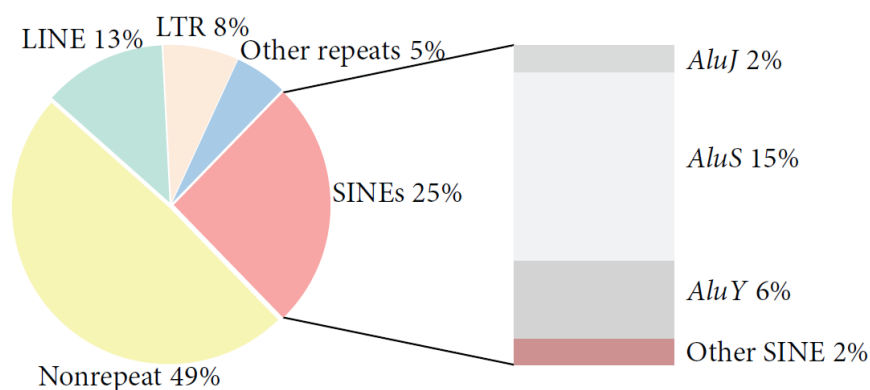
## 2.4 บทบาทของ Alu elements ในมนุษย์

### 2.4.1 วิวัฒนาการของ Alu elements

ในจีโนมของมนุษย์เราที่มีมากกว่า 3 พันล้านคู่เบส จะมีองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 45 ของจีโนมเป็นสารพันธุกรรมประเภทที่มีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ได้ (mobile genetic elements) และหนึ่งในสารพันธุกรรมเคลื่อนที่ซึ่งมีปริมาณ (copies) มากที่สุดก็คือ ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu หรือ Alu elements โดยสามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยกลไกที่เกี่ยวข้องกับ RNA (RNA dependent mechanism) เป็นตัวกลาง หรือเรียก mobile genetic elements ประเภทนี้ว่า retrotransposons นอกจากนี้ Alu elements จัดเป็นสารพันธุกรรมขนาดเล็กที่มีจำนวนซ้ำ ๆ และกระจายอยู่ในจีโนม เรียกว่า short interspersed nuclear elements (SINEs) เพราะมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน (amplification) และความสามารถในแทรกตัว (retro-transposition) ลงในบริเวณอื่น ๆ ของจีโนมได้ โดยปัจจุบัน Alu elements ได้มีการเพิ่มจำนวนอยู่ในจีโนมมากถึงหนึ่งล้าน copies หรือมากถึงร้อยละ 13 ของจีโนม เมื่อประมาณ 65 ล้านปีที่แล้ว Alu elements มีต้นกำเนิดมาจากยีน 7SL RNA ซึ่งเป็นส่วนประกอบอาร์เอ็นเอ (RNA component) ของ signal recognition particle (SRP) และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลังโปรตีนของเซลล์สำหรับโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ โดย first fossil Alu monomers (FAMs) เกิดมาจากกระบวนการ partial deletion ของยีน 7SL RNA และหลังจากนั้นภายในระยะเวลาช่วงหนึ่งได้เกิดกระบวนการรวมตัวของ Alu monomers เป็น Alu dimer ซึ่งเป็น Alu elements ที่มีคุณสมบัติในการเคลื่อนที่และยังคงมีการเพิ่มจำนวนเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน (Batzer & Deininger, 2002; Kriegs, Churakov, Jurka, Brosius, & Schmitz, 2007; Ullu & Tschudi, 1984; Walter & Blobel, 1982)

หากพิจารณาจากกระบวนการวิวัฒนาการเป็นหลักเราสามารถจัดจำแนก Alu elements ตามตำแหน่งการมิวเทชันบนลำดับเบสของ Alu ออกเป็นประเภทหลักได้ 3 subfamilies ได้แก่ AluJ, AluS และ AluY และหากพิจารณาในด้านของจำนวน (copies) AluS subfamilies เป็นชนิดที่มีจำนวนมากที่สุดในจีโนม โดยพบมากกว่าจำนวนของ AluJ และ AluY subfamilies รวมกันถึง 2 เท่า (Batzer et al., 1996; Bennett et al., 2008) นอกจากนี้ Alu elements มี CpG จำนวนมากใน

ลำดับเบส ซึ่งคิดเป็น 23% ของจีโนมทั้งหมด และมากถึง 15% มาจาก CpG ของ AluS subfamilies (Luo, Lu, & Xie, 2014)



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของ CpG dinucleotide ในจีโนมมนุษย์ แสดงให้อัตราส่วนของ CpG ในบริเวณต่าง ๆ ของจีโนม โดยมากกว่า 50% เป็นบริเวณที่ไม่ใช้ยีน และ 25% พบในส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำ (repeat elements) ชนิด short interspersed repetitive elements (SINEs) ซึ่งเป็นส่วนของ Alu elements มากถึง 23% และพบมากสุดใน AluS subfamilies (Luo et al., 2014)

#### 2.4.2 โครงสร้าง และกลไกรีโทรทรานโพซิชั่นของ Alu elements

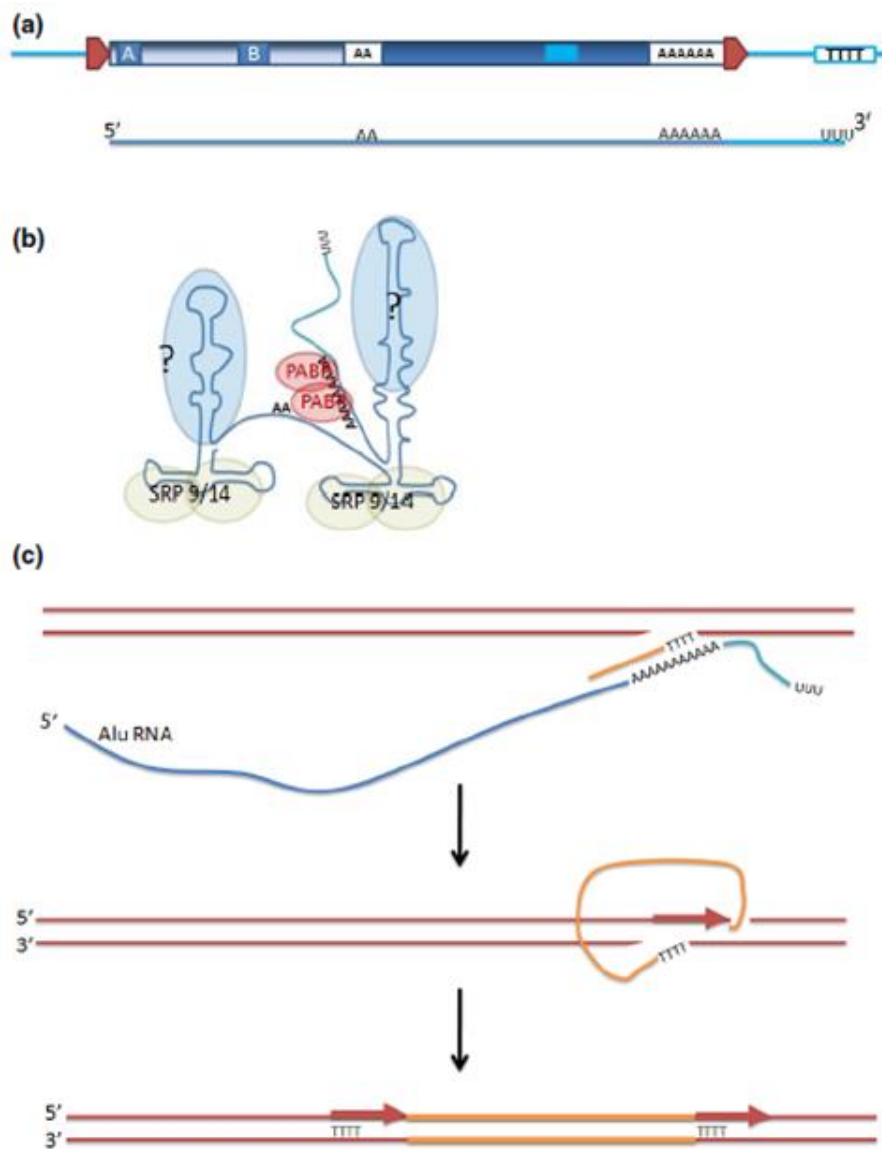
โครงสร้างของ Alu elements มีความยาวประมาณ 300 คู่เบสและมีโครงสร้างเป็น dimer ที่คั่นกลางด้วย A-rich ( $A_5TACA_6$ ) ระหว่าง monomer unit โดยที่ left-haft monomer จะเป็นส่วนของ internal RNA polymerase III promoter (Box A, B) ซึ่ง promoter นี้จะมีความสำคัญสำหรับการ transcription หรือ amplification ของ Alu elements ส่วน right-haft monomer จะมีปลายด้าน 3' end เป็น Poly A tail ที่มีความสำคัญสำหรับกำหนดโครงสร้างของ Alu RNA และเป็นบริเวณจำเพาะของ poly-A binding protein อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu จะไม่มี terminator สำหรับกระบวนการ transcription แต่จะสิ้นสุดที่ TTTT terminator sequence ในบริเวณที่อยู่ใกล้ที่สุด

สำหรับการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ (retrotransposition) ของ Alu elements จะอาศัยการทำงานของ RNA polymerase III ในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของ Alu หลังจากนั้น Alu RNA ที่ได้จะมีโครงสร้างที่จำเพาะสำหรับการรวมตัว (mobilization) กับ ribonucleo-protein particles ได้แก่ SRP9/14 heterodimer และ poly-A binding protein ซึ่งช่วยให้ Alu RNA สามารถรวมตัวกับ ribosome และ ORF2 protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์มาจาก LINE-1 (long interspersed elements) ซึ่งเป็น retrotransposons ที่ขนาดใหญ่กว่า จากนั้น Alu RNA



จะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณอื่นๆในจีโนม และทำการแทรกตัวโดยอาศัยการทำงานของ ORF2p ที่มีคุณสมบัติเป็น endonuclease activity ที่จะตัดจำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณที่เป็น T-rich region ต่อมาบริเวณที่ถูกตัดนี้จะถูกใช้เป็น primer ที่จำเพาะกับ Poly-A tail ของ Alu RNA และดำเนินเข้าสู่ขั้นตอน reverse transcription ของ Alu RNA เพื่อคัดลอกเป็น cDNA โดยอาศัยคุณสมบัติ reverse transcriptase ของ ORF2p เรียกว่ากลไกนี้ว่า Target-primed reverse transcription mechanism หลังจากนั้น Alu cDNA ที่ได้จะถูกคัดลอกคู่สมลงในส่วนช่องว่างตรงข้ามด้วยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด (unknown mechanism) (Batzer & Deininger, 2002; Deininger, 2011)





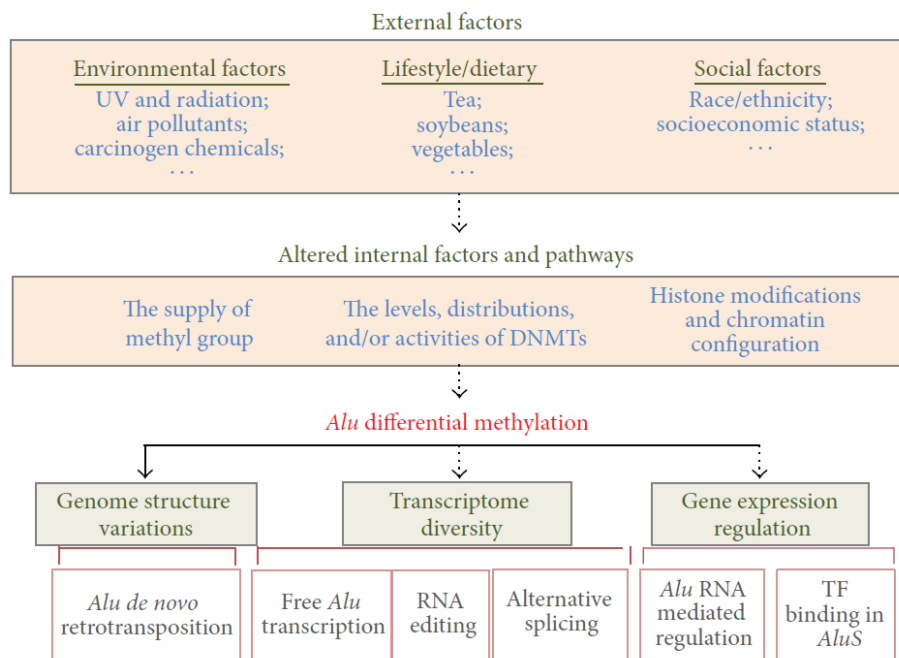
ภาพที่ 3 Alu structure and mechanism (A) โครงสร้างทางพันธุกรรมของ Alu elements โดยที่ปลาย 3' end จะมี long A tail เป็นตำแหน่งที่สำคัญสำหรับการ mobilization ของ poly-A binding protein (PABP) บน RNA ของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu นอกจากนี้ส่วนกลางจะมี A rich region ที่แบ่งครึ่งระหว่าง dimer structure ของ Alu elements และจะไม่มีลำดับเบสที่เป็น terminator sequence (TTTT) โดยอาศัย terminator sequence ในบริเวณใกล้เคียงแทน (B) โครงสร้าง RNA ของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu เป็นโครงสร้างลักษณะ dimer structure และมีการ mobilization ของโปรตีนตัวสำคัญที่ในการ transposition ของ Alu elements เช่น RNA SRP9/14 heterodimer และ PABP ซึ่งจะช่วยให้อลู RNA นั้นไปรวมตัวกับ ribosome ที่มี ORF2p (translated มาจาก LINE-1 sequence) (C) Target-primed reverse transcription mechanism Alu RNA ที่รวมตัวกับโปรตีนต่างๆ และ ribosome จะนำพา ORF2p ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น endonuclease activity ตัดจำเพาะกับบริเวณ T rich region ในบริเวณดีเอ็นเอซึ่ง T-rich นี้จะกลายเป็น target-primer สำหรับกระบวนการ reverse transcription โดย ORF2p ที่ยังมีคุณสมบัติเป็น reverse transcriptase ที่เป็นการ copy Alu RNA ลงบนบริเวณนั้น (Deininger, 2011)

### 2.4.3 ความสำคัญของระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements

ปัจจุบัน Alu elements มีการเพิ่มจำนวนและแทรกตัวในบริเวณใหม่ของจีโนมอยู่เรื่อยๆ และซึ่งการแทรกตัวสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ โดยมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นและการแทรกตัวของ Alu ในตำแหน่งใหม่จะเกิดทุก 1 ใน 20 ของประชากรกำเนิดใหม่ และทำให้เกิดโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมมากถึง 1,000 โรคในปัจจุบัน (Luo et al., 2014; Xing et al., 2009) ลักษณะการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมของ Alu elements เกิดได้หลายรูปแบบเช่น การแทรกตัวของ Alu ลงในส่วนที่สำคัญของยีนอย่าง exon ของยีนทำให้เกิด insertion mutation หรือรบกวนการ alternative splicing ของยีนโดยการแทรกที่ intron แล้วทำให้เกิด exon ใหม่ขึ้นเรียกว่า exonization ส่งผลต่อรูปแบบ transcriptome ภายในเซลล์ (Sorek, Ast, & Graur, 2002) นอกจากนั้นการศึกษาของ Mbarek และคณะยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสของ Alu elements ที่อยู่ใน intron 27b ของยีน Neurofibromatosis type 1 (NF1) มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม ยิ่งไปกว่านั้น Fruhmesser และคณะได้ใช้เทคนิค next-generation sequencing ในการวิเคราะห์ลำดับเบสของผู้ป่วยที่มีการพัฒนาการล่าช้าและมีลักษณะทางพฤติกรรมคล้ายผู้ป่วยโรคออทิซึม และพบว่าผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจะมีความผิดปกติของลำดับเบสของ AluS subfamilies ในบริเวณ intron 1 (disruption) ของยีน exocyst complex component 6B (EXOC6B) (Fruhmesser et al., 2013; Mbarek et al., 1999) ในขณะเดียวกัน หากการแทรกตัวของ Alu ถึงแม้ว่าจะไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการมิวเทชันของยีน แต่การแทรกตัวเกิดขึ้นบริเวณข้างเคียงของยีนก็สามารถที่จะรบกวนหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ โดยที่ Alu elements ที่แทรกตัวอยู่อาจกลายเป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออก (gene regulatory elements) ของยีน หรือการแสดงออกของ Alu บริเวณ promoter อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนในบริเวณนั้น โดย J. Wu และคณะพบว่าการแสดงออกของ Alu elements ที่แทรกตัวอยู่ในบริเวณ promoter ของยีน epsilon-globin gene จะรบกวนการแสดงออกของยีน (Wu, Grindlay, Bushel, Mendelsohn, & Allan, 1990) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจำเพาะต่อ transcription factors ต่าง ๆ ที่มาจับและสามารถที่จะควบคุมการแสดงออกของ Alu elements และยีนในบริเวณที่ Alu elements แทรกตัวอยู่ได้ (Hambor, Mennone, Coon, Hanke, & Kavathas, 1993)

จากหลักฐานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า Alu elements มีบทบาทต่อ genome และ transcriptome ที่ระดับ Alu elements DNA และ RNA ซึ่งกลไกปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันที่เกิดขึ้นบนลำดับเบสของ Alu elements เป็นกลไกที่ควบคุมหรือยับยั้งการทำงานของ Alu elements (ภาพที่ 4) โดยมีการศึกษาที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันที่ตำแหน่ง internal

promoter ของ Alu elements (B box) จะรบกวนจับของ RNA Pol III และยับยั้งกระบวนการแสดงออกของ Alu elements ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ Alu elements จะทำให้มีปริมาณของ Alu RNA สะสมเพิ่มมากขึ้นและทำให้เกิดกระบวนการ de novo retrotransposition (Kochanek, Renz, & Doerfler, 1995; Sigurdsson, Smith, Bjornsson, & Jonsson, 2012; Yoder, Walsh, & Bestor, 1997) นอกจากนี้ Alu elements ยังมีบทบาทในระดับ RNA อีกด้วย โดย Alu RNA สามารถส่งผลกระทบต่อความหลากหลายของ transcriptome ภายในเซลล์ (transcriptome diversity) ผ่านกลไกการทำงานของ RNA splicing และ RNA editing โดยพบว่าใน mRNA ที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ 2 copies จะทำให้เกิดการจับกันเป็น Alu sense และ antisense จนเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ Adenosine-to-inosine RNA editing ขึ้นโดยผลจากการ editing ทำให้ Alu ทั้งสองจับกันเป็น stable double-strand RNA (dsRNA) ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า dsRNA ของ Alu elements สามารถที่จะไปควบคุมการแสดงออกของยีนได้ และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของ transcriptome เช่นเดียวกับกระบวนการ RNA splicing ที่พบว่าในลำดับเบสของ Alu elements จะมีตำแหน่งที่ทำให้เกิดการ splicing ได้ (L. L. Chen, DeCerbo, & Carmichael, 2008; Cook et al., 2013; Levanon et al., 2004; Sinnett, Richer, Deragon, & Labuda, 1991)



ภาพที่ 4 ความสำคัญของระดับเมธิเลชันของ Alu elements ต่อกลไกทางอณูชีววิทยาภายในเซลล์ (Luo et al., 2014)

ในจีโนมมีบทบาทต่อกลไกทางอณูชีววิทยาของเซลล์ทั้งระดับ DNA และ RNA ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ Alu elements ในจีโนมจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการทำงานของเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษาในระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมมาก่อน ดังนั้นทางคณะผู้ทำการวิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าเซลล์จากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมอาจมีระดับเมธิเลชันของ Alu elements ที่ผิดปกติ และเกี่ยวข้องกับรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (Hu, Sarachana, et al., 2009) ซึ่งการศึกษานี้จะทำให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของเมธิเลชันของ Alu elements ต่อกลไกการเกิดโรคหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมได้ดีขึ้น นอกจากนี้อาจใช้ระดับเมธิเลชันของ Alu elements เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัมต่อไปในอนาคต



### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง และโมเดลที่ใช้ในการศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

##### 3.1.1 Lymphoblastoid cell lines

เซลล์ไลน์ชนิด lymphoblastoid เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจาก mononuclear cells ของผู้ป่วยโรคออทิซึมและคนปกติด้วยวิธี Epstein Barr virus (EBV) infection ทำให้เซลล์ไลน์มีคุณสมบัติที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องทดลอง โดยในการศึกษานี้ได้รับ การอนุเคราะห์เซลล์ไลน์จากศาสตราจารย์ ดร.Valerie W Hu มหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดีซี ซึ่งเซลล์เหล่านี้ได้ผ่านการคัดกรองโดยหลักการที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้ว และเคยใช้ในการศึกษาทางด้านโอมิกส์มาก่อน (Hu, Sarachana, et al., 2009) ซึ่งพบว่าเซลล์ที่พัฒนามาจากผู้ป่วยนั้นมีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างจากคนปกติ และยังพบว่าความผิดปกติที่เกิดขึ้นนั้นสอดคล้องกับพยาธิสภาพบางอย่างที่เกิดขึ้นในสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม นอกจากนั้นการศึกษาทางด้านกลไกควบคุมยีนแบบเอพิเจเนติกส์ อย่างเช่น DNA methylation โดยใช้เซลล์ไลน์นี้ยังแสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจะมีระดับ DNA methylation แตกต่างจากคนปกติในหลาย ๆ บริเวณของจีโนม

##### 3.1.2 ลักษณะของกลุ่มตัวอย่างสำหรับการทดลอง

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้คือเซลล์ไลน์ที่ผ่านกระบวนการจัดจำแนกผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มโดย Hu, W. H และ Steinberg, M. E โดยเริ่มจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแบบโปรแบนด์ (autistic probands) จำนวน 1,954 รายถูกจัดกลุ่มเป็น 4 กลุ่มได้แก่ Severe Language type (L) Mild type (M) Intermediate (I) และ Savant type (S) ซึ่งแบ่งด้วยวิธี clustering analysis โดยใช้ข้อมูลจากพฤติกรรมของผู้ป่วย 123 ประการในชุดแบบสอบถาม ADI-R ซึ่งเป็นแบบสอบถามที่แพทย์ผู้เชี่ยวชาญใช้ในการวินิจฉัยโรคออทิซึมในสหรัฐอเมริกาและประเทศที่พัฒนาแล้วอื่น ๆ ทั่วโลก จากนั้นได้ทำการคัดแยกผู้ป่วยที่มี cognitive impairment (Raven's scores <70), ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมชัดเจน (Fragile X, Rett, tuberous sclerosis, chromosome 15q11-q13 duplication), ผู้ป่วยที่คลอดก่อนกำหนด (<35 สัปดาห์), และผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยโรคจิตประสาทที่เป็น comorbid disorders ของออทิซึม (bipolar disorder, obsessive compulsive disorder, severe anxiety) ออกไป คงเหลือไว้แต่ผู้ป่วยที่เป็นออทิซึมแบบ idiopathic ซึ่งเป็นผู้ป่วย

ส่วนใหญ่ การจัดกลุ่มนี้ทำให้ช่วยจำแนกผู้ป่วยออทิซึมแบบ idiopathic ออกเป็นกลุ่มย่อย (subgroups) ตามการแสดงทางคลินิก (clinical phenotypes) (Hu & Steinberg, 2009) และช่วยลดความหลากหลายทางชีวพยาธิสภาพลง ซึ่งกลยุทธ์นี้นอกจากทำให้เพิ่มพลังทางสถิติ (statistical power) ในการวิเคราะห์แล้ว ยังช่วยทำให้สามารถบ่งชี้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะของแต่ละกลุ่มย่อยของผู้ป่วยโรคออทิซึมอีกด้วย สำหรับการศึกษานี้จะใช้เซลล์ไลน์ของผู้ป่วยจาก 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความผิดปกติด้านภาษา หรือ Severe Language type (L) กลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงปานกลางหรือ Mild type (M) และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความสามารถพิเศษ หรือ Savant type (S) ทั้งหมด 26 ราย และจากคนที่ไม่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม 20 ราย รวมทั้งสิ้น 56 ราย ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่ผ่านการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์มาแล้ว (Hu, Sarachana, et al., 2009) เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาขนาดเล็กจึงจะเลือกใช้เฉพาะเพศชายเพื่อลดความซับซ้อนอันเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างเพศ ทั้งนี้ที่เลือกเพศชายนั้น เพราะเป็นที่ทราบกันว่าออทิซึมเป็นโรคที่เกิดในเพศชายมากกว่าเพศหญิง

### 3.2 การเก็บรวบรวม และคัดเลือกข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Data collection for Bioinformatics analysis)

#### 3.2.1 การเก็บรวบรวมข้อมูลรูปแบบการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออลิซึมสเปกตรัม

เพื่อศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออลิซึมสเปกตรัมที่มีการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าในเลือดของผู้ป่วยออลิซึมสเปกตรัมจะมีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างจากคนปกติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการรวบรวมข้อมูลของรูปแบบการแสดงออกของยีน (Gene expression profiles) จากการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับออลิซึมสเปกตรัม ในฐานข้อมูลของ Gene Expression Omnibus (GEO DataSets : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) โดยการศึกษานี้ถูกคัดเลือกจะต้องเข้าหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ดังต่อไปนี้คือ ต้องเป็นการการศึกษาที่ใช้ตัวอย่างเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากส่วนประกอบของเลือดจากผู้ป่วยออลิซึมสเปกตรัมในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค microarrays และมีขนาดกลุ่มตัวอย่างไม่น้อยกว่า 40 ตัวอย่าง

ข้อมูลที่รวบรวมมาจากฐานข้อมูลของ GEO DataSets ประกอบด้วยไฟล์ข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีน หรือเรียกว่า GSE files ซึ่งมีเลขเฉพาะ (GSE number) สำหรับแต่ละข้อมูล และไฟล์ที่เกี่ยวข้องกับ platform ของชุดทดลอง microarrays ที่ถูกใช้ในการศึกษานั้นได้แก่ matrix files หรือ GPL files (Barrett et al., 2011; Edgar, Domrachev, & Lash, 2002)

#### 3.3.2 การรวบรวมรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของยีน

ยีนที่มี Alu elements แทรกตัวภายในยีน หรือ Gene containing Alu หมายถึงยีนที่มี Alu elements เป็นส่วนหนึ่งใดส่วนหนึ่งของยีน ได้แก่ promoter intron exon หรือการแทรกตัว Alu elements ใน intron แล้วทำให้เกิดเป็น exon ใหม่ เรียกว่า exonization โดยในการศึกษานี้ได้ทำการรวบรวมรายชื่อยีนจากฐานข้อมูล TranspoGenes Database (<http://transposgene.tau.ac.il>) ซึ่งเป็นรายชื่อยีนของจีโนมมนุษย์เวอร์ชัน 18 (Human Genome 18 or hg18) ประกอบด้วยรายชื่อยีนที่ Alu elements แทรกตัวอยู่ในบริเวณต่าง ๆ ของยีนทั้ง 4 รูปแบบ (Alu insertion type) ได้แก่ exonic, exonized, intronic และ promoter (Levy, Sela, & Ast, 2008) และลำดับเบสของ Alu elements รวบรวมจากฐานข้อมูล Repbase (Bao, Kojima, & Kohany, 2015)



3.3 การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนเพื่อหาความเกี่ยวข้องของ Alu elements กับการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม Connection up and down-regulation expression analysis for microarrays (CU-DREAMx)

CU-DREAMx เป็นเครื่องมือทางชีวสารสนเทศสำหรับการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค microarrays ซึ่งโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ด้วยตัวสถิติแบบ t-test ของแต่ละยีนโดยเปรียบเทียบค่า mean ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมว่ายีนมีการแสดงออกมากผิดปกติ หรือน้อยกว่าปกติ จากนั้นจะหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ผิดปกติ กับรายชื่อยีนที่เราต้องการศึกษาหาความสัมพันธ์ โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Pearson's chi-squared test (Aporntewan & Mutirangura, 2011) ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ CU-DREAMx จะถูกนำมาช่วยในการคัดเลือกยีนที่มีการแทรกตัวของ Alu elements ภายในยีนและยีนมีการแสดงออกที่ผิดปกติทั้งในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม

ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์

ไฟล์สำหรับโปรแกรม CU-DREAMx โดยดาวน์โหลดจาก

<http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~achatcha/CU-DREAM/>

- a. CU-DREAMx application file
- b. Template file

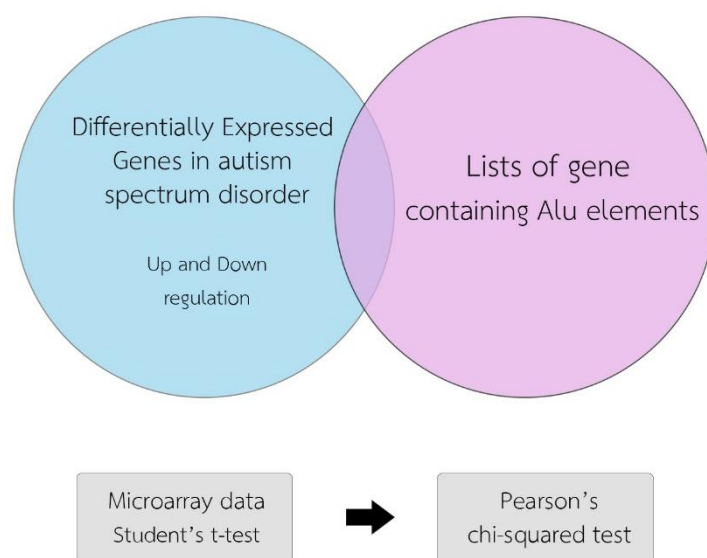
รายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ทั้ง 4 รูปแบบจากฐานข้อมูล Transposgene Database

- a. Alu elements\_ Exonized\_ hg18 positions
- b. Alu elements\_ Exonic\_ hg18 positions
- c. Alu elements\_ Intronic\_ hg18 positions
- d. Alu elements\_ Promoter\_ hg18 positions

ข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค microarrays จากฐานข้อมูล GEO DataSets

### วิธีการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx

กำหนดค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่าง ๆ ที่ template file.xlsx ของโปรแกรม CU-DREAMx โดยเลือกตัววิเคราะห์ทางสถิติเป็น t-test และเลือก parameter เป็น 2-tail distribution, 2 series with unequal standard deviation ที่ระดับนัยสำคัญ p-value เท่ากับ 0.05 และเลือกให้วิเคราะห์แบบ up หรือ down expression หลังจากนั้นกำหนดกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มทดลอง (experiment groups) หรือกลุ่มผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมของไฟล์ข้อมูลการแสดงออกของยีนจากงานวิจัยนั้น ๆ



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของโปรแกรม CU-DREAMx

### 3.4 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยตัววิเคราะห์ทางสถิติสำหรับเทคนิค microarrays (Significant Analysis of Microarrays, SAM)

SAM เป็นตัววิเคราะห์ข้อมูลสำหรับผลการทดลองจากเทคนิค microarrays ซึ่งในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression profile) เพื่อค้นหายีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลอง ในการศึกษานี้ผู้ทำวิจัยได้นำ SAM มาใช้วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนของ LCLs โดยข้อมูลที่ได้จาก SAM จะมีความน่าเชื่อถือสูงกว่าการใช้ตัวสถิติทั่วไป ซึ่งข้อมูลที่ได้จาก SAM จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับผลของ CU-DREAMx ของทั้ง 56 LCLs อีกครั้งด้วยโปรแกรม Multi-Experiment Viewer (microarray software suite)

#### วิธีการวิเคราะห์ SAM

1. นำไฟล์ข้อมูลการแสดงออกของยีน (GSE file) อัปโหลดลงในโปรแกรม Multi-Experiment Viewer (microarray software suit, [www.tm4.org](http://www.tm4.org))
2. กำหนดค่า cutoff ของการวิเคราะห์ที่ 70% โดยเป็นการเลือกข้อมูลของยีนที่มีข้อมูลการแสดงออกในตัวอย่างมากกว่า 70% เท่านั้นมาใช้ในการวิเคราะห์ ยีนที่ไม่มีข้อมูลการแสดงออกจะถูกตัดออกไป
3. ดำเนินการวิเคราะห์โดยเลือกที่ Significant analysis of microarray (SAM) และทำการกำหนดกลุ่ม Experiments และ controls
4. เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเสร็จสิ้นแล้ว ทำการเลือกข้อมูลที่วิเคราะห์ได้โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นของข้อมูลที่ 5% และ 10% FDR หมายถึงในรายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ นั้นจะมียีนอย่างน้อย 5% หรือ 5 ยีน จาก 100 ยีนที่ได้ไม่มีการแสดงออกที่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมจริง
5. รายชื่อยีนที่ได้จะถูกนำไปพิจารณากับรายชื่อยีนที่ได้จาก CU-DREAMx เพื่อใช้ในการคัดเลือกยีนสำหรับการทดสอบยีนด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR เพื่อยืนยันระดับการแสดงออกของยีน

### 3.5 การวิเคราะห์เพื่อหา biological functions และ gene regulatory networks ของยีนที่แสดงออกผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับ Alu elements ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Inc.,) เป็น software application ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้าน omics เช่น genomics, transcriptomics, proteomics และ metabolomics โดย IPA สามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่มีอยู่เพื่อหา regulators, relationships, function และ pathways เพื่ออธิบายถึงรูปแบบความสัมพันธ์ข้อมูล โดยอาศัยองค์ความรู้ข้อมูลจากฐานข้อมูล biological systems ที่มีอยู่ ซึ่งการใช้ IPA จะช่วยให้ในการทำนายหาเป้าหมายการทำงานของยีน โปรตีน และสารเคมีต่าง ๆ ได้ นอกจากนั้นยังช่วยทำนายหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล กับการเกิดโรคต่างๆ (disease processes and mechanisms) ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงบทบาทความสำคัญของข้อมูลจำนวนมากที่ปรากฏจนสามารถพัฒนาองค์ความรู้ และสมมติฐานใหม่ๆ ขึ้นมา

ในงานวิจัยนี้จะใช้โปรแกรม IPA ในการทำนาย biological functions และ gene regulatory networks ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และมี Alu elements แทรกตัวอยู่ในยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Alu elements และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดย Fisher's exact tests ที่ระดับนัยสำคัญ  $P\text{-value} < 0.05$

### 3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ lymphoblastoid

เซลล์ lymphoblastoid cell lines (LCLs) ทั้ง 56 เซลล์ไลน์จะถูกเพาะเลี้ยงตามวิธีที่ได้ตีพิมพ์แล้ว ตามระเบียบวิธีการซึ่งแนะนำโดย Rutgers University Cell and DNA Repository ผู้ผลิตและดูแลรักษาเซลล์ใน Autism Genetic Research Exchange (AGRE) collection โดยเซลล์ไลน์ LCLs จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่มีส่วนผสมได้แก่ fetal bovine serum 15% และ penicillin/streptomycin 1% หลังจากดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะถูกเก็บรักษาใน RNAlater (Life Technologies) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยคงสภาพสารพันธุกรรมจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ตามกระบวนการวิเคราะห์ลำดับต่อ ๆ ไป

3.6.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์จะทำใน biological safety cabinet class II โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 จำนวน 9 ml ใน culture flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25) แล้ว incubate ในตู้อบเลี้ยงเซลล์เพื่อปรับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำ LCLs จากไนโตรเจนเหลวที่ผ่านการละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่ลงใน culture flask โดยการปิเปตลงที่ก้นของ flask และเขย่าเบาๆ แล้วนำไป incubate ที่ตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.2 เมื่อครบเวลาจึงทำการเปลี่ยน culture flask เป็นขนาด 75 ตารางเซนติเมตรโดยปิเปตเซลล์จำนวน 8 ml ลงใน culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 12 ml เป็นปริมาตรทั้งหมด 20 ml และนำไปอบเลี้ยงต่อไป ซึ่งจะต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองโดยจะทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไปจน 3 สัปดาห์จึงจะทำการเก็บเซลล์

3.6.2 ทำการเก็บเซลล์ไว้ที่ น้ำยา RNAlater เพื่อเก็บรักษาสารพันธุกรรม โดยนำไปเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส และเก็บเซลล์ไว้ในไนโตรเจนเหลวสำหรับการทดลองอื่นๆ จะใช้ freezing medium ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 90 ml ต่อ 10 ml ตามลำดับ

### 3.7 การสกัดดีเอ็นเอและ อาร์เอ็นเอ (DNA and RNA Extraction)

เซลล์ที่เก็บรักษาใน RNAlater solution จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอโดยใช้น้ำยา Genezol ปริมาณ 1 ml ใส่ลงในหลอดที่มีเซลล์แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเปิด chloroform จำนวน 0.2 ml ลงไปแล้วปิดฝาให้แน่นก่อนทำการเขย่าด้วยมือ 15 นาที และนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นจะทำให้สารภายในหลอดแยกออกเป็น 3 ชั้นโดยชั้นล่างสุดจะเห็นเป็นสีชมพูเป็นชั้นของโปรตีน ชั้นกลางจะเห็นเป็นสีขาวบาง ๆ เป็นชั้นของ DNA และชั้นบนสุดเป็นของเหลวสีใสเป็นชั้นของ RNA ซึ่งแต่ละชั้นของสารละลายจะใช้ปิเปตแบ่งออกไปทำการสกัดตามขั้นและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

#### 3.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ดำเนินการแยกชั้นกลางที่มีดีเอ็นเออยู่ออกมาแล้วเติมด้วย 100% ethanol ปริมาณ 0.3 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที จึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดย DNA pellet ที่ได้นำมาล้างโดยการเติม 0.1% sodium citrate ใน 10% ethanol จำนวน 1 ml ทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูด supernatant ทิ้งไป และทำการล้างซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากล้างเสร็จเรียบร้อยแล้วเปิดสาร 75% ethanol ปริมาณ 1.5-2 ml ผสมกับ DNA pellet ทิ้งไว้ 10-20 นาที (stopping point DNA) จากนั้นนำไปปั่นตกและนำ DNA pellet มา air dry เป็นระยะเวลา 5-10 นาที ก่อนที่จะ resuspension ด้วย 8 mM NaOH จำนวน 0.3-0.6 ml และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

#### 3.7.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

ชั้นบนที่เป็นของเหลวสีใสที่แยกโดยใช้ TRIzol reagent จะถูกแยก และเติมด้วย 100% isopropanol จำนวน 0.5 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปปั่น 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ RNA pellet มาทำการล้างด้วย 75% ethanol จำนวน 1 ml ทำการ vortex และนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,500 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นำ RNA pellet ที่ล้างแล้วมา air dry ประมาณ 5-10 นาที จากนั้น resuspension ด้วย Rnase-Free water และนำ incubate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-15 นาที ก่อนที่จะทำการเก็บรักษา RNA ไว้ที่ -70 องศาเซลเซียสสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

### 3.8 การศึกษาระดับปฏิบัติการเมธิเลชันของ AluS subfamilies ด้วยเทคนิค Combine Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

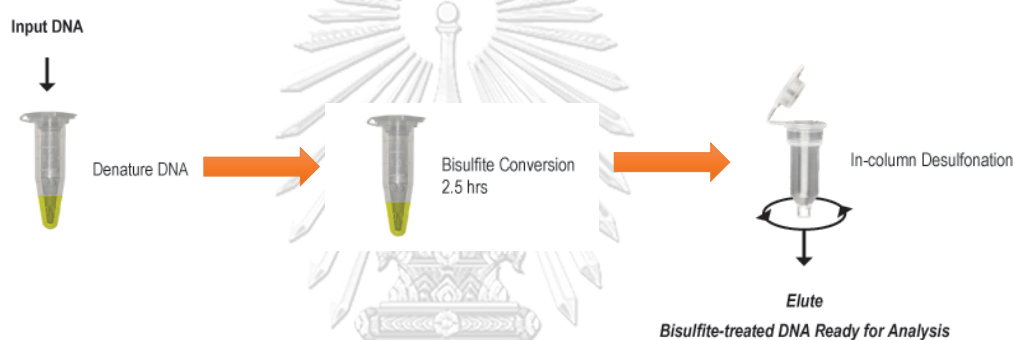
Combine bisulfite restriction analysis (COBRA) จัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชัน โดยดีเอ็นเอจะถูกนำไปทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ (bisulfite treatment) แล้วเกิดปฏิกิริยา deamination ที่เบส Cytosine (C) ของดีเอ็นเอเปลี่ยนเป็นเบส Uracil (U) ในขณะที่เบส C ที่มีหมู่เมธิล ( $\text{CH}_3$ ) จากปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันจะไม่เกิดปฏิกิริยา deamination เมื่อทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ทำให้ลำดับเบสของดีเอ็นเอหลังจากทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ของดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันและไม่เกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันมีความแตกต่างกัน หลังจากนั้นดีเอ็นเอที่ถูกทำปฏิกิริยาจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้เป็นดีเอ็นเอท่อนขนาดต่าง ๆ กันโดยขึ้นอยู่กับเบสที่เป็นบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงจากการทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์อย่างไร เช่นเบส C เปลี่ยนเป็น U แล้วทำให้เอนไซม์ไม่สามารถตัดในบริเวณนั้นได้ ซึ่งดีเอ็นเอแต่ละท่อนที่เกิดขึ้นซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างของระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันในแต่ละตัวอย่างได้

ในการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันด้วยวิธี COBRA จะประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนโดยเริ่มจากนำ DNA ที่สกัดมาทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ จากนั้น DNA ที่ถูกทำปฏิกิริยาแล้ว (treated DNA) จะถูกนำมาทำ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนโดยใช้ Specific primers ต่อบริเวณที่เราต้องการศึกษาระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันหลังจากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และทำการวิเคราะห์รูปแบบและระดับ DNA methylation จากขนาดของ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์บน Acrylamide gel electrophoresis

#### 3.8.1 การทำปฏิกิริยาไบซัลไฟต์กับ DNA (Bisulfite Conversion)

DNA ที่สกัดได้จากเซลล์ไลน์ปริมาณ 800 ng จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ด้วยชุดน้ำยา EZ DNA Methylation-Gold™ KIT (Zymo research corporation, Orange, CA, USA) เริ่มจาก CT conversion working reagent จำนวน 130  $\mu\text{l}$  ต่อปริมาตร DNA รวม 20  $\mu\text{l}$  จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 นาทีเพื่อเป็นการ denature double strand DNA และ 64 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับปฏิกิริยา bisulfite conversion จากนั้นดีเอ็นเอที่ถูกทำปฏิกิริยาแล้ว (treated DNA) จะถูกนำไป purify ทันทหรือเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำ purification ภายใน 20 ชั่วโมง ในขั้นตอนการ purify จะใช้ Zymo-Spin IC column โดยใส่ M-binding Buffer จำนวน 600  $\mu\text{l}$  ลงใน IC column จากนั้นนำ treated DNA ใส่ลงใน

IC column และนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000g เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้าง column ด้วย M-wash buffer จำนวน 100  $\mu$ l โดยปั่นตกเป็นเวลา 30 วินาที แล้วกำจัดสารไบซัลไฟต์ที่หลงเหลืออยู่โดยเติม M-desulphonation buffer จำนวน 200  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาทีก่อนนำไปปั่นตกเป็นเวลา 30 วินาที และทำการล้าง column อีกครั้งด้วย M-wash buffer จำนวน 200  $\mu$ l โดยล้างซ้ำ 1 ครั้งหรือมากกว่านั้น สุดท้ายทำการปั่นเพื่อ elute DNA ลงสู่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml โดยใช้ M-elution buffer จำนวน 10  $\mu$ l โดยการปั่นที่ความเร็ว 12,000g หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของ bisulfite-treated DNA โดยการเติมน้ำ 10  $\mu$ l จะทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 40 ng/ $\mu$ l คำนวณจาก DNA ตั้งต้นและเก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 Bisulfite Conversion แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของ DNA กับสารไบซัลไฟต์ หลังจากนั้นทำการ purify bisulfite-treated DNA ด้วย column ชนิดพิเศษของ Zymo research corporation, Orange, CA, USA



### 3.8.2 PCR สำหรับดีเอ็นเอเคลือบที่ AluS subfamilies

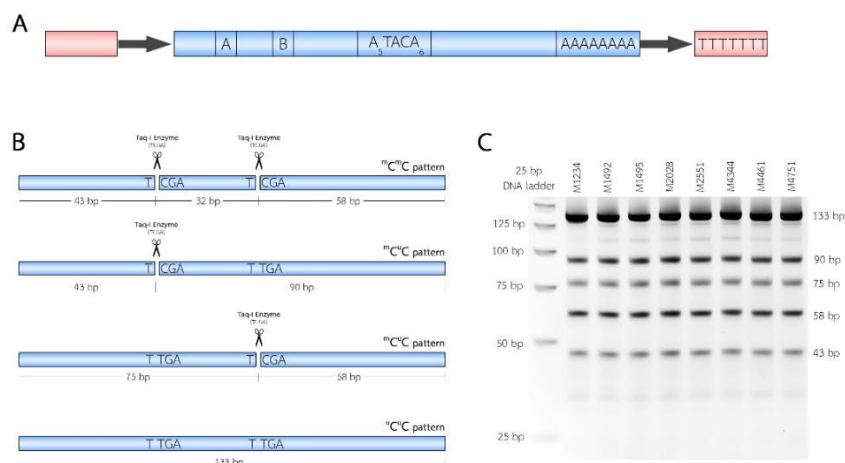
ดีเอ็นเอที่ถูกทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ (bisulfite-treated DNA) ปริมาณ 40 ng ถูกนำมาเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยา PCR ด้วย specific primers สำหรับ human Alu S subfamilies methylated sequence ที่จำเพาะกับลำดับเบส AluS subfamilies ได้แก่ Alu Forward primer 5'- GGRGRGGTGGTTTARGTTTGTA -3' และ AluS subfamilies Reverse primer 5'- CTAACTTTTATATTTTAATAAAAACRAAATTCACCA -3' โดยกำหนดปฏิกิริยา PCR ดังนี้ pre-denature 95 องศาเซลเซียส 15 นาที และตามด้วยปฏิกิริยา 45 รอบ ของ denature ที่ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที annealing ที่ 63 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที หลังจากครบ 45 รอบดังกล่าวตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 7 นาที หลังจากนั้น Alu PCR products ที่ได้จะนำไปดำเนินการตัดด้วย taqI enzyme ต่อไป (ทำตารางแสดง reaction)

### 3.8.3 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Enzyme digestion) และ Gel electrophoresis

เตรียมเอนไซม์ taqI working reagent โดยใช้ taqI enzyme ความเข้มข้น 10 U/L จำนวน 0.2 µl ผสมกับ taqI buffer 1.5 µl และ DEPC-treated water จำนวน 3.3 ul รวมปริมาตรทั้งหมด 5 ul ต่อหนึ่งปฏิกิริยา จากนั้นผสม working reagent กับ Alu PCR amplicons และนำไป incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง นำ Alu PCR amplicons ที่ถูกตัดเรียบร้อยแล้วมาทำ gel electrophoresis ใน 8% acrylamide gel ที่ 110V เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ DNA ladder ขนาด 25 bp และใช้ bromophenol blue เป็น loading dye

### 3.9 การคำนวณระดับและรูปแบบของดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu (Alu methylation level and pattern analysis)

Alu PCR amplicons จากเทคนิค COBRA หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ taqI ที่มีตำแหน่ง recognition site และตัดดีเอ็นเอบริเวณ CpG สองตำแหน่งในบริเวณ promoter ของ AluS subfamilies ได้เป็นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับรูปแบบปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ CpC ทั้งสองตำแหน่งของ AluS subfamilies โดยการวิเคราะห์รูปแบบของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน (DNA methylation) วิเคราะห์ได้จากปริมาณท่อนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่ถูกตัดด้วย taqI โดย Alu PCR amplicons จะถูกตัดได้ดีเอ็นเอขนาดต่างกันทั้งหมด 6 ท่อน (ภาพที่ 7) ดังนี้ 133, 90, 75, 43 และ 32 bp โดย ดีเอ็นเอท่อนที่มีขนาด 133 bp เป็นตัวแทนของการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันแบบ Hypomethylation ( ${}^U C^U C$ ) ดีเอ็นเอขนาด 90 และ 43 bp เป็นตัวแทนของการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันแบบ partial methylation ( ${}^m C^U C$ ) ดีเอ็นเอขนาด 75 และ 58 bp เป็นตัวแทนของการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันแบบ partial methylation ( ${}^U C^m C$ ) และดีเอ็นเอขนาด 32 bp จะเป็นตัวแทนของการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันแบบ Hypermethylation ( ${}^m C^m C$ ) การวิเคราะห์ผลจาก gel จะทำโดยการวัด band intensity ด้วยโปรแกรม Gel analyzer ซึ่งจะวัดแต่ละ band ออกมาเป็นร้อยละโดยเปรียบกับ band ของดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กันดังที่กล่าวมาข้างต้นภายในดีเอ็นเอตัวอย่างเดียวกัน เดียวกันบน gel เป็นการทำให้ normalization ข้อมูลก่อนจะนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ



ภาพที่ 7 โครงสร้าง และการวัดระดับเมธิเลชันของ Alu elements. (A) แสดงโครงสร้างของ Alu elements ที่ประกอบไปด้วยส่วน A และ B box ที่ทำหน้าที่เป็น promoter (B) แสดงตำแหน่งการตัด (Restriction Site) ของเอนไซม์ taq I บน promoter ของ AluS subfamilies ในตำแหน่งต่าง ๆ ตามรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน (DNA methylation pattern) ได้เป็น DNA fragment ขนาด 90, 75, 43 และ 32 bp ตามลำดับ (C) แสดงภาพ gel ตัวอย่างจากวิธีการ COBRA

การวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันจะถูกคำนวณออกมาเป็นร้อยละของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน (percentage of DNA methylation) และรูปแบบของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันบนเบส C ทั้งสองตำแหน่ง (Frequency of DNA methylation pattern) ตามหลักการและวิธีวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ไว้โดย Tiwawech (Tiwawech et al., 2014) ซึ่งการคำนวณจะกำหนดตัวแปรดังนี้ A=%band ของดีเอ็นเอขนาด 90 bp ทารด้วย 90, B=%band ของดีเอ็นเอขนาด 58 bp ทารด้วย 58, C=%band ของดีเอ็นเอขนาด 75 bp ทารด้วย 75, D=%band ของดีเอ็นเอขนาด 90 bp ทารด้วย 90, E=%band ของดีเอ็นเอขนาด 43 bp ทารด้วย 43, F=%band ของดีเอ็นเอขนาด 32 bp ทารด้วย 32 หรือเท่ากับ (B+E) – (A+C) หลังจากนั้นตัวแปรดังกล่าวจะถูกนำมาคำนวณ %Alu methylation ดังสมการข้างล่าง จากนั้นค่าที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

ตารางที่ 2 สมการการคำนวณระดับดีเอ็นเอเมธิเลชัน และรูปแบบเมธิเลชัน CpG 2 ตำแหน่งบน AluS subfamilies จากเทคนิค COBRA

Percentage of Pattern	Formula
Methylated loci (% <sup>m</sup> C)	$100 \times (E+B) / (2A+E+B+C+D)$
Hypermethylated loci (% <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C)	$100 \times F / (A+C+D+F)$
Partially methylated loci (% <sup>u</sup> C <sup>m</sup> C)	$100 \times C / (A+C+D+F)$
Partially methylated loci (% <sup>m</sup> C <sup>u</sup> C)	$100 \times D / (A+C+D+F)$
Hypomethylated loci (% <sup>u</sup> C <sup>u</sup> C)	$100 \times A / (A+C+D+F)$

### 3.10 การวิเคราะห์ระดับแสดงออกของยีน และของ AluS subfamilies ด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR

เทคนิค Quantitative RT-PCR หรือ qRT-PCR นำมาใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งหลักการวิเคราะห์ของ qRT-PCR เริ่มจาก RNA ที่สกัดได้ทั้งหมดจะถูกนำมาทำปฏิกิริยา DNase treatment ก่อนที่จะเปลี่ยนให้เป็น cDNA ด้วยกระบวนการ reverse transcription (AccuPower® RT PreMix) หลังจากนั้น cDNA ที่ได้จะถูกใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา specific real-time PCR ต่อไปโดยใช้ SYBR Green dye เป็นตัว reporter กับ ROX dye เป็น passive dye จากชุดน้ำยาและ AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix

#### 3.10.1 การย่อยสลาย DNA ที่ปนเปื้อน (DNase treatment)

RNA ที่สกัดจากเซลล์ไลน์ปริมาณ 5 µg นำมาทำปฏิกิริยากับ DNase enzyme เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของ DNA โดยใช้ น้ำยา RQ1 RNase-free DNase (Promega) 1 Unit/µl ต่อ RNA ปริมาณ 1 µg และ RQ1 buffer ที่ปฏิกิริยารวม 10 µl จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 30 นาที เสร็จแล้วทำการเติม RQ1 DNase stop solution จำนวน 1 µl แล้วนำไป incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RQ1 DNase เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนจึงนำ DNase-treated RNA ไปทำการสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

#### 3.10.2 การสังเคราะห์ cDNA (Reverse Transcription)

DNase-treated RNA ปริมาณ 1000 ng จะถูกนำมาผสมกับ Oligo T<sub>18</sub> primers ปริมาณ 0.5 µg หรือ 100 pmole แล้วเติม DEPC-treated water ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 10 µl แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายลงน้ำแข็งทันที และนำส่วนผสม DNase-treated RNA กับ Oligo T<sub>18</sub> ใส่ลงใน AccuPower® RT PreMix tube ที่ภายในมีเอนไซม์ RTase สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription โดยละลายตะกอน lyophilized pellet ของ RTase ด้วยการ DEPC-water เพื่อปรับปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมดให้เท่ากับ 20 µl จากนั้นนำไป vortex จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการนำส่วนผสมทั้งหมดไป incubate ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์ cDNA ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 5 นาทีเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RTase (RTase inactivation) สุดท้ายทำการเติม DEPC-water เพื่อให้มีปริมาตรรวม

เท่ากับ 50 ul จะทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ cDNA โดยประมาณ 20 ng/ $\mu$ l สำหรับการทำให้ Realtime PCR ต่อไป

### 3.10.3 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

cDNA ปริมาณ 1  $\mu$ l หรือประมาณ 20 ng ใช้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ AluS subfamilies โดยใช้ GAPDH เป็นยีน internal control gene สำหรับการ normalization ค่า Threshold Cycle (Ct value) ของยีน ซึ่งทำโดยใช้ชุดน้ำยา AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix ที่มี Sybr Green dye เป็นตัว reporter กับ ROX dye เป็น passive dye โดยกำหนดปฏิกิริยา PCR ดังนี้ pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 40 รอบปฏิกิริยาของขั้น denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที และขั้น Annealing/Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที เมื่อครบ 40 รอบจะเป็นขั้นตอนการทำ melting curve ที่ใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 64-95 องศาเซลเซียส ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ddCt method (relative expression)

ตารางที่ 3 รายละเอียดของ primers ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน และ AluS subfamilies ด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR

Genes	Primer Sequences	Annealing Temperature (°C)
GAPDH	Forward 5'-ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA-3' Reverse 5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'	60
Alu	Forward 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3' Reverse 5'-GTAGAGACGGGGTTTCACCA-3'	60
TRIM33	Forward 5'-CCAACACTACCAATCCCCGG-3' Reverse 5'-TCTCTTGTGTGTCTGCATAAACT-3'	60

### 3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

ในการวิเคราะห์ร้อยละของดีเอ็นเอเมธิเลชันของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ Alu (percentage of Alu methylation levels and patterns) ด้วยวิธี COBRA และการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ Alu elements จะใช้ independent t-test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มควบคุมที่ระดับนัยสำคัญ  $P\text{-value} < 0.05$  ต่อมา ROC analysis จะถูกใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมของระดับเมธิเลชันของ Alu elements นอกจากนี้ทำ correlation analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ Alu elements โดยคำนึงจากค่า R-squared ( $R^2$ )

สำหรับการวิเคราะห์โดย CU-DREAMx จะใช้ Student's t-test ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยเปรียบเทียบค่า mean ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม จากนั้นจะหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ผิดปกติ กับรายชื่อยีนที่เราต้องการศึกษาหาความสัมพันธ์ โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Pearson's chi-squared test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่  $P\text{-value} < 0.05$  และในการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม IPA เพื่อค้นหาหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีนจากฐานข้อมูลด้วย Fisher's exact tests ที่ระดับนัยสำคัญ  $P\text{-value} < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการศึกษาวิจัย

#### 4.1 ผลการรวบรวมข้อมูลชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูล

##### 4.1.1 ข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ศึกษาในเลือดของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม

เพื่อศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีนในเลือดของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม ผู้ทำวิจัยได้รวบรวมข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression profiling) จากการศึกษาด้วยวิธีต่าง ๆ ในฐานข้อมูลของ GEO DataSets โดยใช้หลักเกณฑ์ที่ได้กำหนดไว้ในระเบียบวิธีวิจัย และพบว่ามีทั้งหมด 5 งานวิจัยที่เข้าหลักเกณฑ์การคัดเลือก ซึ่งรายละเอียดของแต่ละงานวิจัยที่คัดเลือกมาได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ต่างรายงานว่าในตัวอย่างเลือด หรือ เซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมนั้นจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างจากกลุ่มคนปกติทั่วไป ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่ากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกตินี้มีความสอดคล้องกับพยาธิสภาพ หรือลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย อย่างเช่นลักษณะความผิดปกติทางด้านพฤติกรรมที่สามารถจำแนกได้ โดยในการศึกษาของ Dr. V W Hu และคณะ (GSE15402) ที่ใช้เซลล์ไลน์ LCLs ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วย และได้มีการแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยโดยใช้ข้อมูล ADI-R interview ซึ่งเป็นแบบประเมินพฤติกรรมเพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม มาใช้ในการแบ่งกลุ่มผู้ป่วย (clustering analysis) ออกเป็นสามกลุ่มตามลักษณะพฤติกรรมของแต่ละกลุ่ม ซึ่งผลการศึกษาของพบว่าในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ LCLs ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4 รายละเอียดของแต่ละงานวิจัยที่คัดเลือกเพื่อนำรูปแบบการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูล GEO DataSets มาวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

GSE number	Topics	Sample type	Sample size		Authors
			Individual	total	
GSE25507	Autism and increased paternal age related changes in global levels of gene expression regulation	Peripheral blood lymphocytes	autistic (n=82) and controls (n=64)	146	(Alter et al., 2011)
GSE18123	Blood gene expression signatures distinguish autism spectrum disorders from controls	Whole blood	autistic (n=170) and controls (n=115)	285	(Kong et al., 2012)
GSE42133	Disrupted functional networks in autism underlie early brain maldevelopment and provide accurate classification	Leukocyte	autistic (n=91) and controls (n=56)	147	(Pramparo et al., 2015)
GSE6575	Gene expression in blood of children with autism spectrum disorder	Whole blood	autistic (n=35) and controls (n=12)	47	(Gregg et al., 2008)
GSE15402	Gene expression profiling differentiates autism case-controls and phenotypic variants of autism spectrum disorders	Lymphoblastoid cell lines (LCLs)	autistic (n=87) and controls (n=29)	116	(Hu, Sarachana, et al., 2009)

#### 4.1.2 รายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในส่วนประกอบของยีน (Alu-inserted genes)

เพื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีน ผู้ทำวิจัยได้รวบรวมรายชื่อยีนที่มี transposable elements ชนิดต่าง ๆ แทรกตัวอยู่ในยีนของจีโนมมนุษย์เวอร์ชัน 18 (human genome hg 18) จากฐานข้อมูล TranspoGenes Database หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกเฉพาะรายชื่อยีนที่มี transposable element ชนิด Alu elements แทรกตัวอยู่ ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 13,534 ยีน และรายชื่อยีนที่มีเฉพาะ AluS subfamilies แทรกตัวอยู่มีทั้งหมด 12,909 ยีน โดยรายชื่อยีนดังกล่าวถูกแบ่งเป็นสี่กลุ่มตามตำแหน่งที่แทรกอยู่ภายในยีนประกอบด้วยบริเวณ promoter intron exon และ exonized type ตามลำดับ โดยรายละเอียดของแต่ละกลุ่มแสดงอยู่ในตารางที่ 5



ตารางที่ 5 รายชื่อยีน และจำนวนของยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน  
ที่รวบรวมจากฐานข้อมูล TranspoGenes Database

Alu elements subfamilies	Insertion type	Gene number
All subfamilies	All insertion type	13,534
	Exonized type	812
	Exonic type	1,593
	Intronic type	13,245
	Promoter type	557
Alu S subfamilies	All insertion type	12,909
	Exonized type	434
	Exonic type	1,012
	Intronic type	12,702
	Promoter type	315

4.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน (gene expression profiles) ในเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม CU-DREAMx

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Alu elements ต่อรูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression profiles) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โปรแกรม CU-DREAMx ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน กับรายชื่อยีนที่มี Alu elements ตามวิธีที่ได้ระบุไว้ในระเบียบวิธีการวิจัยนี้ ซึ่งการวิเคราะห์จะจำแนกต่างกลุ่มของรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ All Alu insertion, promoter, intron, exon และ exonized type และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม กับกลุ่มควบคุม (ASD versus Control)

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่รวบรวมจากงานวิจัยต่าง ๆ เพื่อค้นหากลุ่มยีนที่มี Alu elements อยู่ภายในยีน และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในเลือด หรือเซลล์ไลน์ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม

รูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression profiles) จากแต่ละงานวิจัยจะถูกวิเคราะห์ร่วมกับรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกอยู่ภายในยีน ซึ่งผลการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มยีนที่มี Alu elements ทุกรูปแบบ (all insertion type) กับรูปแบบการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม พบว่ามีกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญน้อยกว่า 0.05 (chi-square test, ตารางที่ 6) โดยมีรายละเอียดดังนี้ กลุ่มยีนจำนวน 435 1,036 และ 1,047 ยีน จากงานวิจัยหมายเลข GSE15402, GSE25507 และ GSE42133 ตามลำดับเป็นกลุ่มยีนที่มีระดับการแสดงออกลดลง (down-regulated) และมียีนจำนวน 1,389 1,431 และ 2,450 ยีน จากงานวิจัยหมายเลข GSE6576 GSE42133 และ GSE18123 ตามลำดับที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (up-regulated) นอกจากนี้การวิเคราะห์โดยแบ่งตามตำแหน่งที่ Alu elements แทรกตัวอยู่ทั้ง 4 รูปแบบดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นนั้น ได้แสดงให้เห็นไปได้ว่าตำแหน่งที่อยู่ภายในยีนของ Alu elements มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน ดังจะเห็นได้ว่าจำนวนของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์แยกตามตำแหน่ง ที่ Alu แทรกตัวอยู่พบว่า กลุ่มยีนที่มี Alu elements อยู่ในส่วนของ intron ส่วนมากจะมีการแสดงออกที่ผิดปกติ รายละเอียดแสดงใน ตารางที่ 6

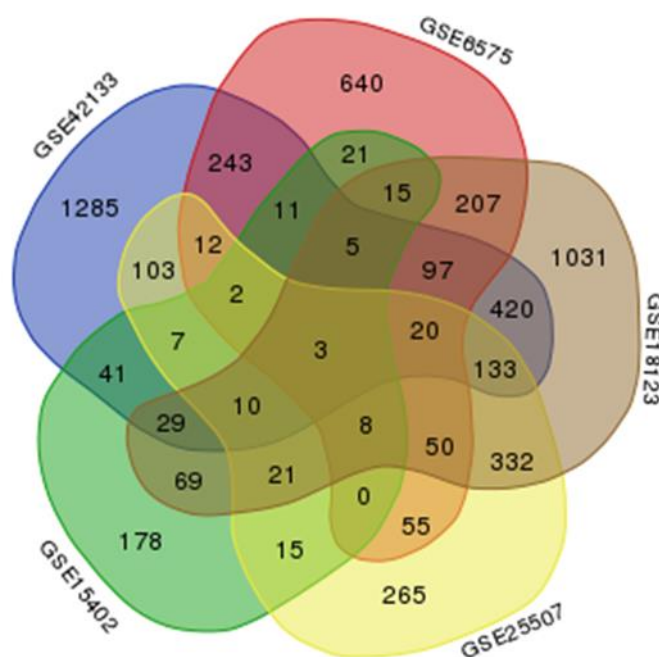
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ระหว่างรายชื่อยีนที่มี Alu elementsแทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ กับรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยที่รวบรวมจากการศึกษาวิจัยต่าง ๆ

Alu Insertion	Comparisons	GEO datasets	Up-regulated gene expression		Down-regulated gene expression	
			P-value*	Genes(n)	P-value*	Genes(n)
All insertion	ASD vs Control	GSE15402	0.572	481	<b>0.019</b>	435
		GSE18123	<b>6.10E-78</b>	2,450	0.891	894
		GSE25507	0.333	1,375	<b>2.09E-37</b>	1,036
		GSE42133	<b>5.23E-13</b>	1,431	<b>4.68E-06</b>	1,047
		GSE6575	<b>3.87E-21</b>	1,389	0.744	66
Exonized	ASD vs Control	GSE15402	0.280	37	<b>0.039</b>	37
		GSE18123	<b>7.30E-13</b>	183	0.080	42
		GSE25507	<b>4.40E-04</b>	55	<b>5.57E-09</b>	85
		GSE42133	<b>4.71E-05</b>	107	0.935	57
		GSE6575	<b>2.09E-04</b>	99	0.580	3
Exonic	ASD vs Control	GSE15402	0.822	50	0.980	44
		GSE18123	<b>8.91E-18</b>	317	<b>0.006</b>	73
		GSE25507	0.086	134	<b>1.09E-04</b>	119
		GSE42133	<b>3.89E-08</b>	195	<b>5.87E-05</b>	141
		GSE6575	<b>0.002</b>	159	0.832	8
Intronic	ASD vs Control	GSE15402	0.433	478	<b>0.019</b>	430
		GSE18123	<b>2.79E-79</b>	2,421	0.982	881
		GSE25507	0.440	1,356	<b>4.48E-39</b>	1,028
		GSE42133	<b>3.28E-13</b>	1408	<b>1.01E-05</b>	1025
		GSE6575	<b>4.24E-22</b>	1,374	0.893	66
Promoter	ASD vs Control	GSE15402	0.109	10	0.754	15
		GSE18123	0.277	69	0.342	31
		GSE25507	<b>0.015</b>	40	0.608	29
		GSE42133	0.578	50	<b>0.025</b>	54
		GSE6575	0.562	51	0.092	0

\*t-test, P-value < 0.05

4.2.2 ผลการเปรียบเทียบรายชื่อยีนที่มี Alu elements และมีการแสดงออกที่ผิดปกติระหว่างงานวิจัยทั้ง 5 ที่ถูกคัดเลือกมาจากรฐานข้อมูล

เพื่อคัดเลือกยีนที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมมากที่สุด ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบรายชื่อของยีนที่ผิดปกติจากแต่ละงานวิจัยที่ได้วิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx ด้วยรายชื่อยีนที่มี Alu elements อยู่ทุกรูปแบบ (All insertion type) ซึ่งผลการเปรียบเทียบด้วยแผนภาพ Venn diagram (ภาพที่ 8) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มยีนที่มี Alu elements และมีการแสดงออกผิดปกติสามารถพบความผิดปกติซ้ำได้ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยออทิซึมที่ต่างกัน (reproducibility) และแสดงให้เห็นได้ว่า Alu elements น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติในเลือดของผู้ป่วยออทิซึม ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกยีนที่ผิดปกติออกมากลุ่มหนึ่งเพื่อนำไปวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่สามารถอธิบายถึงกลไกความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วยการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) โดยได้ทำการคัดเลือกยีนที่พบว่าผิดปกติร่วมกันอย่างน้อย 3 งานวิจัยจากทั้งหมด 5 งานวิจัยที่คัดเลือกมาซึ่งมีจำนวน 423 ยีน (overlapping genes)



ภาพที่ 8 แผนภาพ Venn diagram ของรายชื่อยีนที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ระหว่างรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ (all Alu insertion type) และรูปแบบการแสดงออกของยีนจากเซลล์เม็ดเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มควบคุม

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs จำนวน 56 เซลล์ที่ใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีน

เซลล์ไลน์ LCLs ทั้ง 56 เซลล์ไลน์นี้ได้เคยถูกวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค microarray เป็นที่เรียบร้อยแล้วโดย Dr.Hu ซึ่งผู้ทำวิจัยได้รวบรวมจากฐานข้อมูล GEO DataSets อีกทั้งกลุ่มตัวอย่างก็ได้ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (ASD subgroups) ตามลักษณะของความผิดปกติทางพฤติกรรมซึ่งประเมินโดยใช้ ADI-R ประกอบด้วยกลุ่มควบคุม (C) กลุ่มที่มีความสามารถพิเศษ หรือ Savant (S), กลุ่มที่มีลักษณะความผิดปกติระดับกลาง หรือ Mild (M) และกลุ่มที่มีระดับความรุนแรงในการใช้ภาษาในการสื่อสาร หรือ severe language impaired (L) ซึ่ง gene expression profiles ของทั้ง 56 เซลล์ไลน์นี้จะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx โดยในงานวิจัยส่วนนี้ผู้วิจัยคัดเลือกรายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies มาใช้ในการวิเคราะห์เนื่องจาก AluS subfamilies เป็นชนิดที่มีจำนวนสำเนาที่มีจำนวน CpG คิดเป็นร้อยละ 15% ของ CpG ทั้งจีโนม ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 7

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน กับรายชื่อยีนที่มี AluS elements แทรกตัวอยู่ทุกรูปแบบ (all insertion type) พบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M กลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่มีระดับการแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (Chi-square test) โดยมียีนจำนวน 482 ยีนที่มีการแสดงออกมากกว่าปกติ (up-regulated, P-value=0.001) และมี 408 ยีนที่มีระดับการแสดงออกน้อยกว่าปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (down-regulated, P-value=0.042) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาวิเคราะห์โดยใช้รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ในแต่ละรูปแบบ (promoter, intronic, exonic, exonized type) พบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M ยีนจำนวน 478 ยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ที่ intron มีการแสดงออกที่มากกว่าปกติ (P-value=0.001) และยีนจำนวน 21 ยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวในลักษณะ exonized มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value=0.045) สำหรับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S พบว่ากลุ่มยีนที่มีการแทรกตัวของ AluS subfamilies ในลักษณะ exonized มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมจำนวน 19 ยีนอย่างมีนัยสำคัญ (P-value = 0.013) ส่วนผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มผู้ L พบว่าระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่มีการแทรกตัวของ AluS subfamilies ไม่แตกต่างแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M และกลุ่ม S นั้นกลุ่มยีนที่มีการแทรกตัวของ Alu elements อยู่ภายในจะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

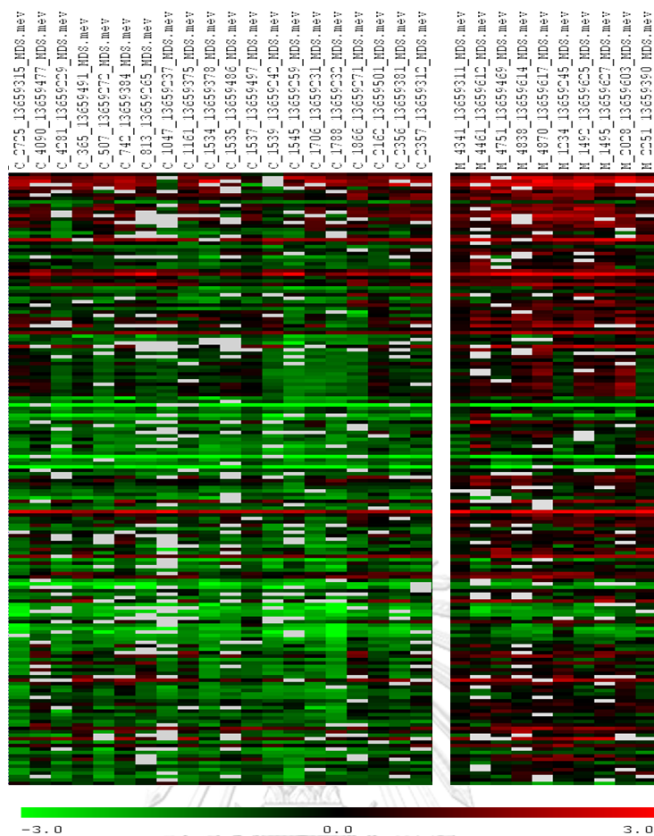
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ระหว่างรายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ กับรูปแบบการแสดงออกของยีนในเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึม สเปกตรัม (n=36) และกลุ่มควบคุม (n=20)

AluS Insertion type	Comparisons	Up-regulated gene expression		Down-regulated gene expression	
		P-value*	Genes(n)	P-value*	Genes(n)
All insertion type	ASD vs C	0.431	322	0.134	259
	Subgroup L vs C	0.480	504	0.060	508
	Subgroup M vs C	<b>0.001</b>	482	<b>0.042</b>	408
	Subgroup S vs C	0.435	314	0.423	227
Exonized	ASD vs C	0.816	12	0.668	10
	Subgroup L vs C	0.808	19	0.915	18
	Subgroup M vs C	0.762	17	<b>0.045</b>	21
	Subgroup S vs C	<b>0.013</b>	19	0.698	9
Exonic	ASD vs C	0.148	17	0.904	19
	Subgroup L vs C	0.147	46	0.564	40
	Subgroup M vs C	0.965	33	0.171	36
	Subgroup S vs C	0.641	21	0.355	13
Intronic	ASD vs C	0.449	318	0.167	255
	Subgroup L vs C	0.402	500	0.087	500
	Subgroup M vs C	<b>0.001</b>	478	0.067	401
	Subgroup S vs C	0.404	311	0.448	224
Promoter	ASD vs C	0.696	5	0.441	3
	Subgroup L vs C	0.909	9	0.512	11
	Subgroup M vs C	0.053	3	0.904	7
	Subgroup S vs C	0.238	3	0.038	0

\*t-test, P-value < 0.05

#### 4.3 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยตัววิเคราะห์ทางสถิติสำหรับเทคนิค microarrays (Significant Analysis of Microarrays, SAM)

ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมกลุ่ม M ด้วย SAM analysis โดยโปรแกรม TM4 MeV พบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M จะมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด 36 และ 178 ยีนที่ระดับความผิดพลาดที่ 5% และ 10% (false discovery rate) ตามลำดับ ต่อมารายชื่อยีนทั้ง 36 และ 178 จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับรายชื่อยีนที่ผิดปกติจากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx (all insertion type) ทำให้ได้รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M ที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง (high confidence level) โดยพบว่ามียีนจำนวน 5 ยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติเมื่อผ่านการเทียบกับ SAM ดังแสดงในตาราง 8 จากนั้นผู้วิจัยได้นำ TRIM33 มายืนยันระดับการแสดงออกของยีนด้วย qRT-PCR พบว่าทิศทางการแสดงออกของยีนสอดคล้องกับทิศทางการที่ได้จาก microarray ผลการวิเคราะห์ทางสถิติไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย SAM ที่ระดับความผิดพลาดทั้ง FDR5% และ 10% ไม่พบยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติเมื่อเทียบกับรายชื่อยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ CU-DREAMx ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S



ภาพที่ 9 แสดงรูปแบบการแสดงออกของยีน (expression Image) ของกลุ่มยีนมีระดับการแสดงออกแตกต่างกับกลุ่มคนปกติอย่างที่มีนัยสำคัญที่ระดับความผิดพลาด %FDR 5 (Positive and Negative significant) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (ภาพซ้าย) กับ ผู้ป่วยออลิซิมสเปกตรัมกลุ่มที่มีระดับความรุนแรงระดับกลาง หรือกลุ่ม M (ภาพขวา)

ตารางที่ 8 รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ (all insertion type) และมีระดับการแสดงออกผิดปกติในผู้ป่วยออลิซิมสเปกตรัมกลุ่ม M ที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง (high confidence level, SAM analysis) และยืนยันผลด้วย qRT-PCR

Gene symbol	GenBank Accession	$\log_2(M/C)$ from microarray	$\log_2(M/C)$ from qRT-PCR
GNAS	AI268751	-0.343	-
TRIM33	AA426120	-0.298	-0.316
ABHD1	AA428655	-0.281	-
COG1	AA701034	-0.243	-
FCGBP	T53389	-0.392	-



4.4 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีน (biological functions and gene regulatory networks) ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกของยีนผิดปกติในเลือดจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ meta-analysis

เพื่อพิสูจน์ว่า Alu elements มีบทบาทสำคัญต่อความผิดปกติทางกลไกชีวโมเลกุลในตัวอย่างของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ผู้ทำวิจัยได้ทำการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีน (biological functions and gene regulatory networks) เพื่อหาความสัมพันธ์ และความเกี่ยวข้องระหว่างโรคออทิซึมสเปกตรัมกับ Alu elements ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ตามวิธีที่ได้ระบุไว้ในระเบียบวิธีการวิจัยฉบับนี้

รายชื่อยีนทั้งหมด 423 ยีนที่ได้จากการเปรียบเทียบกับแผนภาพ Venn diagram ของผลการวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx จากทั้ง 5 งานวิจัย ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องชีวสารสนเทศ Ingenuity Pathway Analysis หรือ IPA ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงเป็นส่วนดังนี้

4.4.1 บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

ผลการวิเคราะห์พบว่า กลุ่มยีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับโรค หรือความผิดปกติทางระบบประสาทในหลาย ๆ ด้านซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงใน**ตารางที่ 9** โดยผลการวิเคราะห์สัมพันธ์ของกลุ่มยีนกับโรคต่าง ๆ พบว่ายีนจำนวน 23 และ 27 ยีนมีความเกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางสติปัญญา (mental retardation, familial mental retardation) ที่ระดับนัยสำคัญ  $1.75E-06$  และ  $3.29E-07$  ตามลำดับซึ่งความผิดปกตินี้จัดอยู่ในกลุ่มของความผิดปกติทางพัฒนาการของระบบประสาท (neurodevelopmental disorder) เช่นเดียวกับออทิซึมสเปกตรัม และนอกจากนี้ยังพบว่ายีนจำนวน 30 ยีนมีความเกี่ยวข้องกับความเสื่อม (cognitive impairment) ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ  $2.08E-06$  ซึ่งผู้ป่วยภาวะนี้มีความผิดปกติบางประการที่แสดงออกร่วมกันกับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มยีนเหล่านี้มีบทบาทในกระบวนการทางชีววิทยาที่สำคัญ และเกี่ยวข้องกักระบบประสาทอย่างเช่น กระบวนการพัฒนาการของใยประสาท (neuritogenesis) และ canonical pathways ที่พบว่ามีเกี่ยวข้องกัออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ Estrogen receptor signaling Androgen signaling Circadian rhythm signaling Neurotrophin/TRK signaling Protein ubiquitination pathway และ ERK/MAPK signaling โดยรายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 10**

ตารางที่ 9 รายชื่อโรค และหน้าที่ทางชีวภาพ (diseases and function) ของยีนที่ได้คัดเลือกมาทั้งหมด 423 ยีนผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Diseases or Functions Annotation	P-value*	Molecules (n)	Molecules
mental retardation	1.75E-06	27	ADNP,ARID1A,ATRX,CAMTA1,CASK,CASP2,CDC42,CHRM3,COL4A3BP,CREBBP,DDX3X,ELOVL4,EP300,GNB1,HERC1,NONO,NSUN2,OPA1,PIGO,RPS6KA3,SLC35A3,ST3GAL3,TRIO,UBE2A,YY1,ZBTB16,ZMYND11
hereditary neuropathy	7.44E-03	12	DDHD1,DST,FBXO38,FUS,GRN,HSPD1,OPA1,PKD3,SPG21,SPTLC1,VPS13C,WNK1
hereditary sensory and autonomic neuropathy	4.59E-03	3	DST,SPTLC1,WNK1
cognitive impairment	2.08E-06	30	ADNP,ARID1A,ATRX,CAMTA1,CASK,CASP2,CDC42,CEP63,CHRM3,COL4A3BP,CREBBP,DDX3X,ELOVL4,EP300,GNB1,GRIN2D,HERC1,NONO,NR3C1,NSUN2,OPA1,PIGO,RPS6KA3,SLC35A3,ST3GAL3,TRIO,UBE2A,YY1,ZBTB16,ZMYND11
Dementia	3.73E-03	32	ADAM10,APLP2,ATP1B1,CACNA2D2,CASP2,CASP8,CHRM3,DDX46,DICER1,EPHA4,GLS,GRIN2D,GRN,HSPD1,KHDRBS1,KIT,MUT,NDUFS1,NNT,NOM1,NR3C1,OPA1,PRKCA,PTGS1,PTPRE,SPG21,SPTLC1,SRPK2,TRIO,VPS13B,WDFY3,XPO7
neuritogenesis	0.00435	7	ATRN,CDC42,KIF13B,MARK2,RAB11A,RAC1,RAP2A

\*Fisher's exact test, P-value < 0.05

ตารางที่ 10 Canonical pathways ของยีนที่คัดเลือกมาทั้งหมด 423 ยีนจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ซึ่งเป็น pathway ที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

Ingenuity Canonical Pathways	P-value*	Molecules
ERK/MAPK signaling	3.39E-07	PPP2R5E,PAK2,CREB1,PIK3C2A,ATM,PIK3R4,EP300,PTK2,YWHAH,PPP2R5C,FYN,PRKCA,MKNK1,MAPK1,CREBBP,RAC1,SHC1,PPP2CA
Neurotrophin/TRK signaling	7.08E-07	CDC42,MAP3K5,CREB1,PIK3C2A,MAP2K4,ATM,PIK3R4,EP300,MAPK1,CREBBP,SHC1
Estrogen receptor signaling	7.59E-07	TAF15,NCOA1,POLR2A,POLR2E,EP300,TAF4,GTF2F1,NR3C1,MAPK1,CREBBP,SHC1,TRRAP,RUNX2,GTF2H1
Androgen Signaling	7.59E-07	GNAI1,NCOA1,POLR2A,POLR2E,EP300,GNB1,PRKCA,GTF2F1,MAPK1,CREBBP,PRKCH,SHC1,GTF2H1
Protein ubiquitination Pathway	1.38E-03	UBE4B,UBE2H,UBR1,HSPD1,DNAJB12,CBL,UBE2G1,USP15,UBE2A,USP38,USP33,USP48,USP4,TRAF6
Circadian rhythm signaling	5.37E-03	CREB1,EP300,GRIN2D,CREBBP

\*Fisher's exact test, P-value < 0.05

4.4.2 เครือข่ายควบคุมยีน (gene regulatory networks) ที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

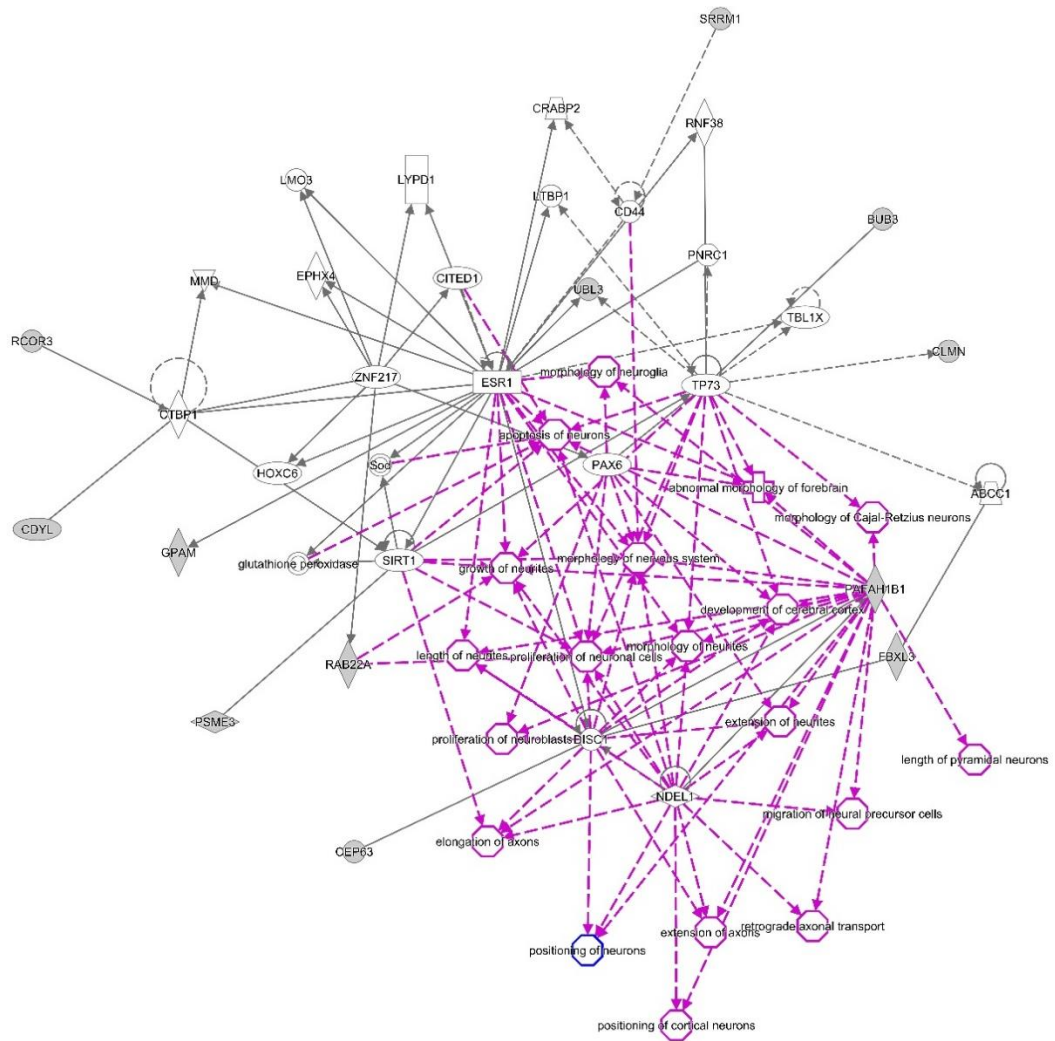
การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA ยังทำให้ทราบถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันของยีนภายในกลุ่มยีนและโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องจากฐานข้อมูลของ IPA โดย gene regulatory networks มีบทบาทสำคัญอย่างมากที่จะช่วยให้เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงที่มีความซับซ้อนทางกลไกชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงในตารางที่ 11

ตัวอย่างของ gene regulatory network ที่น่าสนใจได้แก่เครือข่ายที่เกี่ยวข้องกับ nervous system development and function (ภาพที่ 10) ซึ่งมียีนจำนวนทั้งหมด 35 ยีนที่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันในเครือข่ายนี้เพื่อทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ cell morphology cellular assembly and organization และ nervous system development and function โดย 12 โมเลกุลในเครือข่ายนี้เป็นโมเลกุลของยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (โมเลกุลพื้นหลังสีเทา) ซึ่งในเครือข่ายแสดงให้เห็นปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลอื่น ๆ ในเซลล์ (พื้นหลังสีขาว) นอกจากนี้เมื่อทำการเพิ่มเติมรายละเอียด

ของเครือข่ายด้วยหน้าที่ทางชีวภาพของแต่ละโมเลกุลในเครือข่าย (สีชมพู) ก็ได้แสดงให้เห็นว่าหลายโมเลกุลที่มีปฏิสัมพันธ์กันนั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการพัฒนาการของใยประสาท (neuritogenesis) ความสำคัญของเครือข่ายควบคุมยีนจะทำให้เราทราบและเข้าใจข้อมูลที่ทำการศึกษาซึ่งมีจำนวนมากโดยทำให้ทราบว่ากลุ่มยีนหรือโมเลกุลที่เราสนใจอาจมีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลอื่น ๆ ที่ไม่ผิดปกติหรือผิดปกติแต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ Alu elements ซึ่งผลการวิเคราะห์เครือข่ายจะทำให้เห็นถึงความผิดปกติที่เชื่อมโยงกันกับยีนที่มีความสำคัญกับกระบวนการทางระบบประสาทได้

ตารางที่ 11 Gene regulatory networks ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) โดยใช้รายชื่อที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

Top Diseases and Functions	Score	Focus Molecules
Gene Expression, Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization	39	29
Post-Translational Modification, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	33	26
Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Cell Death and Survival	23	21
Amino Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cellular Development	15	16
Connective Tissue Disorders, Immunological Disease, Inflammatory Disease	13	14
Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism, Molecular Transport	11	13
Cellular Development, Connective Tissue Development and Function, Tissue Development	11	13
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Embryonic Development	10	12
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Nervous System Development and Function	10	12
Cellular Assembly and Organization, Cancer, Dermatological Diseases and Conditions	9	11
Cellular Assembly and Organization, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Function and Maintenance	5	6
Cardiovascular Disease, Hereditary Disorder, Neurological Disease	1	1
Connective Tissue Disorders, Developmental Disorder, Hereditary Disorder	1	1



ภาพที่ 10 Gene regulatory network ที่เกี่ยวข้องกับ Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization และ Nervous System Development and Function ของยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

4.5 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีน (biological functions and gene regulatory networks) ของกลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกของยีนผิดปกติในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M

เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ของกลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M (ตารางที่ 7) จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA ตามวิธีที่ได้ระบุไว้ในระเบียบวิธีการวิจัยแล้ว ประกอบด้วยรายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกลดลง และเพิ่มขึ้น (up and down regulation)

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ากลุ่มยีนที่มี Alu elements และมีการแสดงออกผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M นั้นมีความเกี่ยวข้องกับกลไกทางชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ประสาท หรือระบบประสาท เช่น neuritogenesis guidance of axons นอกจากนี้กลุ่มยีนที่ผิดปกติเหล่านี้ยังมีความสัมพันธ์กับกลไก ubiquitination ที่ได้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมมาก่อน ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 หน้าที่ทางชีวภาพ และโรคต่าง ๆ (biological functions and diseases) ที่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่ม M

Diseases or Functions Annotation	P-Value*	# Molecules	Molecules
Ubiquitination	3.10E-05	27	ARIH1,BTRC,CCNF,CUL1,DNAJA1,ELOC,KLHL42,NDFIP2,NEDD4L,PCBP2,PRKCG,RNF146,RNF8,SAE1,SASH1,SEN2,SIRT1,SMURF1,TGFBR1,TNKS,TNKS2,TRIM21,TRIM33,UBE2B,UBE2R2,USP4,WWP1
Differentiation of neural crest cells	1.86E-03	2	LRP6,MEF2C
Neuronal heterotopia	2.46E-03	3	ARFGEF2,NEDD4L,PAFAH1B1
Neuritogenesis	7.29E-03	10	ALS2,ATRN,CNTN4,ICAM5,KIF13B,LAMB1,PRKCE,RAP2A,SLIT2,ULK1
Binding of estrogen response element	9.60E-03	4	ANXA7,EGF,NRG1,SIRT1
Dysgenesis of corpus callosum	1.02E-02	3	EPG5,FRMD4A,PAFAH1B1
Binding of androgen-responsive element	1.05E-02	2	CBX1,STK4
Guidance of axons	1.35E-02	4	CNTN4,OPHN1,SEMA3F,SLIT2

\*Fisher's exact test, P-value < 0.05

ตารางที่ 13 Canonical pathways ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA โดยใช้รายชื่อยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และเป็นกลุ่มที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติในเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมกลุ่ม M

Ingenuity Canonical Pathways	P-value*	Molecules
Protein Ubiquitination Pathway	6.76E-04	DNAJA1,UBE2H,HSPA13,CUL1,BTRC,PSMD11,ANAPC10,PSMC2,USP15,HSPA4,UBE2B,USP2,USP12,USP31,ELOC,SUGT1,PSMD8,PSMC6,SMURF1,UBE2R2,USP4,NEDD4L,PSMB8
Androgen Signaling	9.12E-04	PRKCE,GTF2B,ERCC2,EP300,GNAL,PRKAR1A,HSPA4,GNAS,GNB5,SAD3,GTF2E1,PRKCG,PRKAR2A
Netrin Signaling	6.17E-03	NFAT5,UNC5A,PPP3CC,NCK1,PRKAR1A,PRKAR2A
CREB Signaling in Neurons	1.26E-02	PRKCE,GTF2B,ATF2,AKT3,EP300,SOS1,GNAL,GRIN2C,PRKAR1A,GNAS,GNB5,GRB2,ITPR1,PRKCG,PRKAR2A
Axonal Guidance Signaling	1.70E-02	C9orf3,AKT3,SEMA3F,LIMK1,PPP3CC,GNAL,LNPEP,COP55,WNT2,GRB2,ROCK1,NFAT5,NCK1,PRKAR2A,PRKCE,ITSN1,CRKL,SRGAP1,UNC5A,SOS1,FARP2,PRKAR1A,ABL1,EGF,GNAS,SLIT2,EPHA1,GNB5,PRKCG
ERK5 Signaling	1.86E-02	EGF,ATF2,MAP3K2,EP300,ELK4,MEF2C,IL6ST
Huntington's Disease Signaling	2.95E-02	PRKCE,HDAC5,ATF2,AKT3,CLTC,EP300,SOS1,HDAC7,CPLX2,EGF,ROR3,HSPA4,GNB5,GRB2,ITPR1,MAPK8,PRKCG
Neuregulin Signaling	3.24E-02	PRKCE,EGF,AKT3,CRKL,GRB2,NRG1,SOS1,PRKCG
ERK/MAPK Signaling	4.79E-02	PRKCE,ATF2,CRKL,EP300,PPARG,PPP2R2A,SOS1,PRKAR1A,STAT3,GRB2,RAPGEF1,PPP2CA,PRKCG,PRKAR2A

\*Fisher's exact test, P-value < 0.05



ตารางที่ 14 Gene regulatory networks ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ของรายชื่อที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติใน LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M

Top Diseases and Functions	Score	Focus Molecules
Post-Translational Modification, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cell Cycle	40	33
Cell Death and Survival, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	35	31
Cell Morphology, Lipid Metabolism, Molecular Transport	33	30
Cellular Development, Endocrine System Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	31	29
Cardiac Proliferation, Cardiovascular System Development and Function, Cellular Development	29	28
Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance	29	28
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance	24	25
Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Cell Morphology	21	23
Cancer, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	19	22
Developmental Disorder, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease	15	16
RNA Post-Transcriptional Modification, Molecular Transport, RNA Trafficking	11	16
DNA Replication, Recombination, and Repair, Cancer, Hematological Disease	11	16
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	10	15
Cell Cycle, Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization	10	15
Inflammatory Disease, Inflammatory Response, Neurological Disease	9	14
Cellular Movement, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	9	14

4.6 ผลการวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs เพื่อศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีนผ่านทางกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชัน

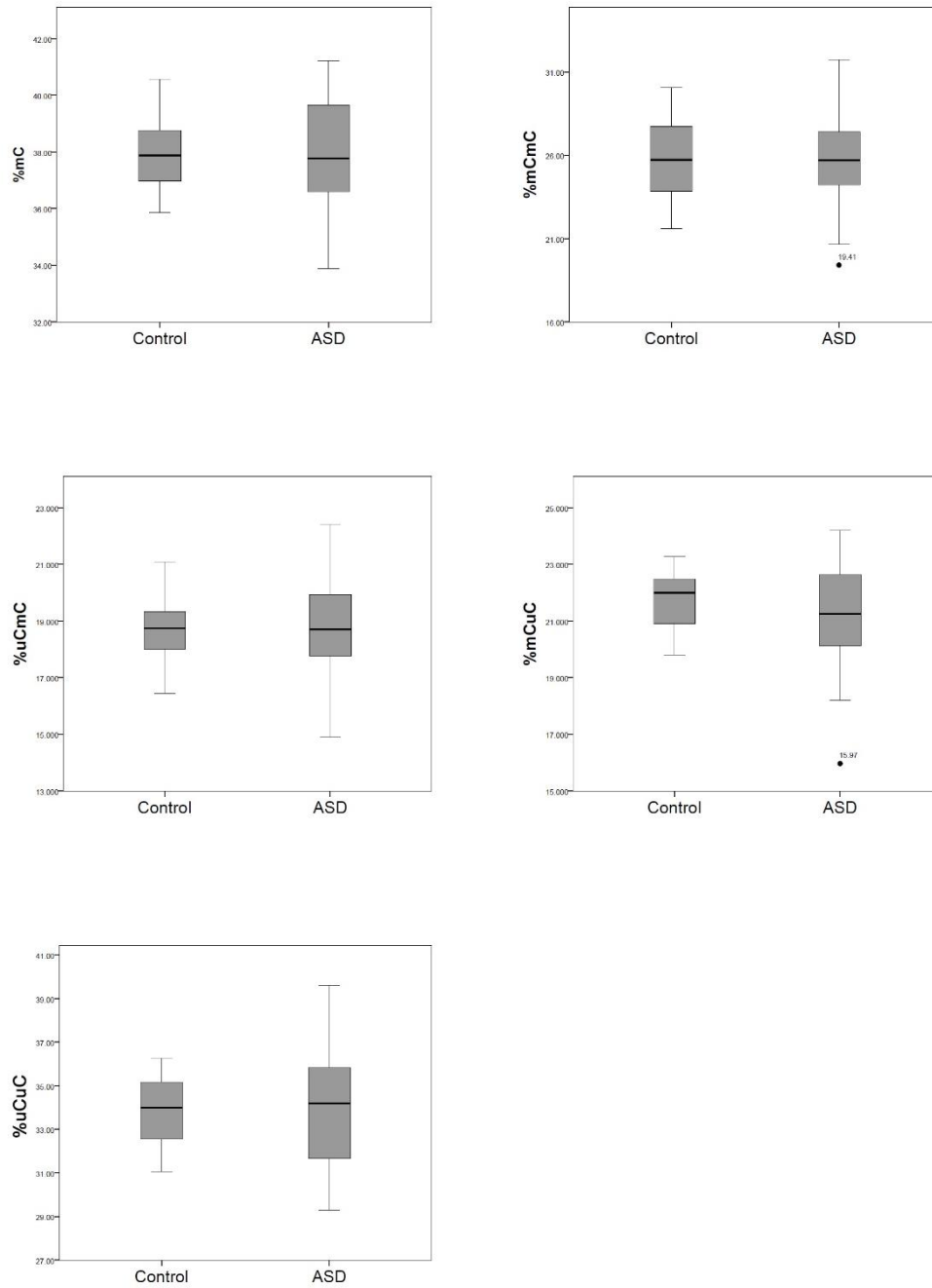
เพื่อศึกษาบทบาทของ Alu elements ต่อการแสดงออกของยีนผ่านทางกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชัน (DNA methylation) ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม วิธี COBRA ถูกออกแบบมาเพื่อวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ AluS subfamilies ตามวิธีที่ได้ระบุไว้ในระเบียบวิธีการวิจัย ซึ่งจากผลการทดลอง (ตารางที่ 15) พบว่าระดับเมธิเลชันรวม (total methylation,  $^mC$ ) และรูปแบบของการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies ทั้ง 4 รูปแบบ (methylation patterns) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึม (ASD, n=36) และกลุ่มควบคุม (control, n=20) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากความหลากหลายทางด้านความรุนแรง และสาเหตุการเกิดโรคในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเอง (heterogeneous population) การจัดจำแนกผู้ป่วยออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามลักษณะความผิดปกติทางคลินิกของผู้ป่วยแต่ละรายจะช่วยให้ง่ายต่อการระบุสาเหตุความผิดปกติในผู้ป่วยแต่ละราย หรือแต่ละกลุ่มที่มีลักษณะความผิดปกติคล้ายกัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบโดยแยกผู้ป่วยออกเป็นสามกลุ่มตามที่ได้ระบุไว้ในระเบียบวิธีการวิจัยแล้วนั้น

การเปรียบเทียบในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มผู้ทำวิจัยพบว่าผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M และกลุ่ม S จะมีร้อยละของรูปแบบการเกิดเมธิเลชันแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (age-matched controls) ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปภาพที่ 12 และ 14 ซึ่งในผู้ป่วยกลุ่ม M ร้อยละรูปแบบการเกิดเมธิเลชันแบบ partially methylated patterns  $^mC^uC$  ( $22.99\% \pm 0.82\%$ ) และ  $^uC^mC$  ( $20.06\% \pm 0.92\%$ ) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.004 และ 0.013 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละของการเกิดเมธิเลชันแบบ hypomethylated pattern  $^uC^uC$  ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย (P-value=0.035) ส่วนในผู้ป่วยออทิซึมกลุ่ม S มีร้อยละของรูปแบบการเกิดเมธิเลชันแบบ partially methylated patterns  $^mC^uC$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $20.43\% \pm 1.17$ , P-value=0.0005) ส่วนการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่ต่างกัน (age-matched) พบว่าระดับเมธิเลชันรวม และรูปแบบของการเกิดเมธิเลชันของไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

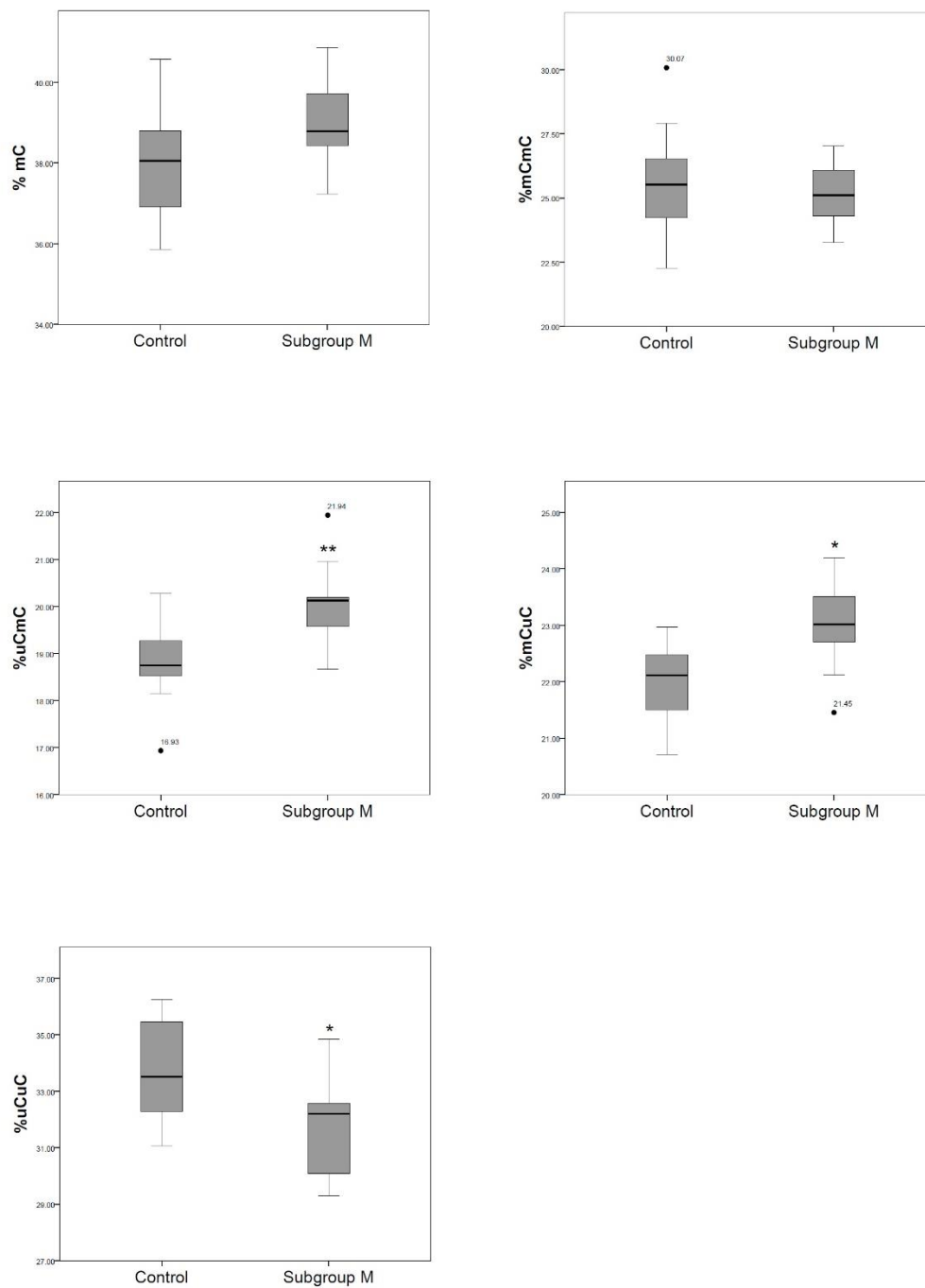
ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ระดับ และรูปแบบของปฏิกิริยาเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่ม และกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่ต่างกัน (age-matched control) ด้วยวิธี COBRA for AluS subfamilies method ซึ่งมีการวัดระดับปฏิกิริยาเมธิเลชันรวม (total methylation,  $^mC$ ) และรูปแบบที่เป็นไปได้ของการเกิดปฏิกิริยา 4 รูปแบบ

Sample group	Age (mean)	Percentage of Alu methylation $\pm$ SD				
		% $^mC$	% $^mC^mC$	% $^uC^mC$	% $^mC^uC$	% $^uC^uC$
Control (n=20)	15	37.98 $\pm$ 1.36	25.70 $\pm$ 2.36	18.71 $\pm$ 1.15	21.76 $\pm$ 1.03	33.83 $\pm$ 1.69
ASD (n=36)	13.4	37.86 $\pm$ 2.07	25.92 $\pm$ 2.69	18.72 $\pm$ 1.66	21.22 $\pm$ 1.76	34.13 $\pm$ 3.00
*P-value (C vs A)		0.792	0.757	0.974	0.158	0.628
Control (n=10)	12.1	38.07 $\pm$ 1.52	25.57 $\pm$ 2.31	18.76 $\pm$ 0.87	22.06 $\pm$ 0.69	33.62 $\pm$ 1.85
ASD subgroup M (n=10)	12.1	39.03 $\pm$ 1.16	25.17 $\pm$ 1.15	20.06 $\pm$ 0.92	22.99 $\pm$ 0.82	31.77 $\pm$ 1.76
*P-value (C vs M)		0.132	0.634	<b>0.004</b>	<b>0.013</b>	<b>0.035</b>
Control (n=6)	13.7	37.84 $\pm$ 1.51	24.88 $\pm$ 2.94	19.10 $\pm$ 1.60	22.25 $\pm$ 1.03	33.77 $\pm$ 1.84
ASD subgroup L (n=6)	13.5	36.024 $\pm$ 1.43	23.37 $\pm$ 2.63	19.32 $\pm$ 1.69	20.93 $\pm$ 2.52	36.38 $\pm$ 2.29
*P-value (C vs L)		0.059	0.370	0.823	0.277	0.055
Control (n=20)	15	37.98 $\pm$ 1.36	25.70 $\pm$ 2.36	18.71 $\pm$ 1.15	21.76 $\pm$ 1.03	33.83 $\pm$ 1.69
ASD subgroup S (n=20)	15	37.83 $\pm$ 2.23	27.06 $\pm$ 2.67	17.88 $\pm$ 1.44	20.43 $\pm$ 1.17	34.64 $\pm$ 3.00
*P-value (C vs S)		0.791	0.097	0.050	<b>0.0005</b>	0.301

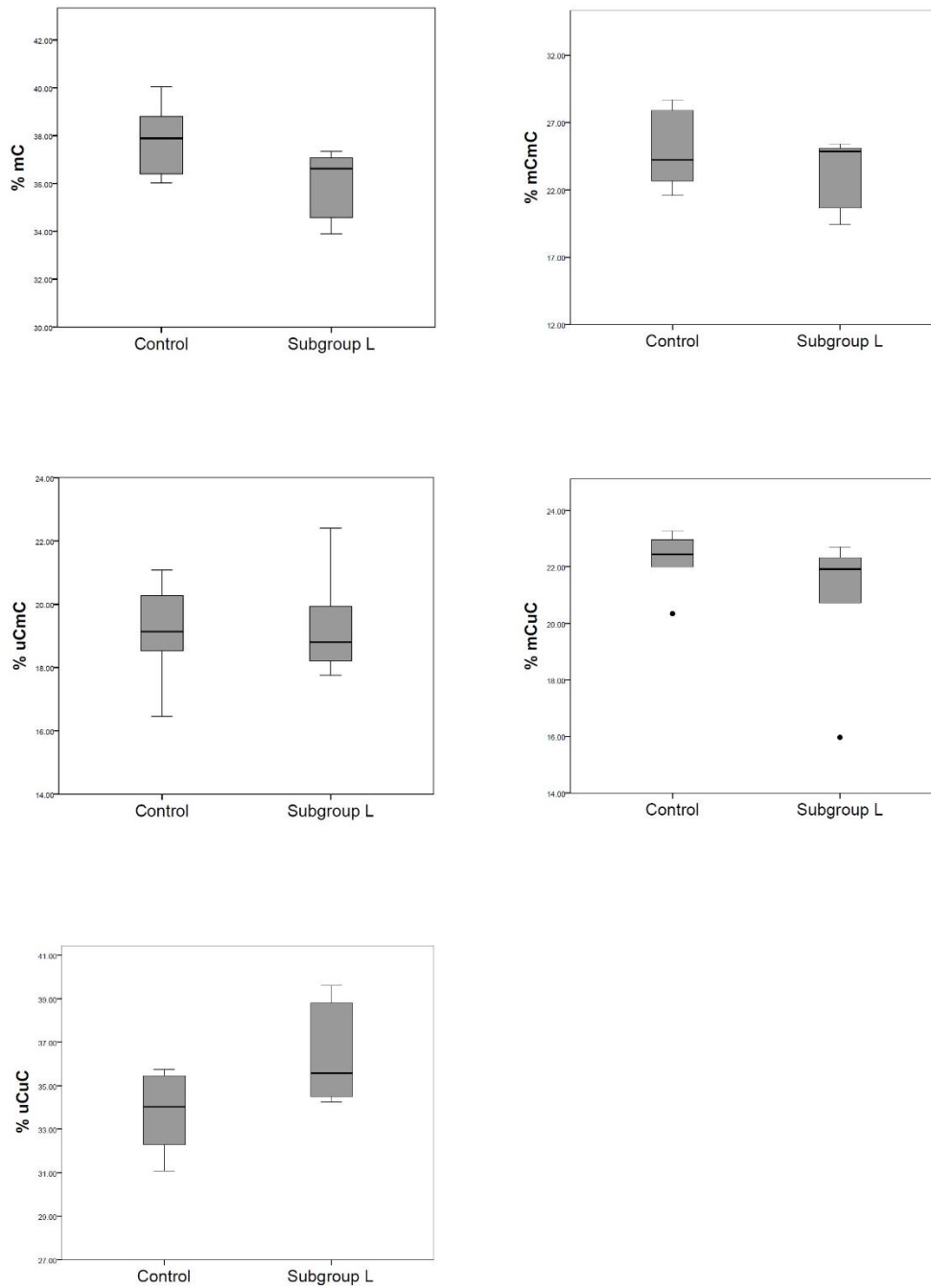
\*t-test, P-value < 0.05



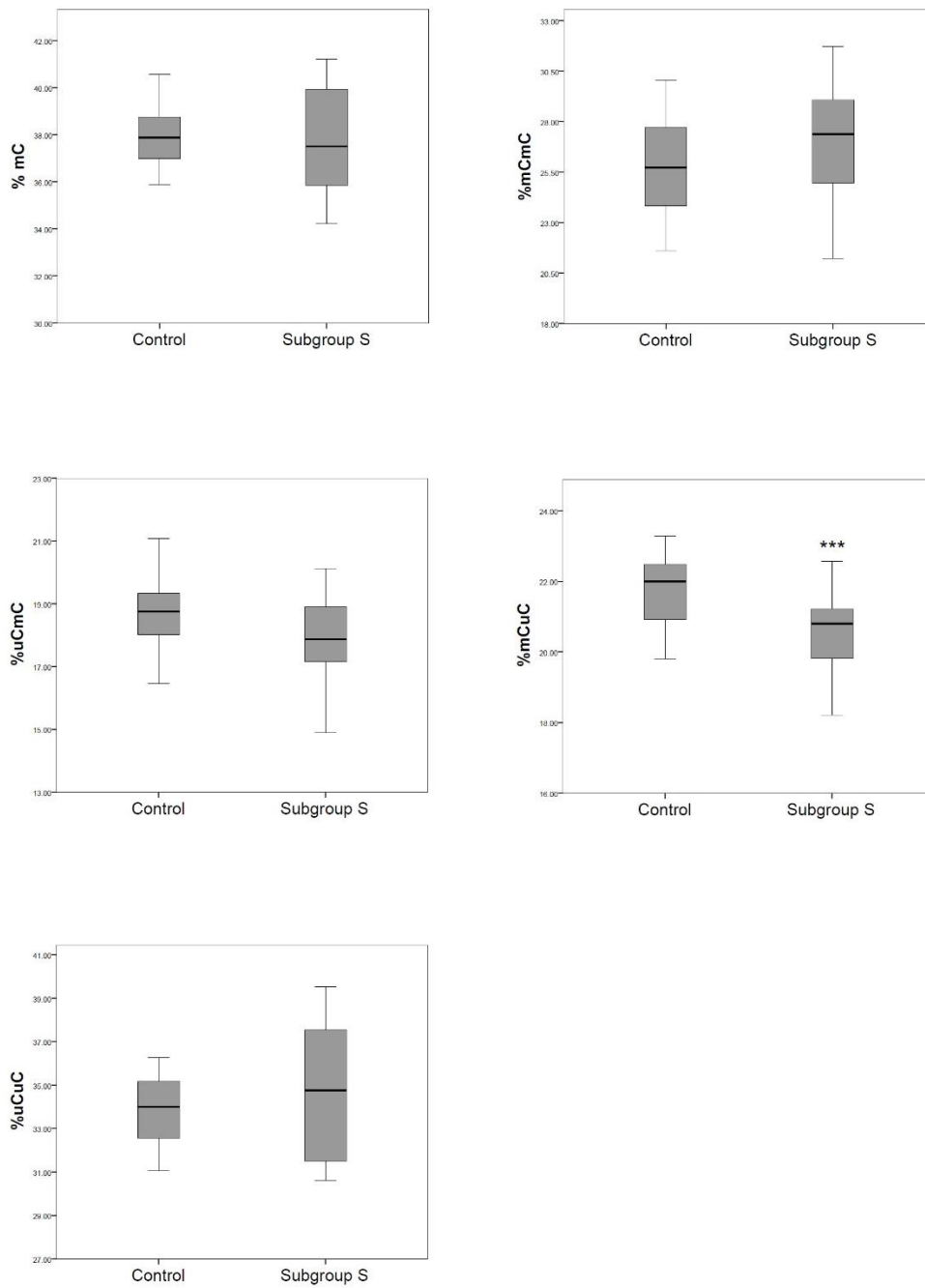
ภาพที่ 11 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม กับกลุ่มควบคุม (A vs C)



ภาพที่ 12 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่างผู้ป่วย  
 ออทิสซึมเพศผู้กลุ่ม M กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่แตกต่างกัน (age-matched controls)  
 t-test, \*P-value <0.05 \*\*P-value <0.01



ภาพที่ 13 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่างผู้ป่วย  
ออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่แตกต่างกัน (age-matched controls)



ภาพที่ 14 แผนภาพกล่อง (box plot) ร้อยละของรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันระหว่างผู้ป่วย  
ออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่แตกต่างกัน (age-matched controls)

\*\*\*t-test, P-value < 0.001

#### 4.7 ผลการวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR

เพื่อศึกษาบทบาทของกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements ต่อระดับการแสดงออกของ Alu elements เอง ผู้ทำวิจัยได้ทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันต่อการแสดงออกของ AluS subfamilies เองซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 16 พบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S ระดับการแสดงออกของ AluS เพิ่มขึ้นโดยมีการเปลี่ยนแปลง 1.88 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.019 ส่วนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ระดับการแสดงออกของ AluS ลดลง 1.77 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระดับนัยสำคัญ 0.008 ส่วนในผู้ป่วยกลุ่ม M และกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด (ASD) เทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ด้วยวิธี quantitative RT-PCR ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (ASD) กับกลุ่มควบคุม (control) และระหว่างกลุ่มย่อยของผู้ป่วย (ASD subgroups) กับกลุ่มควบคุมที่มีอายุไม่ต่างกัน (age-matched control)

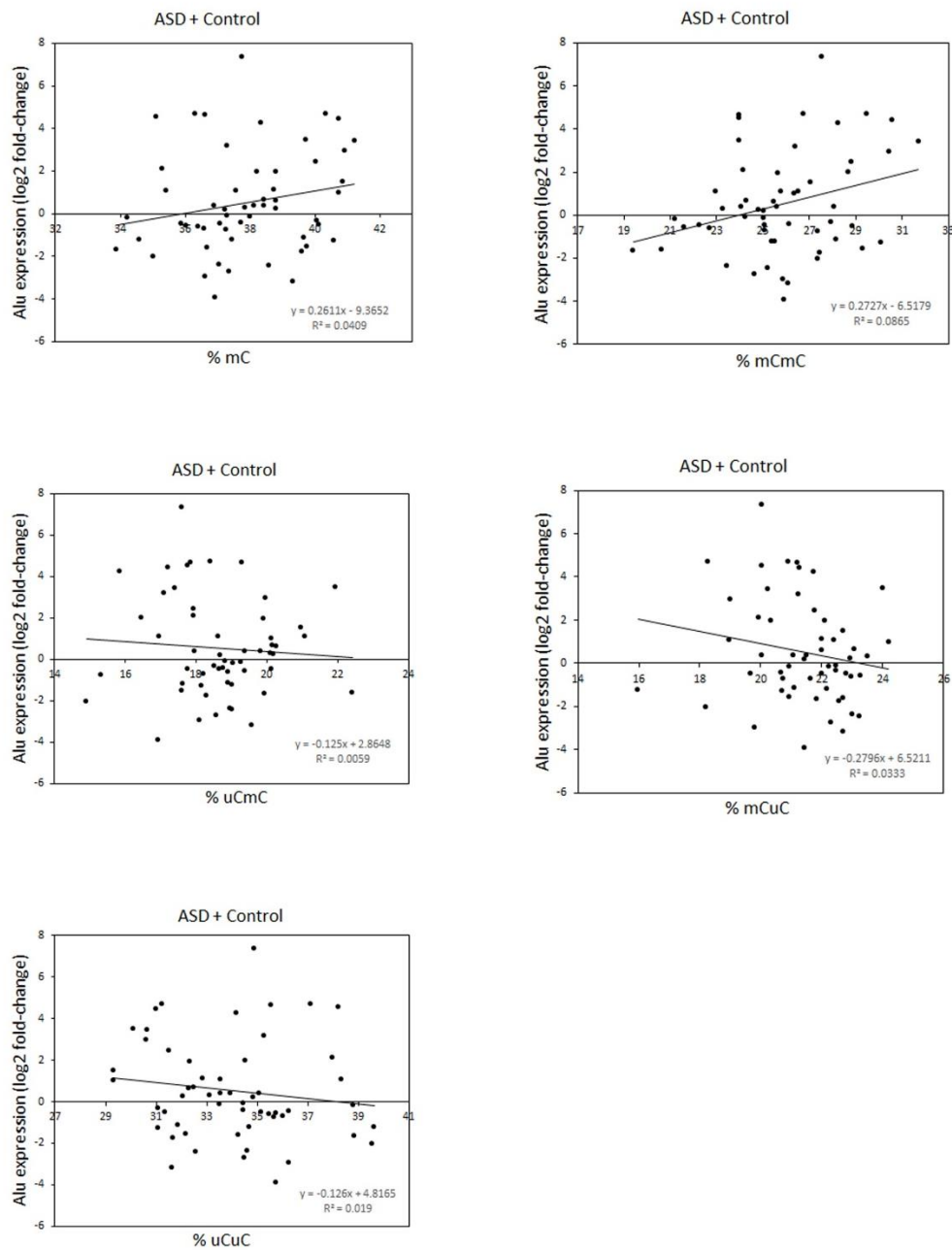
Groups	Fold Change (FC)	Log <sub>2</sub> (FC)	p-value
ASD vs Control	1.75	0.81	0.237
Subgroup L vs Age-matched control	0.29	-1.77	<b>0.008*</b>
Subgroup S vs Age-matched control	3.68	1.88	<b>0.019*</b>
Subgroup M vs Age-matched control	1.05	0.06	0.953

\*t-test, P-value < 0.05

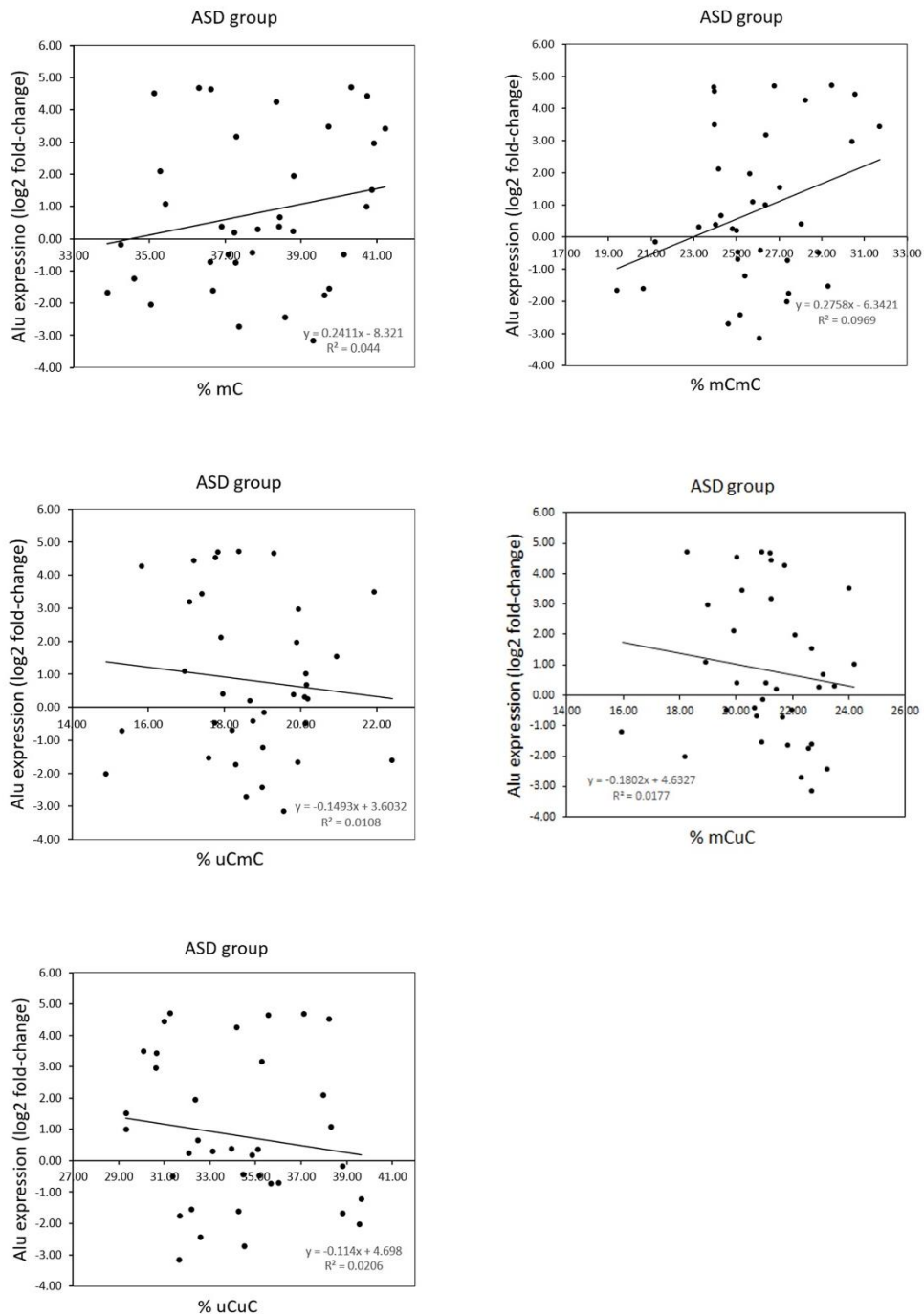


#### 4.8 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs

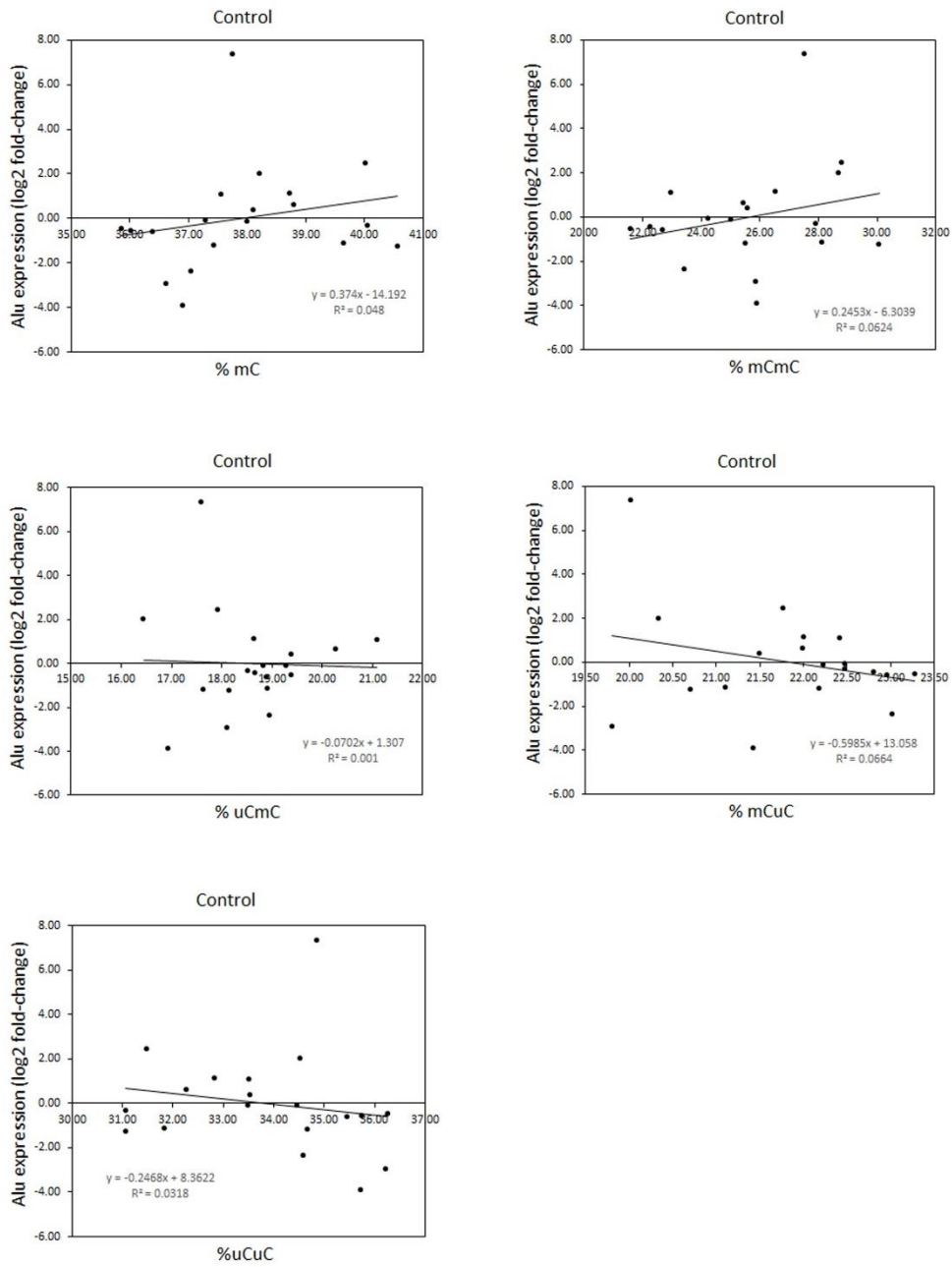
เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และการแสดงออกของ AluS subfamilies ผู้ทำวิจัยได้ทำการวิเคราะห์ด้วย correlation analysis โดยใช้ข้อมูลระดับการแสดงออก และรูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies ของแต่ละตัวอย่าง (LCLs) ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชัน และการแสดงออกของ AluS subfamilies ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด (ASD+control, **ภาพที่ 15**) หรือเมื่อทำการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (ASD, **ภาพที่ 16**) และกลุ่มควบคุม (control, **ภาพที่ 17**) ก็ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลวิเคราะห์เช่นเดียวกัน ในลำดับถัดมาผู้ทำวิจัยได้ทำการหาความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มซึ่งพบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M (**ภาพที่ 18**) ที่รูปแบบการเกิดเมธิเลชันแบบ partially methylated patterns  $^{u}C^{m}C$  ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มนี้ มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ระดับปานกลาง (moderate relationship,  $R^2=0.5149$ ) โดยเป็นความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างข้อมูลทั้ง (positive relationship) เมื่อร้อยละของรูปแบบเมธิเลชัน  $^{u}C^{m}C$  เพิ่มสูงขึ้นพบว่าระดับการแสดงออกของ AluS เพิ่มสูงขึ้นด้วย ส่วนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S และกลุ่ม L ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ในระดับที่น่าสนใจ



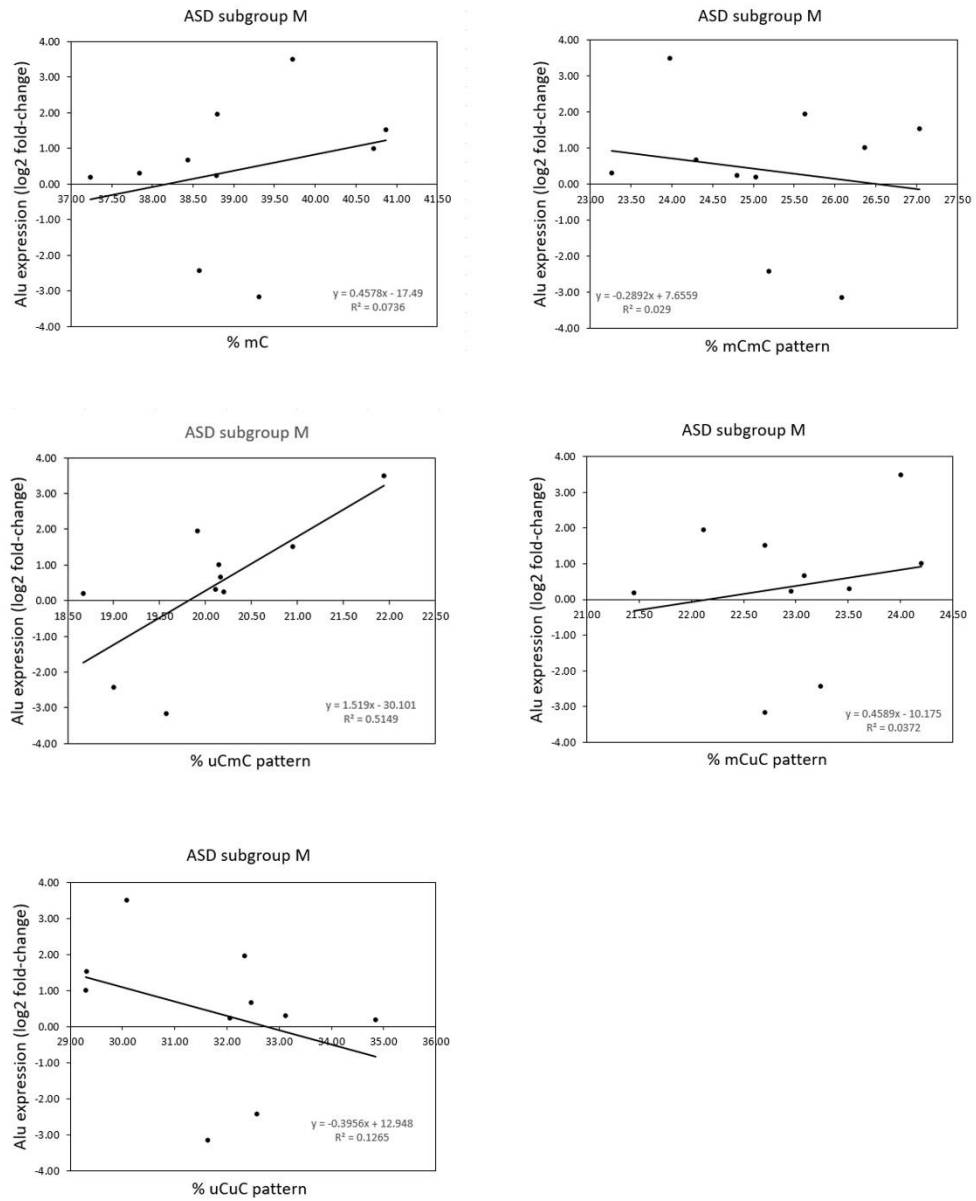
ภาพที่ 15 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มควบคุม (n=55)



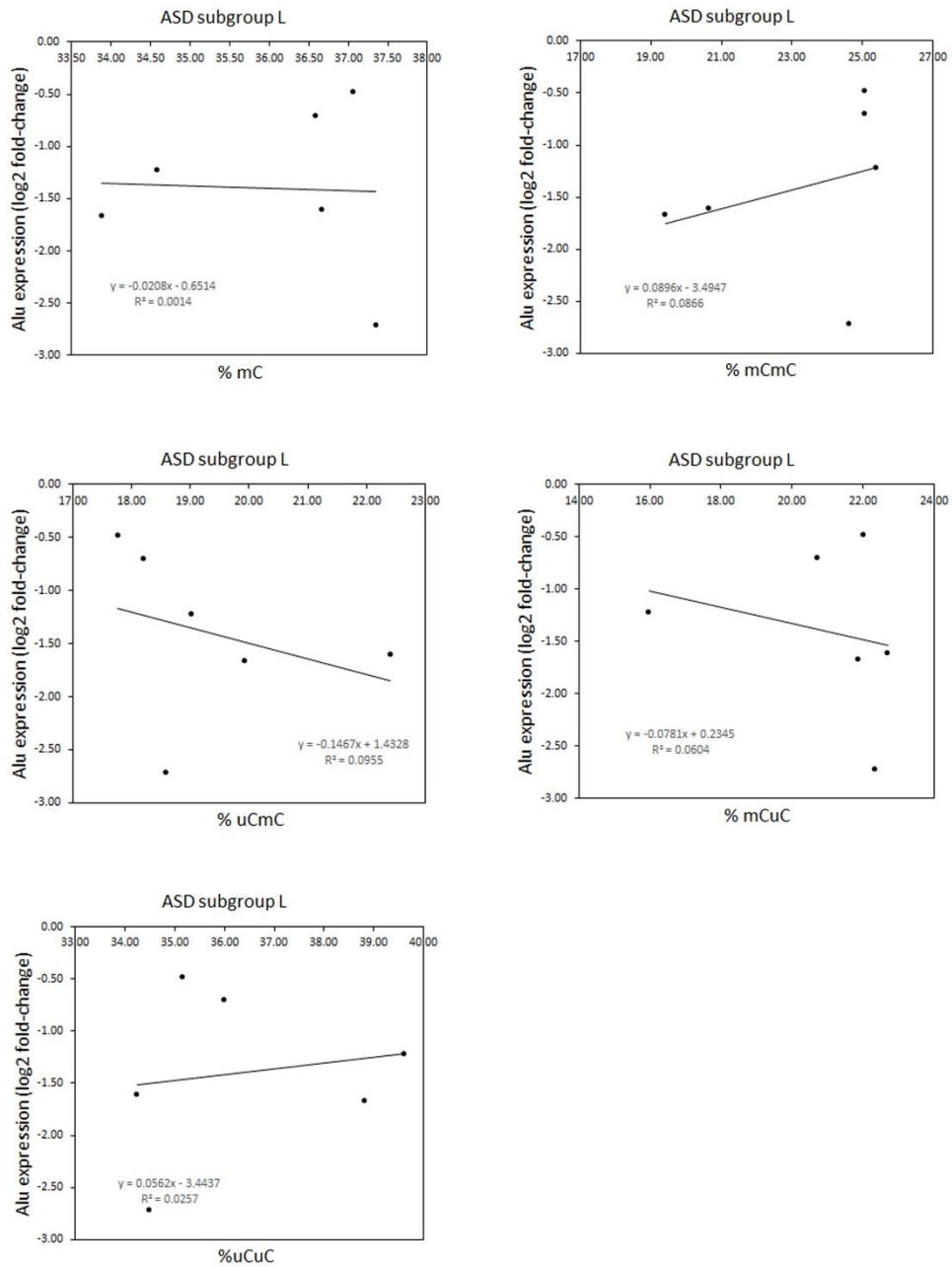
ภาพที่ 16 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (ASD, n=36)



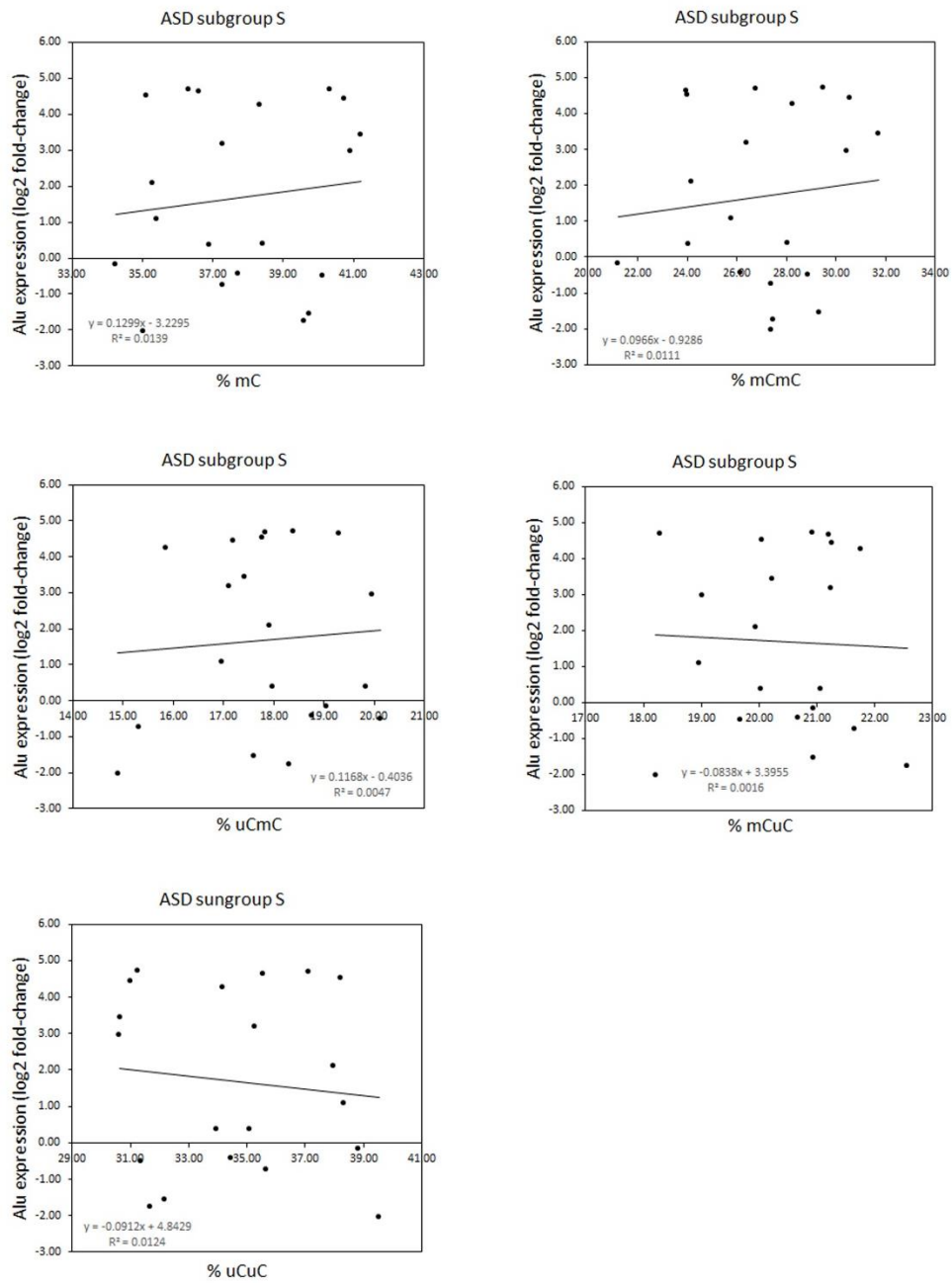
ภาพที่ 17 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของกลุ่มควบคุม (n=19)



ภาพที่ 18 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิสซึมประเภทกลุ่ม M (n=10)



ภาพที่ 19 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L (n=6)



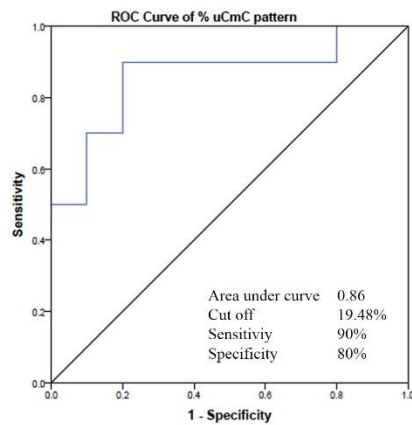
ภาพที่ 20 Correlation analysis ระหว่างปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S (n=20)

#### 4.9 ผลการวิเคราะห์ Receiver Operating Characteristic (ROC) เพื่อใช้ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของ Alu elements ในการวินิจฉัยผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม

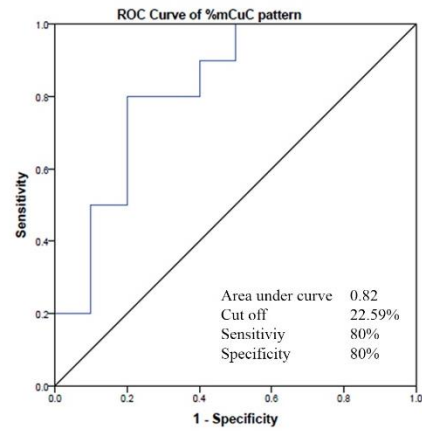
เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ หรือพัฒนาการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในเลือดของผู้ป่วยดั่งที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น มาใช้ในการจัดจำแนกผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมกลุ่มต่าง ๆ ดังนั้น ROC analysis จึงถูกนำมาใช้ในการประเมินความน่าเชื่อถือเมื่อใช้ค่าเหล่านี้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยออกจากกลุ่มควบคุม (biomarkers) โดยผลการวิเคราะห์ (ภาพที่ 21) พบว่า ในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมกลุ่ม M รูปแบบเมธิเลชันแบบ partially methylated patterns  ${}^u\text{C}^m\text{C}$  ที่ค่า cut-off เท่ากับ 19.48% จะมีค่า area under curve (AUC) เท่ากับ 0.86 โดยมีค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) อยู่ที่ 90% และ 80% ตามลำดับ ส่วน partially methylated patterns  ${}^m\text{C}^u\text{C}$  ที่มีค่า cut-off เท่ากับ 22.59% จะมีค่า AUC sensitivity และค่า specificity เท่ากับ 0.82 80% และ 80% ตามลำดับ และรูปแบบเมธิเลชันแบบ hypomethylated pattern  ${}^u\text{C}^u\text{C}$  ที่มีค่า cut-off เท่ากับ 32.70% ค่าของ AUC sensitivity และค่า specificity เท่ากับ 0.76 80% และ 70% ตามลำดับ

นอกจากนี้ในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมกลุ่ม S รูปแบบเมธิเลชันแบบ partially methylated patterns  ${}^m\text{C}^u\text{C}$  ที่มีค่า cut-off เท่ากับ 21.34% จะมีค่า AUC sensitivity และค่า specificity เท่ากับ 0.798 85% และ 70% ตามลำดับ ผลการทดลองในส่วนของวิเคราะห์ด้วย ROC แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการนำรูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ Alu elements ในการจำแนกผู้ป่วยอหิวาต์ซิมอหิวาต์ซิมที่มีความจำเพาะต่อผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมกลุ่ม M และกลุ่ม S ดังที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น อย่างไรก็ตามการทำ ROC จำเป็นต้องอาศัยกลุ่มการทดลองที่มีขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่กว่านี้ ยิ่งไปกว่านั้นในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมเองยังมีความหลากหลายทางด้านความรุนแรงและสาเหตุการเกิดโรค ดังนั้นการประเมินความรุนแรงและการจัดจำแนกผู้ป่วยอาจต้องนำสารบ่งชี้ทางชีวภาพอื่น ๆ มาใช้วิเคราะห์ร่วมกัน ซึ่งนี้อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย และยืนยันความผิดปกติทางชีววิทยาได้มากยิ่งขึ้นในอนาคต

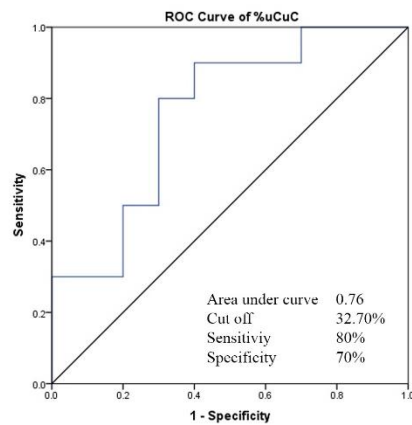




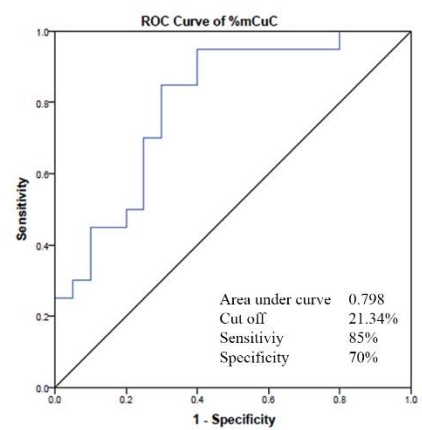
ASD subgroup M



ASD subgroup M



ASD subgroup M



ASD subgroup S

ภาพที่ 21 Receiver operating characteristic (ROC) ของรูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ *AluS* subfamilies ใน LCLs ของผู้ป่วยกลุ่ม M และกลุ่ม S ที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงระดับความน่าเชื่อถือเมื่อนำค่าดังกล่าวไปใช้เป็นตัวจำแนกผู้ป่วยออทิซึมแปรผันกลุ่ม M และกลุ่ม S ออกจากกลุ่มคนปกติ

## บทที่ 5

## อภิปรายผลการทดลอง

ออทิซึมสเปกตรัม (autism spectrum disorder) เป็นความผิดปกติทางการพัฒนาการของระบบประสาทที่มีความซับซ้อนทางด้านชีวพยาธิสภาพ ซึ่งเกิดมาจากหลายปัจจัยส่งผลให้ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีความหลากหลายทั้งระดับความรุนแรงและพฤติกรรม โดยปัจจัยทางด้านพันธุกรรมไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมได้ทั้งหมด ทำให้มีการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เพิ่มเติมในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ไม่ทราบสาเหตุมาจากพันธุกรรม (idiopathic cases) โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งหมด (gene expression profiling) ในเซลล์ไลน์จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มนี้มีรูปแบบการแสดงออกของยีนแตกต่างจากคนปกติ (Hu, Sarachana, et al., 2009) ซึ่งความผิดปกติของระดับการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมอาจเกิดมาจากปัจจัยบางอย่างที่ไปรบกวนหรือเปลี่ยนแปลงกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม เช่นการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เชื่อว่าจะจะเป็นสาเหตุของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในบริเวณที่เป็น coding regions ของในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (Nguyen et al., 2010) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีใครทำการศึกษาปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในส่วนที่เป็น repetitive elements ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมรายที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมมาก่อน Alu elements จัดเป็นสารพันธุกรรมที่มีจำนวนซ้ำ ๆ ในจีโนมจำนวนมาก และมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนและแทรกตัวเองลงในตำแหน่งต่าง ๆ ของจีโนมซึ่งสามารถรบกวนหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนในบริเวณดังกล่าว โดยที่ Alu ที่แทรกตัวอยู่อาจกลายเป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulatory elements) โดย J. Wu และคณะพบว่าการแสดงออกของ Alu elements ที่แทรกตัวอยู่ในบริเวณ promoter ของยีน epsilon-globin gene จะรบกวนการแสดงออกของยีนได้ (Wu et al., 1990) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าในลำดับเบสของ Alu elements จะมีตำแหน่งที่จำเพาะต่อ transcription factors ต่าง ๆ ที่มาจับและสามารถที่จะควบคุมการแสดงออกของ Alu elements และยีนในบริเวณที่ Alu elements แทรกตัวอยู่ได้ (Hambor et al., 1993) ซึ่งกลไกปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน เป็นกลไกที่ควบคุมหรือยับยั้งการทำงานของ Alu elements โดยมีการศึกษาที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันที่ตำแหน่ง internal promoter ของ Alu elements จะรบกวนจับของ RNA Pol III และยับยั้งกระบวนการแสดงออกของ Alu elements ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ Alu elements จะทำให้มีปริมาณของ Alu RNA เปลี่ยนแปลงไป (Kochanek et al., 1995; Sigurdsson et al., 2012; Yoder et al., 1997) นอกจากนี้ Alu elements ยังมีบทบาทในระดับ

RNA โดย Alu RNA สามารถส่งผลกระทบต่อความหลากหลายของ transcriptome ภายในเซลล์ (transcriptome diversity) ผ่านกลไกการทำงานของ RNA splicing และ RNA editing (L. L. Chen et al., 2008; Cook et al., 2013; Levanon et al., 2004; Sinnett et al., 1991) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันก็ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า Alu elements มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมอย่างไร โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทำวิจัยได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง Alu elements ต่อรูปแบบการแสดงออกของยีนในเลือด หรือเซลล์ไลน์ LCLs จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในกลุ่มที่ยังไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยาเมธิเลชันของ Alu elements ซึ่งเป็นกลไกที่ควบคุมการทำงานของ Alu elements

ในส่วนแรกของงานวิจัยนี้ผู้ทำวิจัยได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression profiles) จาก 5 งานวิจัยที่ทำการศึกษโดยใช้เลือดจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความหลากหลาย โดยนำมาวิเคราะห์ร่วมกับรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ซึ่งพบว่ากลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติในเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมียีนจำนวน 423 ยีนที่พบว่ามี การแสดงออกที่ผิดปกติร่วมกันอย่างน้อย 3 งานวิจัย ยิ่งไปกว่านั้นผลการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ด้วยโปรแกรม IPA ของกลุ่มยีนที่ผิดปกติดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงบทบาทความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท และยังเกี่ยวข้องกับโรคที่มีลักษณะความผิดปกติคล้ายกับโรคออทิซึมสเปกตรัมเช่น cognitive impairment mental retardation และ neuritogenesis (ตารางที่ 9 และ 10) โดยเครือข่ายควบคุมยีนที่วิเคราะห์ได้เกี่ยวข้องกับ nervous system development and function (ภาพที่ 10) ได้แสดงให้เห็นปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่กับโมเลกุลอื่น ๆ ที่มีบทบาทต่อกระบวนการพัฒนาการของใยประสาท (neuritogenesis) เช่น neurite outgrowth นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับกลไกทางชีวโมเลกุลที่ได้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมได้แก่ estrogen receptor signaling androgen signaling neurotrophin/TRK signaling circadian rhythm signaling protein ubiquitination pathway และ ERK/MAPK signaling (Altun, Kurutas, Sahin, Sinir, & Findikli, 2017; Brailoiu et al., 2007; Cetin et al., 2017; Corbett, Mendoza, Abdullah, Wegelin, & Levine, 2006; Correia et al., 2010; Crider, Pandya, Peter, Ahmed, & Pillai, 2014; Crider, Thakkar, Ahmed, & Pillai, 2014; Hazell et al., 2009; Mukaetova-Ladinska, Arnold, Jaros, Perry, & Perry, 2004) ในปัจจุบันพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง estrogen and androgen signaling pathways เป็นสาเหตุที่ทำให้เพศชายมีโอกาสที่จะเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม

สูงกว่าเพศหญิง โดยฮอร์โมน testosterone เป็นฮอร์โมนเพศชาย (androgens) ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ testosterone ในขณะตั้งครรภ์มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม และมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของพฤติกรรมทางด้านสังคม การใช้ภาษา และการเรียนรู้ (Auyeung et al., 2009; Knickmeyer, Baron-Cohen, Raggatt, Taylor, & Hackett, 2006; Tordjman, Ferrari, Sulmont, Duyme, & Roubertoux, 1997; Whitehouse et al., 2010) นอกจากนี้ testosterone ยังเป็นฮอร์โมนตั้งต้นสำหรับเปลี่ยนเป็นฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ เช่น ฮอร์โมน estrogen และ androgen dihydrotestosterone (DHT) ซึ่งฮอร์โมนทั้งสามมีกลไกควบคุมการทำงานที่มีความเกี่ยวข้องกันและมีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยในการศึกษาก่อนหน้าพบว่าระดับฮอร์โมน testosterone ในเซลล์ไลน์ชนิด LCLs ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีระดับสูงกว่าคนปกติ (Hu, Nguyen, et al., 2009) นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า ยีน retinoic acid-related (RAR) orphan receptor-alpha (*RORA*) และโปรตีนของยีนนี้ทำหน้าที่เป็น hormone-dependent transcription factor ที่ควบคุมการทำงานของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม และยีนที่ชื่อว่า CYP19A1 (aromatase) ซึ่งผลิตเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนฮอร์โมน testosterone เป็นฮอร์โมน estrogen โดยพบว่าโปรตีน *RORA* มีระดับการแสดงออกที่ลดลงทั้งในสมองและเซลล์ไลน์ LCLs จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และยังพบว่าระดับของโปรตีน *RORA* และ aromatase ในสมองส่วน frontal cortex ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศชายมีระดับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสมองจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพศหญิง ซึ่งการลดลงของเอนไซม์ aromatase ทำให้การเปลี่ยนฮอร์โมน testosterone เป็นฮอร์โมน estrogen ลดลงด้วยและได้ส่งผลให้ระดับฮอร์โมน testosterone ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *RORA* ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน androgen แบบ negative regulation และควบคุมโดย estrogen แบบ positive regulation ตามลำดับ (Hu, Nguyen, et al., 2009; Hu, Sarachana, Sherrard, & Kocher, 2015; Sarachana & Hu, 2013; Sarachana, Xu, Wu, & Hu, 2011) ฮอร์โมน estrogen มีความเกี่ยวข้องกระบวนการทางชีววิทยาต่าง ๆ ของระบบประสาทตัวอย่างเช่น neuronal repair, synaptic transmission enhancement, neurogenesis, and synaptic plasticity และ cognition regulation (Brailoiu et al., 2007; Gruber, Tschugguel, Schneeberger, & Huber, 2002; Hazell et al., 2009) การศึกษาก่อนหน้าที่ทำการศึกษาในโรคออทิซึมสเปกตรัมพบว่าระดับการแสดงออกของ estrogen receptor beta (*ERβ*) ทั้งโปรตีนและ mRNA ในสมองส่วน middle frontal gyrus ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีระดับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสมองของคนปกติ (Crider, Thakkar, et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่า G protein-coupled estrogen receptor ในซีรัมของเด็กที่ป่วยเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีระดับลดลงเมื่อเทียบกับเด็กปกติ (Altun et al., 2017) โดยบทบาทของยีน *RORA* ที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนนอกเหนือจากที่กล่าวไปแล้วข้างต้น *RORA* ยัง

เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของนาฬิกาชีวภาพหรือ circadian rhythm system อีกด้วยโดยการสำรวจในเด็กออทิสซึมสเปกตรัมที่มีอายุระหว่าง 2-5 ขวบพบว่าเด็กออทิสซึมสเปกตรัมมากกว่าร้อยละ 53 จะมีปัญหาเรื่องการหลับนอน (sleep problems) เช่น นอนไม่หลับ (Krakowiak, Goodlin-Jones, Hertz-Picciotto, Croen, & Hansen, 2008) ซึ่งในการศึกษานี้ผู้ทำวิจัยก็พบว่ากลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่และผิดปกติในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมก็มีความเกี่ยวข้องกับ circadian rhythm signaling (ตารางที่ 10)

neurotrophin/TRK signaling เป็นอีกหนึ่งกลไกที่น่าสนใจโดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของ brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการพัฒนาการของระบบประสาท เช่น synapse formation and plasticity และ neural proliferation and differentiation โดย BDNF เป็นโปรตีนที่สามารถพบได้ทั้งในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) และเลือด (peripheral blood) การศึกษาในหนูยังพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในระบบประสาทส่วนกลางและเลือดของหนูมีระดับที่ใกล้เคียงกัน (Karege, Schwald, & Cisse, 2002; Nickl-Jockschat & Michel, 2011) นอกจากนี้การศึกษาของ Fernandes และคณะพบว่าในผู้ป่วยโรคจิตเภท (schizophrenia) ระดับการของโปรตีน BDNF ในเลือดของผู้ป่วยจิตเภทมีระดับลดลงและสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่ทำการศึกษาในสมองของผู้ป่วยจิตเภทที่พบว่ามีการแสดงออกของ BDNF ลดลงเช่นเดียวกัน (Fernandes et al., 2015) สำหรับในโรคออทิสซึมสเปกตรัมพบว่าระดับของโปรตีน BDNF ใน plasma หรือ serum ของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับคนปกติซึ่งพบได้ทั้งมีระดับที่สูงกว่าคนปกติและต่ำกว่าคนปกติขึ้นอยู่กับลักษณะของกลุ่มตัวอย่างของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมอย่างเช่นในการศึกษาของ Kasarpalkar และคณะในปี ค.ศ.2014 ที่ทำการศึกษาระดับ BDNF ในซีรัมของเด็กออทิสซึมสเปกตรัมพบว่าระดับของโปรตีน BDNF มีความแตกต่างจากเด็กปกติ โดยพบว่าระดับ BDNF เพิ่มสูงขึ้นในเด็กที่เป็นโรคออทิสซึมสเปกตรัมที่มีระดับความรุนแรงน้อย (clinically milder phenotype) ส่วนเด็กที่เป็นโรคออทิสซึมสเปกตรัมชนิดที่มีความรุนแรงมาก (clinically severe phenotype) พบว่าระดับของโปรตีน BDNF ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือเด็กที่ไม่ได้เป็นโรค นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อจำแนกตามเพศแล้วพบว่าในเด็กออทิสซึมสเปกตรัมเพศหญิงที่มีระดับความรุนแรงของโรคจะมีระดับของโปรตีน BDNF ลดลงเมื่อเทียบกับเด็กปกติ ในขณะที่เพศชายไม่แตกต่างกับเด็กปกติ (Kasarpalkar, Kothari, & Dave, 2014) ส่วน ubiquitination pathway ก็เป็นอีกหนึ่งกลไกที่มีความสำคัญกับ synaptic plasticity ของเซลล์ประสาทเช่นเดียวกัน โดย ubiquitination หรือ ubiquitin-proteasome system เป็นกลไกที่ควบคุมระดับและองค์ประกอบของโปรตีนในเซลล์ ซึ่งกลไกนี้เป็นการสลายโปรตีน (protein degradation) และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

ส่วนประกอบ และการกระจายตัวของโปรตีนบริเวณ postsynaptic density ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ synapse ได้ (Ehlers, 2003; Mabb & Ehlers, 2010) โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า GABA<sub>A</sub>α1 protein ในสมองส่วน frontal cortex ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุของความผิดปกติได้ (Fatemi, Reutiman, Folsom, & Thuras, 2009) ต่อมา Crider และคณะได้ทำการศึกษาในสมองส่วน postmortem middle frontal gyrus tissues ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมพบว่าการลดลงของโปรตีน GABA<sub>A</sub>α1 ในสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมซึ่งการลดลงมีความสัมพันธ์กับระดับของโปรตีน E3 ubiquitin ligase ในสมองส่วน middle frontal gyrus ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม นอกจากนี้การทดลองในหนูทดลองยังพบว่าการ knockdown ยีนที่ผลิตโปรตีน E3 ubiquitin ligase จะทำให้ระดับของโปรตีน GABA<sub>A</sub>α1 เพิ่มขึ้น (Crider, Pandya, et al., 2014)

ในขั้นตอนการศึกษาโดยใช้เซลล์ไลน์ชนิด LCLs เป็นโมเดลสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Alu elements กับรูปแบบการแสดงออกของยีนด้วยการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของ AluS subfamilies ทั้งจีโนม (global AluS methylation analysis) เริ่มจากนำรูปแบบการแสดงออกของยีนทั้ง 56 LCLs ที่รวบรวมมาจากฐานข้อมูล GEO DataSets และนำมาวิเคราะห์ใหม่โดยใช้โปรแกรม CU-DREAMx พบว่า AluS subfamilies ไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มควบคุม (ASD vs Control) และเนื่องจากกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีความหลากหลายทางด้านชีววิทยา และความรุนแรงของโรค (heterogeneous population) ผู้ทำวิจัยจึงแบ่งผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มตามลักษณะความผิดปกติของพฤติกรรมทางคลินิกของผู้ป่วยซึ่งได้จัดทำโดย Hu และ Steinberg โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมช่วยให้สามารถบ่งชี้ความผิดปกติที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะของแต่ละกลุ่มย่อยของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ (Hu, Sarachana, et al., 2009; Hu & Steinberg, 2009) โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีระดับความรุนแรงปานกลาง หรือกลุ่ม M และกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับความสามารถพิเศษ หรือกลุ่ม S กลุ่มยีนที่มี AluS subfamilies แทรกตัวอยู่มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า AluS subfamilies น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของกลุ่มยีนเหล่านี้ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M และกลุ่ม S ตามลำดับนอกจากนี้ผู้ทำวิจัยได้ทำการคัดเลือกยีนที่น่าจะมีความสำคัญ (candidate gene) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M โดยใช้การวิเคราะห์ที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง (SAM, %FDR<0.05) ซึ่งพบว่ามี 5 ยีนที่มีความผิดปกติ (ตารางที่ 8) และ 2 ใน 5 ยีนเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมมาก่อนได้แก่ยีน *GNAS* และ *TRIM33* (Kim, Gonen, Hanna, Leventhal, & Cook, 2000; Xia et al., 2014) นอกจากนี้

ผลการวิเคราะห์ระดับและรูปแบบการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันของ AluS subfamilies ให้ผลที่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนข้างต้น โดยการเปรียบเทียบระดับเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อทำการแบ่งผู้ป่วยออกเป็นกลุ่ม ๆ ก็พบว่าร้อยละของรูปแบบปฏิกิริยาเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในผู้ป่วยกลุ่ม M และ S มีความแตกต่างจากกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 15) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของกลุ่มยีนที่ผิดปกติในผู้ป่วยกลุ่ม M แสดงให้เห็นถึงบทบาทของกลุ่มยีนเหล่านั้นว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานระบบประสาท และกลไกอื่น ๆ ที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม (ตารางที่ 12 และ 13) ในลำดับต่อมาเพื่อวิเคราะห์ว่ารูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies ว่าการเกิดเมธิเลชันรูปแบบใดที่น่าจะส่งผล หรือไปควบคุมระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ผู้ทำวิจัยจึงได้นำผลการวิเคราะห์มาหาความสัมพันธ์ (correlation analysis) โดยพบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M นั้นรูปแบบการเกิดเมธิเลชันแบบ partially methylated patterns  $^{u}C^{m}C$  ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยกลุ่มนี้ มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ในระดับระดับปานกลาง (moderate relationship,  $R^2=0.5149$ ) โดยเมื่อร้อยละของรูปแบบเมธิเลชัน  $^{u}C^{m}C$  เพิ่มสูงขึ้นพบว่าระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies เพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งผู้ทำวิจัยไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ในลักษณะนี้ในกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ ทั้งผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มควบคุมซึ่งหมายความว่ารูปแบบเมธิเลชัน  $^{u}C^{m}C$  น่าจะเป็นรูปแบบที่ควบคุมการแสดงออกของ AluS subfamilies และเป็นรูปแบบที่มีความจำเพาะในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M แต่อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุตรงกัน เนื่องมาจากการแสดงออกของ AluS subfamilies อาจถูกควบคุมด้วยกลไกอื่น ๆ ภายในเซลล์หรือในผู้ป่วยกลุ่มนี้และกลุ่มควบคุมอาจกลไกการควบคุมการแสดงออกของ AluS subfamilies ด้วยกลไกที่แตกต่างกันทำให้เมื่อทำการวัดระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies จึงไม่พบความแตกต่าง ส่วนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S มีระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุตรงกัน แต่พบว่าระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies รูปแบบใด ๆ เลยซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S กลไกที่ควบคุมการแสดงออกของ AluS subfamilies อาจเกิดจากความผิดปกติของกลไกอื่นที่ควบคุมการทำงานของ AluS นอกเหนือจากกลไกการเกิดเมธิเลชัน ส่วนในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความผิดปกติด้านภาษา หรือกลุ่ม L พบว่าระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S อย่างไรก็ตามความผิดปกติของการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันและ

การแสดงออก AluS subfamilies ไม่ได้มีผลเพียงแค่การทำงานและปริมาณของ AluS subfamilies เท่านั้นหากพิจารณาถึงบทบาทของ Alu elements (ภาพที่ 4) จะเห็นได้ว่า Alu elements มีบทบาทต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ทั้งระดับ DNA และ RNA ซึ่งอาจทำให้รูปแบบ transcriptome ในเซลล์ผิดปกติไปด้วย (Luo et al., 2014) ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็ได้ออกมาให้เห็นว่า Alu elements มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติไปในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

เนื่องจากในปัจจุบันโรคออทิซึมสเปกตรัมยังไม่มีสารบ่งชี้ทางชีวภาพใด ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมอีกทั้งวิธีที่เป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในปัจจุบันได้แก่ ADI-R ซึ่งเป็นการวินิจฉัยโดยการทำแบบสอบถามซึ่งมีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาด หรือความเอนเอียงได้สูงมาก ดังนั้นจึงยังคงมีความจำเป็นอย่างมากจะต้องพัฒนาสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจากความผิดปกติทางชีววิทยาในผู้ป่วยแทนการใช้แบบสอบถาม ซึ่งในงานวิจัยนี้ ROC analysis ถูกนำมาช่วยในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพเมื่อใช้รูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies ในการจำแนกผู้ป่วย โดยผลการวิเคราะห์ (ภาพที่ 21) ได้แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเกิดเมธิเลชันที่ผิดปกติมีความจำเพาะและความไวในการจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมบางกลุ่มโดยเฉพาะผู้ป่วยกลุ่ม M และ S ส่วนในที่จะใช้จำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดนั้นพบว่ายังขาดประสิทธิภาพในการจำแนก เนื่องจากกลุ่มผู้ป่วยทุกรายไม่ได้มีความผิดปกติของระดับเมธิเลชันของ AluS subfamilies ดังนั้นการนำสารบ่งชี้ชีวภาพอื่น ๆ มาใช้วิเคราะห์ร่วมกันอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกของสารบ่งชี้ทั้งหมดได้ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ ROC จำเป็นต้องใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่กว่านี้เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของการนำรูปแบบเมธิเลชันของ AluS subfamilies มาใช้เป็นสารบ่งชี้สำหรับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมในอนาคต

การค้นพบจากงานวิจัยนี้เป็นหลักฐานที่แสดงความเป็นไปได้ว่า Alu elements อาจมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของยีนในโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยความเกี่ยวข้องนั้นอาจมีความจำเพาะเจาะจงต่อบางกลุ่มย่อยของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และยังคงแสดงให้เห็นว่าประชากรผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีกลไกทางพันธุกรรมที่หลากหลาย (heterogeneity) ซึ่งการศึกษาวินิจฉัยเพื่อหาสาเหตุของโรคโดยแบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มย่อยจะช่วยลดความหลากหลาย ทำให้ค้นพบกลไกทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญอย่างจำเพาะต่อแต่ละกลุ่มได้ดีกว่าการรวมผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทุก ๆ คนเป็นกลุ่มเดียว



## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง ข้อเสนอแนะ และข้อจำกัดงานวิจัย

ในการศึกษานี้พบว่า Alu elements มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยการวิเคราะห์แบบ meta-analysis ที่ใช้รูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression profiles) จาก 5 การศึกษาแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่กับกลุ่มยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเลือดหรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มยีนเหล่านี้มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันและมีหน้าที่ที่สำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท และโรคทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม และเมื่อทำการศึกษาใน 56 เซลล์ไลน์ที่นำมาใช้ในการทดลองนั้นพบว่า AluS subfamilies มีความเกี่ยวข้องกับยีนที่ผิดปกติในเซลล์จากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยจำเพาะต่อกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีระดับความรุนแรงปานกลาง (M) และกลุ่มที่มีความสามารถพิเศษ (S) แต่ไม่มีนัยสำคัญเมื่อนำผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดมารวมกันเป็นกลุ่มเดียว สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันของ AluS subfamilies ก็พบว่ารูปแบบการเกิดเมธิเลชันในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M และกลุ่ม S มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุตรงกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อนำรูปแบบเมธิเลชันที่มีผิดปกติ และมีความจำเพาะกับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M และ S นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการเกิดเมธิเลชันที่ผิดปกติดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M และกลุ่ม S ออกจากกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุตรงกัน จากการค้นพบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการศึกษาวิจัยเพื่อหาสาเหตุของโรคออทิซึมสเปกตรัมที่มีกลไกทางพันธุกรรมที่หลากหลาย (heterogeneity) โดยแบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มย่อยจะช่วยลดความหลากหลาย และทำให้ค้นพบกลไกทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญอย่างจำเพาะต่อแต่ละกลุ่มได้ดีกว่าการรวมผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทุก ๆ คนเป็นกลุ่มเดียวกัน

สำหรับการศึกษาในอนาคตนั้นอาจมีการศึกษาบทบาทของ Alu ระดับการแสดงออกของยีนที่มีความจำเพาะกับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มเพิ่มเติม เช่นการศึกษาที่จำเพาะลงไปส่วนของยีนที่มีความสำคัญกับโรคออทิซึมสเปกตรัม รวมถึงการศึกษากลไกควบคุมการแสดงออกของ Alu elements ที่นอกเหนือจากปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันที่คาดว่าจะมีความผิดปกติที่แตกต่างกันในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มย่อยดังที่พบในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของ AluS ที่พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม L มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ แต่ระดับเมธิเลชันกลับไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งได้ทำการอภิปรายผลการทดลองส่วนนี้ไว้ในบทการอภิปรายผลการทดลองเป็นที่เรียบร้อยแล้ว นอกจากนี้อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Alu elements ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งการศึกษาก่อนหน้าพบว่าความผิดปกติทางกลไกอนุชีววิทยาในเลือดนั้นมี

ความสอดคล้องกับความผิดปกติทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นในสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และจะเป็นหลักฐานยืนยันถึงบทบาทความสำคัญของ Alu elements ในโรคออทิซึมสเปกตรัมในอนาคต

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ AluS subfamilies โดยทำการวิเคราะห์เฉลี่ยในทุก copies ของ AluS subfamilies ทั้งจีโนมทำให้ไม่ทราบถึงระดับเมธิเลชันของ AluS ที่แทรกอยู่ภายในยีนที่น่าจะมีความสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ทำให้เราทราบถึงกลุ่มยีนที่มี AluS แทรกตัวอยู่และผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท มากไปกว่านั้นผลการค้นพบในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติที่จำเพาะในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มซึ่งในอนาคตจะช่วยให้เลือกกลุ่มของผู้ป่วยที่มีความจำเพาะกับความผิดปกติของเมธิเลชันของ AluS subfamilies เพื่อทำการศึกษาในเชิงลึกได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การศึกษานี้ใช้เซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมซึ่งในความเป็นจริงแล้วนั้นความผิดปกติทางพยาธิสภาพของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเกิดขึ้นที่สมอง แต่อย่างไรก็ตามเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ยากในการศึกษาวิจัยที่จะนำสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมขณะยังมีชีวิตอยู่มาทำการศึกษาระดับปฏิบัติการเมธิเลชันเพื่อบ่งบอกถึงความผิดปกติในผู้ป่วย อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันเป็นกลไกที่เปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม และอายุซึ่งการนำสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตแล้วนั้นมากทำการวิเคราะห์อาจไม่บ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้น เพื่อช่วยพัฒนาสารบ่งชี้ได้ในอนาคตจึงก็ได้มีการศึกษาระดับการเกิดเมธิเลชันในสมอง และเลือดเพื่อพิสูจน์ว่าสามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันได้หรือไม่ ซึ่งพบว่าการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชันในเลือดและสมองมีความสอดคล้องกันและสามารถใช้เป็นตัวคาดการณ์ถึงความผิดปกติในสมองได้ (Horvath et al., 2012; Masliah et al., 2013) อีกปัจจัยหนึ่งจะส่งผลต่อระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันได้คือจำนวน passage ของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้เซลล์ไลน์ที่มาจากลือดการผลิตเดียวกัน นอกจากนั้นในขั้นตอนดำเนินการวิจัยทั้งหมดเซลล์ไลน์จากคนปกติ และผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมผ่านกระบวนการที่ควบคุมเหมือนกันทุกประการ และอีกปัจจัยหนึ่งคือจำนวนของผู้ป่วยออทิซึมแต่กลุ่มมีจำนวนไม่เท่ากันอาจทำให้เกิดความเอนเอียงของผลการวิเคราะห์ไปทางด้านใดด้านหนึ่งของกลุ่มผู้ป่วยที่มีจำนวนมากกว่าได้ นอกจากนี้ในขั้นตอนการวัดระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies พบว่ามีเซลล์ไลน์จำนวนหนึ่งเซลล์ไลน์จากกลุ่มควบคุมที่ไม่สามารถวัดระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies ได้จึงได้ทำการตัดเซลล์ไลน์นั้นออกจากกลุ่มตัวอย่างในขั้นตอนการวัดระดับการแสดงออกของ AluS subfamilies และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation analysis) ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาดีเอ็นเอเมธิเลชัน และการแสดงออกของ AluS subfamilies

## รายการอ้างอิง

- Abramson, R. K., Wright, H. H., Carpenter, R., Brennan, W., Lumpuy, O., Cole, E., & Young, S. R. (1989). Elevated blood serotonin in autistic probands and their first-degree relatives. *J Autism Dev Disord*, 19(3), 397-407.
- Alter, M. D., Kharkar, R., Ramsey, K. E., Craig, D. W., Melmed, R. D., Grebe, T. A., . . . Stephan, D. A. (2011). Autism and increased paternal age related changes in global levels of gene expression regulation. *PLoS One*, 6(2), e16715. doi:10.1371/journal.pone.0016715
- Altun, H., Kurutas, E. B., Sahin, N., Sinir, H., & Findikli, E. (2017). Decreased levels of G protein-coupled estrogen receptor in children with autism spectrum disorders. *Psychiatry Res*, 257, 67-71. doi:10.1016/j.psychres.2017.06.008
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 23(2), 185-188. doi:10.1038/13810
- Anderson, G. M., Hertzig, M. E., & McBride, P. A. (2012). Brief report: Platelet-poor plasma serotonin in autism. *J Autism Dev Disord*, 42(7), 1510-1514. doi:10.1007/s10803-011-1371-1
- Aporntewan, C., & Mutirangura, A. (2011). Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays (CU-DREAM): a physiogenomic discovery tool. In *Asian Biomedicine* (Vol. 5, pp. 257).
- Arlington, V. A. P. P. (2013). Autism Spectrum Disorder. In *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*: American Psychiatric Association.
- Auyeung, B., Baron-Cohen, S., Ashwin, E., Knickmeyer, R., Taylor, K., & Hackett, G. (2009). Fetal testosterone and autistic traits. *Br J Psychol*, 100(Pt 1), 1-22. doi:10.1348/000712608X311731
- Bao, W., Kojima, K. K., & Kohany, O. (2015). Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mob DNA*, 6, 11. doi:10.1186/s13100-015-0041-9

- Barrett, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., . . . Soboleva, A. (2011). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D1005-1010. doi:10.1093/nar/gkq1184
- Batzer, M. A., & Deininger, P. L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*, 3(5), 370-379. doi:10.1038/nrg798
- Batzer, M. A., Deininger, P. L., Hellmann-Blumberg, U., Jurka, J., Labuda, D., Rubin, C. M., . . . Zuckerkandl, E. (1996). Standardized nomenclature for Alu repeats. *J Mol Evol*, 42(1), 3-6.
- Bennett, E. A., Keller, H., Mills, R. E., Schmidt, S., Moran, J. V., Weichenrieder, O., & Devine, S. E. (2008). Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Res*, 18(12), 1875-1883. doi:10.1101/gr.081737.108
- Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., . . . Dun, N. J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol*, 193(2), 311-321. doi:10.1677/JOE-07-0017
- Cetin, I., Tezdig, I., Tarakcioglu, M. C., Kadak, M. T., Demirel, O. F., Ozer, O. F., . . . Dogangun, B. (2017). Do Low Serum UCH-L1 and TDP-43 Levels Indicate Disturbed Ubiquitin-Proteasome System in Autism Spectrum Disorder? *Noro Psikiyatr Ars*, 54(3), 267-271. doi:10.5152/npa.2017.14873
- Chen, L. L., DeCerbo, J. N., & Carmichael, G. G. (2008). Alu element-mediated gene silencing. *EMBO J*, 27(12), 1694-1705. doi:10.1038/emboj.2008.94
- Chen, Z. X., & Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 286(21), 18347-18353. doi:10.1074/jbc.R110.205286
- Christensen, D. L., Baio, J., Braun, K. V., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., . . . Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ*, 65(3), 1-23. doi:10.15585/mmwr.ss6503a1
- Cook, G. W., Konkel, M. K., Walker, J. A., Bourgeois, M. G., Fullerton, M. L., Fussell, J. T., . . . Batzer, M. A. (2013). A comparison of 100 human genes using an alu

- element-based instability model. *PLoS One*, 8(6), e65188.  
doi:10.1371/journal.pone.0065188
- Corbett, B. A., Mendoza, S., Abdullah, M., Wegelin, J. A., & Levine, S. (2006). Cortisol circadian rhythms and response to stress in children with autism. *Psychoneuroendocrinology*, 31(1), 59-68. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.05.011
- Correia, C. T., Coutinho, A. M., Sequeira, A. F., Sousa, I. G., Lourenco Venda, L., Almeida, J. P., . . . Vicente, A. M. (2010). Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav*, 9(7), 841-848. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00627.x
- Crider, A., Pandya, C. D., Peter, D., Ahmed, A. O., & Pillai, A. (2014). Ubiquitin-proteasome dependent degradation of GABAAalpha1 in autism spectrum disorder. *Mol Autism*, 5, 45. doi:10.1186/2040-2392-5-45
- Crider, A., Thakkar, R., Ahmed, A. O., & Pillai, A. (2014). Dysregulation of estrogen receptor beta (ERbeta), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects. *Mol Autism*, 5(1), 46. doi:10.1186/2040-2392-5-46
- Dachtler, J., Ivorra, J. L., Rowland, T. E., Lever, C., Rodgers, R. J., & Clapcote, S. J. (2015). Heterozygous deletion of alpha-neurexin I or alpha-neurexin II results in behaviors relevant to autism and schizophrenia. *Behav Neurosci*, 129(6), 765-776. doi:10.1037/bne0000108
- Deininger, P. (2011). Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*, 12(12), 236. doi:10.1186/gb-2011-12-12-236
- Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., . . . Bourgeron, T. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*, 39(1), 25-27. doi:10.1038/ng1933
- Edgar, R., Domrachev, M., & Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*, 30(1), 207-210.

- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, 6(3), 231-242.  
doi:10.1038/nn1013
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., & Thuras, P. D. (2009). GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J Autism Dev Disord*, 39(2), 223-230. doi:10.1007/s10803-008-0646-7
- Fernandes, B. S., Steiner, J., Berk, M., Molendijk, M. L., Gonzalez-Pinto, A., Turck, C. W., . . . Goncalves, C. A. (2015). Peripheral brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and the role of antipsychotics: meta-analysis and implications. *Mol Psychiatry*, 20(9), 1108-1119. doi:10.1038/mp.2014.117
- Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Graff, J., Linder, N., Michalon, A., . . . Mansuy, I. M. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol Psychiatry*, 68(5), 408-415. doi:10.1016/j.biopsych.2010.05.036
- Fruhmesser, A., Blake, J., Haberlandt, E., Baying, B., Raeder, B., Runz, H., . . . Kotzot, D. (2013). Disruption of EXOC6B in a patient with developmental delay, epilepsy, and a de novo balanced t(2;8) translocation. *Eur J Hum Genet*, 21(10), 1177-1180. doi:10.1038/ejhg.2013.18
- Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (2011). Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*, 128(2), 344-355. doi:10.1542/peds.2010-1036
- Grayson, D. R., & Guidotti, A. (2016). Merging data from genetic and epigenetic approaches to better understand autistic spectrum disorder. *Epigenomics*, 8(1), 85-104. doi:10.2217/epi.15.92
- Grayton, H. M., Missler, M., Collier, D. A., & Fernandes, C. (2013). Altered social behaviours in neurexin 1alpha knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders. *PLoS One*, 8(6), e67114. doi:10.1371/journal.pone.0067114
- Gregg, J. P., Lit, L., Baron, C. A., Hertz-Picciotto, I., Walker, W., Davis, R. A., . . . Sharp, F. R. (2008). Gene expression changes in children with autism. *Genomics*, 91(1), 22-29. doi:10.1016/j.ygeno.2007.09.003

- Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J. C. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 346(5), 340-352.  
doi:10.1056/NEJMra000471
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., . . . Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 68(11), 1095-1102.  
doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.76
- Hambor, J. E., Mennone, J., Coon, M. E., Hanke, J. H., & Kavathas, P. (1993). Identification and characterization of an Alu-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 alpha gene. *Mol Cell Biol*, 13(11), 7056-7070.
- Hazell, G. G., Yao, S. T., Roper, J. A., Prossnitz, E. R., O'Carroll, A. M., & Lolait, S. J. (2009). Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol*, 202(2), 223-236. doi:10.1677/JOE-09-0066
- Horvath, S., Zhang, Y., Langfelder, P., Kahn, R. S., Boks, M. P., van Eijk, K., . . . Ophoff, R. A. (2012). Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biol*, 13(10), R97. doi:10.1186/gb-2012-13-10-r97
- Hu, V. W., Nguyen, A., Kim, K. S., Steinberg, M. E., Sarachana, T., Scully, M. A., . . . Lee, N. H. (2009). Gene expression profiling of lymphoblasts from autistic and nonaffected sib pairs: altered pathways in neuronal development and steroid biosynthesis. *PLoS One*, 4(6), e5775. doi:10.1371/journal.pone.0005775
- Hu, V. W., Sarachana, T., Kim, K. S., Nguyen, A., Kulkarni, S., Steinberg, M. E., . . . Lee, N. H. (2009). Gene expression profiling differentiates autism case-controls and phenotypic variants of autism spectrum disorders: evidence for circadian rhythm dysfunction in severe autism. *Autism Res*, 2(2), 78-97.  
doi:10.1002/aur.73
- Hu, V. W., Sarachana, T., Sherrard, R. M., & Kocher, K. M. (2015). Investigation of sex differences in the expression of RORA and its transcriptional targets in the brain as a potential contributor to the sex bias in autism. *Mol Autism*, 6, 7.  
doi:10.1186/2040-2392-6-7

- Hu, V. W., & Steinberg, M. E. (2009). Novel clustering of items from the Autism Diagnostic Interview-Revised to define phenotypes within autism spectrum disorders. *Autism Res*, 2(2), 67-77. doi:10.1002/aur.72
- Karege, F., Schwald, M., & Cisse, M. (2002). Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*, 328(3), 261-264.
- Kasarpalkar, N. J., Kothari, S. T., & Dave, U. P. (2014). Brain-Derived Neurotrophic Factor in children with Autism Spectrum Disorder. *Ann Neurosci*, 21(4), 129-133. doi:10.5214/ans.0972.7531.210403
- Kim, S. J., Gonen, D., Hanna, G. L., Leventhal, B. L., & Cook, E. H., Jr. (2000). Deletion polymorphism in the coding region of the human NESP55 alternative transcript of GNAS1. *Mol Cell Probes*, 14(3), 191-194. doi:10.1006/mcpr.2000.0300
- Knickmeyer, R., Baron-Cohen, S., Raggatt, P., Taylor, K., & Hackett, G. (2006). Fetal testosterone and empathy. *Horm Behav*, 49(3), 282-292. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.08.010
- Kochanek, S., Renz, D., & Doerfler, W. (1995). Transcriptional silencing of human Alu sequences and inhibition of protein binding in the box B regulatory elements by 5'-CG-3' methylation. *FEBS Lett*, 360(2), 115-120.
- Kong, S. W., Collins, C. D., Shimizu-Motohashi, Y., Holm, I. A., Campbell, M. G., Lee, I. H., . . . Kohane, I. S. (2012). Characteristics and predictive value of blood transcriptome signature in males with autism spectrum disorders. *PLoS One*, 7(12), e49475. doi:10.1371/journal.pone.0049475
- Krakowiak, P., Goodlin-Jones, B., Hertz-Picciotto, I., Croen, L. A., & Hansen, R. L. (2008). Sleep problems in children with autism spectrum disorders, developmental delays, and typical development: a population-based study. *J Sleep Res*, 17(2), 197-206. doi:10.1111/j.1365-2869.2008.00650.x
- Kriegs, J. O., Churakov, G., Jurka, J., Brosius, J., & Schmitz, J. (2007). Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends Genet*, 23(4), 158-161. doi:10.1016/j.tig.2007.02.002



- Levanon, E. Y., Eisenberg, E., Yelin, R., Nemzer, S., Hallegger, M., Shemesh, R., . . . Jantsch, M. F. (2004). Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol*, 22(8), 1001-1005. doi:10.1038/nbt996
- Levy, A., Sela, N., & Ast, G. (2008). TranspoGene and microTranspoGene: transposed elements influence on the transcriptome of seven vertebrates and invertebrates. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D47-52. doi:10.1093/nar/gkm949
- Luo, Y., Lu, X., & Xie, H. (2014). Dynamic Alu methylation during normal development, aging, and tumorigenesis. *Biomed Res Int*, 2014, 784706. doi:10.1155/2014/784706
- Ma, D., Salyakina, D., Jaworski, J. M., Konidari, I., Whitehead, P. L., Andersen, A. N., . . . Pericak-Vance, M. A. (2009). A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. *Ann Hum Genet*, 73(Pt 3), 263-273. doi:10.1111/j.1469-1809.2009.00523.x
- Mabb, A. M., & Ehlers, M. D. (2010). Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 179-210. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104129
- Maslah, E., Dumaop, W., Galasko, D., & Desplats, P. (2013). Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics*, 8(10), 1030-1038. doi:10.4161/epi.25865
- Mbarek, O., Marouillat, S., Martineau, J., Barthelemy, C., Muh, J. P., & Andres, C. (1999). Association study of the NF1 gene and autistic disorder. *Am J Med Genet*, 88(6), 729-732.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. doi:10.1038/npp.2012.112
- Mukaetova-Ladinska, E. B., Arnold, H., Jaros, E., Perry, R., & Perry, E. (2004). Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30(6), 615-623. doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00574.x

- Nguyen, A., Rauch, T. A., Pfeifer, G. P., & Hu, V. W. (2010). Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain. *FASEB J*, 24(8), 3036-3051. doi:10.1096/fj.10-154484
- Nickl-Jockschat, T., & Michel, T. M. (2011). The role of neurotrophic factors in autism. *Mol Psychiatry*, 16(5), 478-490. doi:10.1038/mp.2010.103
- Pramparo, T., Lombardo, M. V., Campbell, K., Barnes, C. C., Marinero, S., Solso, S., . . . Courchesne, E. (2015). Cell cycle networks link gene expression dysregulation, mutation, and brain maldevelopment in autistic toddlers. *Mol Syst Biol*, 11(12), 841. doi:10.15252/msb.20156108
- Pu, D., Shen, Y., & Wu, J. (2013). Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. *Autism Res*, 6(5), 384-392. doi:10.1002/aur.1300
- Ronald, A., Butcher, L. M., Docherty, S., Davis, O. S., Schalkwyk, L. C., Craig, I. W., & Plomin, R. (2010). A genome-wide association study of social and non-social autistic-like traits in the general population using pooled DNA, 500 K SNP microarrays and both community and diagnosed autism replication samples. *Behav Genet*, 40(1), 31-45. doi:10.1007/s10519-009-9308-6
- Rosenberg, R. E., Law, J. K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W. E., & Law, P. A. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 163(10), 907-914. doi:10.1001/archpediatrics.2009.98
- Sarachana, T., & Hu, V. W. (2013). Genome-wide identification of transcriptional targets of RORA reveals direct regulation of multiple genes associated with autism spectrum disorder. *Mol Autism*, 4(1), 14. doi:10.1186/2040-2392-4-14
- Sarachana, T., Xu, M., Wu, R. C., & Hu, V. W. (2011). Sex hormones in autism: androgens and estrogens differentially and reciprocally regulate RORA, a novel candidate gene for autism. *PLoS One*, 6(2), e17116. doi:10.1371/journal.pone.0017116

- Schaefer, G. B., & Mendelsohn, N. J. (2008). Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genet Med*, 10(1), 4-12.  
doi:10.1097/GIM.0b013e31815efdd7
- Sigurdsson, M. I., Smith, A. V., Bjornsson, H. T., & Jonsson, J. J. (2012). Distribution of a marker of germline methylation differs between major families of transposon-derived repeats in the human genome. *Gene*, 492(1), 104-109.  
doi:10.1016/j.gene.2011.10.046
- Sinnett, D., Richer, C., Deragon, J. M., & Labuda, D. (1991). Alu RNA secondary structure consists of two independent 7 SL RNA-like folding units. *J Biol Chem*, 266(14), 8675-8678.
- Sorek, R., Ast, G., & Graur, D. (2002). Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res*, 12(7), 1060-1067. doi:10.1101/gr.229302
- Suren, P., Roth, C., Bresnahan, M., Haugen, M., Hornig, M., Hirtz, D., . . . Stoltenberg, C. (2013). Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *Jama*, 309(6), 570-577.  
doi:10.1001/jama.2012.155925
- Tiwawech, D., Srisuttee, R., Rattanatanyong, P., Puttipanyalears, C., Kitkumthorn, N., & Mutirangura, A. (2014). Alu methylation in serum from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(22), 9797-9800.
- Tordjman, S., Ferrari, P., Sulmont, V., Duyme, M., & Roubertoux, P. (1997). Androgenic activity in autism. *Am J Psychiatry*, 154(11), 1626-1627.
- Ullu, E., & Tschudi, C. (1984). Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature*, 312(5990), 171-172.
- Walter, P., & Blobel, G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 299(5885), 691-698.
- Weiss, L. A., & Arking, D. E. (2009). A GENOME-WIDE LINKAGE AND ASSOCIATION SCAN REVEALS NOVEL LOCI FOR AUTISM. *Nature*, 461(7265), 802-808.  
doi:10.1038/nature08490
- Whitehouse, A. J., Maybery, M. T., Hart, R., Mattes, E., Newnham, J. P., Sloboda, D. M., . . . Hickey, M. (2010). Fetal androgen exposure and pragmatic language ability

of girls in middle childhood: implications for the extreme male-brain theory of autism. *Psychoneuroendocrinology*, 35(8), 1259-1264.

doi:10.1016/j.psyneuen.2010.02.007

Wu, J., Grindlay, G. J., Bushel, P., Mendelsohn, L., & Allan, M. (1990). Negative regulation of the human epsilon-globin gene by transcriptional interference: role of an Alu repetitive element. *Mol Cell Biol*, 10(3), 1209-1216.

Xia, K., Guo, H., Hu, Z., Xun, G., Zuo, L., Peng, Y., . . . Zhang, F. (2014). Common genetic variants on 1p13.2 associate with risk of autism. *Mol Psychiatry*, 19(11), 1212-1219. doi:10.1038/mp.2013.146

Xing, J., Zhang, Y., Han, K., Salem, A. H., Sen, S. K., Huff, C. D., . . . Jorde, L. B. (2009). Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res*, 19(9), 1516-1526. doi:10.1101/gr.091827.109

Yoder, J. A., Walsh, C. P., & Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13(8), 335-340.

Zachariah, R. M., & Rastegar, M. (2012). Linking epigenetics to human disease and Rett syndrome: the emerging novel and challenging concepts in MeCP2 research. *Neural Plast*, 2012, 415825. doi:10.1155/2012/415825

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการทดลอง

1. ตารางแสดงรายละเอียดของเซลล์ไลน์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึม และกลุ่มควบคุมทั้ง 56 เซลล์ไลน์

Individual Code	Blood ID	ASD phenotype	Age	AGRE (ADIR) diagnosis	Ethnicity
AU069606	HI4281	control	3	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU083605	HI2162	control	7	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU1429304	HI4090	control	8	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU059407	HI1534	control	9	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU007505	HI0742	control	10	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU1135203	HI2725	control	10	Unaffected	Hispanic or Latino
AU045012	HI1866	control	11	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU020105	HI0507	control	13	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU059406	HI1537	control	13	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU059405	HI1535	control	14	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU061405	HI1545	control	14	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU057903	HI0813	control	16	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU053304	HI1788	control	16	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU059403	HI1539	control	18	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU032503	HI0365	control	20	Unaffected	Unknown
AU019404	HI1047	control	20	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU077503	HI1706	control	20	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU0885304	HI2357	control	20	Unaffected	Unknown
AU0885301	HI2356	control	24	Unaffected	Unknown
AU062903	HI1161	control	34	Unaffected	Not Hispanic or Latino
AU015003	HI0591	language	12	Autism	Not Hispanic or Latino
AU062203	HI1943	language	12	Autism	Not Hispanic or Latino
AU051504	HI0792	language	13	Autism	Not Hispanic or Latino
AU079103	HI1861	language	13	Autism	Unknown
AU041904	HI0649	language	15	Autism	Not Hispanic or Latino
AU015903	HI0928	language	17	Autism	Not Hispanic or Latino
AU1546302	HI4341	mild	7	Autism	Hispanic or Latino
AU1685302	HI4838	mild	8	Broad Spectrum	Not Hispanic or Latino
AU1648301	HI4751	mild	9	Autism	Not Hispanic or Latino
AU056604	HI1234	mild	10	Autism	Not Hispanic or Latino
AU053504	HI1495	mild	10	NQA	Not Hispanic or Latino
AU073804	HI2251	mild	13	Broad Spectrum	Not Hispanic or Latino
AU1196301	HI4870	mild	15	Autism	Not Hispanic or Latino

Individual Code	Blood ID	ASD phenotype	Age	AGRE (ADIR) diagnosis	Ethnicity
AU081203	HI2028	mild	16	Autism	Not Hispanic or Latino
AU1008302	HI4461	mild	16	Autism	Hispanic or Latino
AU016803	HI1492	mild	17	Autism	Not Hispanic or Latino
AU0955303	HI2791	savant	6	Autism	Hispanic or Latino
AU1102303	HI2824	savant	7	Autism	Hispanic or Latino
AU005215	HI1276	savant	9	Autism	Not Hispanic or Latino
AU083604	HI2163	savant	9	Autism	Not Hispanic or Latino
AU069603	HI1429	savant	11	Autism	Not Hispanic or Latino
AU029803	HI0624	savant	13	Autism	Not Hispanic or Latino
AU043604	HI0700	savant	13	Autism	Not Hispanic or Latino
AU080403	HI2039	savant	14	Autism	Not Hispanic or Latino
AU048103	HI1555	savant	15	Autism	Not Hispanic or Latino
AU1048301	HI2679	savant	16	Autism	Hispanic or Latino
AU067703	HI2008	savant	18	Autism	Not Hispanic or Latino
AU043203	HI0652	savant	22	Broad Spectrum	Not Hispanic or Latino
AU005604	HI0613	savant	28	Autism	Not Hispanic or Latino
AU1164302	HI2883	savant + language	9	Autism	Not Hispanic or Latino
AU069604	HI1428	savant + language	11	Autism	Not Hispanic or Latino
AU1048302	HI2677	savant + language	13	Autism	Hispanic or Latino
AU1102301	HI2815	savant + language	13	Autism	Hispanic or Latino
AU060004	HI0927	savant + language	14	Autism	Not Hispanic or Latino
AU005303	HI1102	savant + language	18	Autism	Not Hispanic or Latino
AU070808	HI1911	savant + language	21	Autism	Not Hispanic or Latino

2. ตารางแสดงร้อยละของระดับและรูปแบบการเกิดเมธิเลชันของ AluS subfamilies ของแต่ละเซลล์ LCLs ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี COBRA

Groups	Sample	% <sup>m</sup> C	% <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C	% <sup>u</sup> C <sup>m</sup> C	% <sup>m</sup> C <sup>u</sup> C	% <sup>u</sup> C <sup>u</sup> C
Control	C0365	37.44	25.52	17.63	22.18	34.67
Control	C0507	37.55	22.98	21.09	22.42	33.52
Control	C0742	37.29	24.23	18.83	22.48	34.46
Control	C0813	40.05	27.91	18.52	22.48	31.08
Control	C1047	39.65	28.13	18.91	21.11	31.85
Control	C1161	36.62	25.86	18.10	19.81	36.23
Control	C1534	38.72	26.53	18.64	22.01	32.83
Control	C1535	36.39	22.68	18.89	22.97	35.47
Control	C1537	38.80	25.45	20.27	21.99	32.28
Control	C1539	36.92	25.91	16.93	21.42	35.73
Control	C1545	38.21	28.68	16.45	20.34	34.53
Control	C1706	35.86	22.27	18.66	22.81	36.26
Control	C1788	38.01	25.01	19.28	22.23	33.49
Control	C1866	36.01	21.59	19.38	23.28	35.75
Control	C2162	38.11	25.58	19.38	21.50	33.53
Control	C2354	37.04	23.44	18.96	23.01	34.59
Control	C2357	38.57	25.88	20.64	20.65	32.83
Control	C2725	37.76	27.52	17.59	20.02	34.87
Control	C4090	40.57	30.07	18.15	20.71	31.06
Control	C4281	40.02	28.81	17.93	21.77	31.49
Subgroup M	M1234	37.24	25.03	18.67	21.45	34.85
Subgroup M	M1492	37.84	23.26	20.11	23.51	33.12
Subgroup M	M1495	39.72	23.98	21.94	24.00	30.08
Subgroup M	M2028	40.72	26.37	20.14	24.19	29.30
Subgroup M	M2251	39.31	26.09	19.57	22.70	31.64
Subgroup M	M4344	38.80	25.63	19.91	22.12	32.34
Subgroup M	M4461	38.44	24.29	20.16	23.08	32.46
Subgroup M	M4751	38.78	24.80	20.19	22.95	32.05
Subgroup M	M4838	38.57	25.19	19.00	23.23	32.58
Subgroup M	M4870	40.87	27.03	20.95	22.70	29.32
Subgroup L	L0591	36.59	25.07	18.21	20.72	35.99
Subgroup L	L0649	37.07	25.07	17.76	22.01	35.16
Subgroup L	L0792	34.58	25.40	19.02	15.97	39.61
Subgroup L	L0928	36.66	20.65	22.41	22.70	34.24
Subgroup L	L1861	37.35	24.61	18.58	22.32	34.49
Subgroup L	L1943	33.88	19.41	19.93	21.85	38.81
Subgroup S	S0613	40.12	28.85	20.13	19.68	31.34
Subgroup S	S0624	34.23	21.21	19.04	20.94	38.80
Subgroup S	S0652	38.33	28.25	15.84	21.75	34.16

Groups	Sample	% <sup>m</sup> C	% <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C	% <sup>u</sup> C <sup>m</sup> C	% <sup>m</sup> C <sup>u</sup> C	% <sup>u</sup> C <sup>u</sup> C
Subgroup S	S0700	41.21	31.72	17.41	20.23	30.64
Subgroup S	S0927	40.32	29.46	18.39	20.91	31.24
Subgroup S	S1102	40.92	30.42	19.95	19.01	30.62
Subgroup S	S1276	35.28	24.17	17.92	19.95	37.97
Subgroup S	S1428	39.60	27.46	18.30	22.57	31.67
Subgroup S	S1429	35.41	25.77	16.96	18.95	38.31
Subgroup S	S1555	36.89	24.04	19.82	21.06	35.08
Subgroup S	S1911	38.42	28.05	17.97	20.04	33.94
Subgroup S	S2008	35.03	27.36	14.90	18.20	39.53
Subgroup S	S2039	39.73	29.30	17.60	20.93	32.17
Subgroup S	S2163	40.73	30.56	17.20	21.26	30.99
Subgroup S	S2677	37.27	27.38	15.32	21.64	35.66
Subgroup S	S2679	36.61	23.96	19.30	21.20	35.54
Subgroup S	S2791	37.71	26.14	18.75	20.67	34.44
Subgroup S	S2815	36.30	26.77	17.84	18.28	37.12
Subgroup S	S2824	37.28	26.38	17.10	21.24	35.27
Subgroup S	S2883	35.11	23.98	17.77	20.05	38.20



3.ตารางแสดงรายชื่อยีนที่มี Alu elements แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเลือด หรือเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเลือดของผู้ป่วยออลิซึมสเปกตรัม และมีความผิดปกติร่วมกันใน 3 งานวิจัยขึ้นไป

Overlapping Studies	Overlapping genes			
GSE15402 GSE18123 GSE25507 GSE42133 GSE6575	ING3			
	MBP			
	RUFY2			
GSE18123 GSE25507 GSE42133 GSE6575	TM9SF4	ALCAM	PTPRE	API5
	CREB1	TNFRSF10C	PLAGL1	PRPF4B
	DDHD1	PURB	DEDD	KLF12
	HIBADH	EXOC7	DDX6	ZNF644
	STX6	LEPROT	KPNA6	TRAF6
	SMARCC2	VPS13D	CASP2	UBE2A
	AP1G1	PTPN2	CDC14A	
GSE15402 GSE18123 GSE25507 GSE42133	RUNX2	RCOR3	GLS	DST
	PRKAA1	CSNK1A1	IGF2R	ETNK1
	TMCC1	STK4		
GSE15402 GSE18123 GSE25507 GSE6575	CHD9	SYNCRIP	MBNL2	ZNF652
	NCOA1	ZNF207	TRIO	CNNM4
GSE18123 GSE42133 GSE6575	ELMO2	SRRM1	PPHLN1	NNT
	RTN1	CACNA2D2	DBT	SMARCA2
	LUZP1	BUB3	ZBTB16	NUMA1
	PRDM2	PDE7A	WDR4	PTGS1
	TNFRSF9	SNRK	LRPPRC	CASK
	NAALADL1	PRKCH	ATM	PRKCA
	CD6	INO80	ARRB1	CAMTA1
	GLG1	HAVCR2	BMPR2	CRTAP
	EPHA4	INSIG1	LILRB1	LYPLA1
	AHNAK	IQGAP2	DIAPH1	GTF2F1
	ATP6V1C1	CDYL	NCBP2	ATP6V1H
	TAGAP	RAC1	IL6ST	SHC1
	TFEC	NOM1	NFATC2IP	DCP1A
	RDH11	ATP1B1	ST3GAL3	DLGAP4
	MBD2	CCNG2	PIGO	NSD1
	DUSP10	YY1	KHDRBS1	POLR2E
	SAMHD1	RBBP4	RASA3	DNAJB12
	MPP6	HMGA2	CNOT6L	PSME3
	GPAM	DAB2	CYCS	FUS
	TRPM3	TPM4	NDUF51	PPP2CA
	AZIN1	KREMEN1	PCGF3	PPP2R5C

Overlapping Studies	Overlapping genes			
	NONO	H6PD	DHRS7	WDR60
	AKAP8	TRRAP	SSRP1	KIF13B
	GNB1	AP3D1	YWHAH	FCGBP
	SLC13A3	PTPRA	FYN	MFAP3L
	PTGER3	USP48	LRBA	CREM
	COPA	EWSR1	PDCD6IP	PCBP2
	XRCC6	ZMYND11	NFATC3	COG2
	ABCB1	SART3	LRIG1	PKNOX1
	SLC43A3	RAB27A	ZNF223	METAP1
GSE18123 GSE25507 GSE42133	GALNT3	GTF2H1	CDC42	PPFIA1
	EP300	MUT	COL4A3BP	TMEM30A
	OSBPL8	SEPLPG	PLAA	LAPTM5
	TAOK3	PHF2	PTBP1	LGALS8
	RAD23B	RSBN1	XPR1	RP56KA3
	WHSC1L1	FER	PKN2	VPS13B
	PPM1A	MPP5	ARHGEF11	RBM17
	NFYA	SSR1	PIK3R4	RAPGEF6
	SVIL	ZNF143	UBL3	RBBP6
	ARHGAP25	N4BP1	IDI1	FBXO3
	MAP2K4	WDR48	UBE4B	STK24
	SH3BP2	FBXO38	DPP8	PCNP
	WDFY3	PLEKHA5	ANKRD12	KLHL5
	CEP63	GLB1	PHF20L1	MYB
	LPIN2	LACTB	RAB11A	ATRX
	PLEKHB2	RNF135	CDC42SE2	SECISBP2
	UBE2H	TRIM23	TIMP2	DYRK2
	USP33	GK	WWP2	LRRC40
	RAB22A	DICER1	MAP4K4	POLK
	RHOQ	CASP8	WNK1	C1orf27
	POLR2A	NR3C1	MTMR3	MKINK1
	FBXL3	SH3KBP1	DDX3X	USP4
	ITCH	ADAM10	TMF1	KIT
	CHRM3	GALNT7	ARHGAP27	PGGT1B
	ADNP	TAF4	PAK2	WWP1
	RFFL	DDX46	PELI2	PTPRC
	TLK2	ELOVL4	MSH3	PDE4B
	LIN7C	ETF1	RAB3IP	TP53BP2
	PDK3	SIAH1	ZNF24	BRWD1
	BRD3	DGKG	APPBP2	SPTLC1
	ARID1A	SP100	TMEM33	WDR1

Overlapping Studies	Overlapping genes			
	SENP5	CBL	WDR20	SPIN1
	TUBGCP3	ZNF451	OPA1	GRIN2D
	MAP3K5	NIN	C6orf62	HKDC1
	STAG2	SRPK2	YPEL5	VPS13C
	ATP11A	SPG21	CREBBP	NCF4
	MYNN	RASSF2	MAP1LC3B	HN1
	ASPH	MTRF1L	C1GALT1C1	SNX7
	SAMD8	JARID2	RNPC3	PPP2R5E
	EXOC8	GRN	FBXO30	UBE2G1
	MAML3	SCAMP1	PARP8	COPS2
	STX7	ARID4A	BBX	EPB41L2
	PPP3CB			
GSE18123 GSE25507 GSE6575	CRNKL1	CPSF6	PIK3C2A	HIPK1
	SLC8A1	MARK2	CLMN	LMO7
	HSPD1	LCP2	AATF	GNAI1
	SEC14L1	EMILIN2	KLF7	NSUN4
	QKI	TAF15	CTSZ	SFPQ
	CPVL	RNF141	PHTF2	TMED5
	FBXL20	RPGRIP1	NPC1	ITGAM
	CDS2	NSUN3	MIB1	GTF3C4
	SEPT2	GOPC	ZAK	JAK1
	TNFSF8	PPP1R12B	ATRN	PDIA3
	RAP2A	PLCB1	SIGLEC9	ARL6IP6
	RNASE4	STX12	PTK2	HERC1
	SAFB	APLP2	BCAP29	CCNJ
	LPP	TGOLN2	SPCS3	NSUN2
	PAFAH1B1	AKAP13	UBR1	GLUD1
	DOCK8	NPL	GFPT1	XPNPEP1
	MAPK1			
GSE15402 GSE18123 GSE25507	IDS	SLC35A3	TBRG1	REV3L
	TNKS2	TRIM33	XPO7	PCGF5
	USP38	ACSL3	RFWD2	ATF6
	USP15	EPS15	ARMC8	BACH1
	CHD7	SP3	PCNX	PHF3
	STAT5B			

## ภาคผนวก ข

## เครื่องมืออุปกรณ์ น้ำยา และสารเคมี

## 1. เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ และอุปกรณ์	บริษัท
-20°C Freezer	Haier, ประเทศอังกฤษ
4°C Refrigerator	Sanyo Electric, ประเทศญี่ปุ่น
-80°C Deep Freezer	Shin Lab, ประเทศเกาหลี
Chemical fume cabinet	Esco Gb Ltd., ประเทศอังกฤษ
Class II microbiological safety cabinet	Haier, ประเทศอังกฤษ
CO <sub>2</sub> incubator	Sheldon Manufacturing, ประเทศสหรัฐอเมริกา
DNA Engine® Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Electrophoresis power supply	Bio-Rad Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Mastercycler™ pro PCR System	Eppendorf, ประเทศเยอรมนี
Exicycler™ 96 Real-Time	Bioneer, ประเทศเกาหลี
Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Hot air oven	Memmert, ประเทศเยอรมนี
Inverted light microscope	Olympus Optical, ประเทศญี่ปุ่น
Light microscope	Olympus Optical, ประเทศญี่ปุ่น
NanoDrop 1000 spectrophotometer	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Vacuum Concentrator (DNA SpeedVacs)	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Water bath	Memmert, ประเทศเยอรมนี
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง	Beckman Coulter Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก	Bio-Active Co., Ltd., Thailand
เครื่องผลิตน้ำ Mili-Q	Milipore, ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องผสมสาร (Vortex)	Scientific Industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
15, 50 mL sterile cell culture tube	Jet Biofil, ประเทศจีน

2 mL cryotube	Greiner bio-one, ประเทศเยอรมนี
2 mL Micro centrifuge Tube for Cell Culture	Tarsons, ประเทศอินเดีย
1, 2, 5, 10 mL disposable serological pipette	Jet Biofil, ประเทศจีน
25, 75 cm <sup>2</sup> culture flask (T-25, T-75)	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
500 mL, 0.2 µm pore size sterile filter cup	Jet Biofil, ประเทศจีน
Auto pipette (10, 100, 1000 µL)	Eppendorf, ประเทศเยอรมนี
Disposable pasteur pipette	Jet Biofil, ประเทศจีน
Duran glass bottle (250, 500, 1000, 2000 mL)	Duran, ประเทศเยอรมนี
Filter tips (10, 100, 1000 µL)	Kirgen, ประเทศจีน
Hemocytometer	Hausser Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Liquid nitrogen tank	ANTECH, ประเทศจีน
Microcentrifuge tube	BIOLINE, ประเทศอังกฤษ
Nuclease-free tube	Jet Biofil, ประเทศจีน
PCR tube	Kirgen, ประเทศจีน
Pipette Controllers (Midi Plus™)	Sartorius, ประเทศเยอรมนี
Pipette tips (10, 200, 1000 µL)	Kirgen, ประเทศจีน

## 2. น้ำยา และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

รายชื่อสารเคมี	บริษัท, ประเทศ
0.1 M sodium citrate ใน 10% ethanol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
10 mg/ml Ethidium Bromide	VWR, ประเทศสหรัฐอเมริกา
100% ethanol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
25 bp DNA ladder	Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
40% acrylamide and bis-acrylamide solution, 19:1	Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
75% ethanol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
8 mM NaOH	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix	Bioneer, ประเทศเกาหลี
AccuPower® RT PreMix tube	Bioneer, ประเทศเกาหลี
Ammonium Persulfate (APS)	Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Boric acid	Bio basic, ประเทศแคนาดา
Chloroform	VWR, ประเทศสหรัฐอเมริกา
DEPC-treated water	Bio basic, ประเทศแคนาดา
DEPC-treated water	Bio basic, ประเทศแคนาดา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	VWR, ประเทศสหรัฐอเมริกา
dNTP Mix, PCR Grade, 10mM	QIAGEN, ประเทศสหรัฐอเมริกา
EDTA	Sigma Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา
EZ DNA Methylation-Gold™ KIT	Zymo research, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Fatal bovine serum	Sigma Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Genezol reagent	Geneaid, ประเทศไต้หวัน
HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Isopropyl alcohol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
Penicillin/ Streptomycin/ Fungizone	Wisent Bio Products, ประเทศแคนาดา
Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	HyClone Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
RNA later solution	Ambion, ประเทศสหรัฐอเมริกา
RNase and DNAase away	Bio basic, ประเทศแคนาดา
RNase and DNAase away	Bio basic, ประเทศแคนาดา

RNase-free water หรือ 0.5% SDS	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
RPMI1640 medium	HyClone Laboratories, ประเทศ สหรัฐอเมริกา
RQ1 RNase-free DNase	Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Taq I restriction enzyme (10U/ $\mu$ L)	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio basic, ประเทศแคนาดา
Tris	Bio basic, ประเทศแคนาดา
Tryphan blue	Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา
UltraPure Distilled water	Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา



**ภาคผนวก ค****การเตรียมน้ำยา และสารเคมี**

การเตรียมน้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.การเตรียม 0.5M EDTA ปริมาตร 1 ลิตร

- 1.1. ทำการชั่งสาร EDTA ( $\text{Na}_2\text{.2H}_2\text{O}$ , M.W. 372.24) จำนวน 186.12 g
- 1.2. เติมน้ำ Milli Q ลงไปประมาณ 800 mL
- 1.3. ปรับระดับ pH ให้เป็น 8.0 หรือเติม NaOH ลงไปประมาณ 17-20 g ในขณะที่ทำการ stirring โดยอาจใช้ magnetic stirring เพื่อให้สารประกอบ EDTA ละลายน้ำได้
- 1.4. หลังจากสารประกอบ EDTA ละลายดีแล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนเป็น 1000 mL หรือ 1 L โดยใช้ volumetric flask
- 1.5. นำสารละลายที่ได้ไป autoclave

2.การเตรียม 10X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

- 2.1 ชั่งสาร Tris base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , M.W. 121.14) จำนวน 108 g
- 2.2 ชั่งสาร Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , M.W. 61.83) จำนวน 55 g
- 2.3 เติมน้ำ Milli Q ลงไปปริมาณ 900 mL
- 2.4 หลังจากนั้นทำการเติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ลงไปปริมาณ 40 mL
- 2.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 mL หรือ 1 L
- 2.6 หลังจากนั้นนำสารละลายไป autoclave

3.การเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

- 3.1 เตรียมจาก 10X TBE buffer โดยการนำ 10X TBE buffer มาปริมาตร 100 mL
- 3.2 เติมน้ำ Milli Q ลงไปผสมปริมาณ 900 mL จะทำให้ได้ 1X TBE buffer ปริมาตร 1 L

4.การเตรียม 10% APS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- 4.1 เตรียมสาร APS ปริมาณ 100 mg ใส่ลงใน 1.5 mL sterile tube
- 4.2 เติมน้ำ Milli Q ลงไป 1 mL จะทำให้ได้ 10% APS ปริมาตร 1 mL



## ภาคผนวก ง

## คำอธิบายสัญลักษณ์ และตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย

%	Percentage
/	Per
µg	Microgram
µl	Microlitre
ADDM	Autism and Developmental Disabilities Monitoring
ADI-R	Autism Diagnostic Interview - Revised
APS	Ammonium persulfate
ASD	Autism spectrum disorder
AUC	Area under curve
BDNF	Brain-derived neurotrophic
CH <sub>3</sub>	Methyl group
COBRA	Combine bisulfite restriction analysis
CU-DREAMx	Connection up and down-regulation expression analysis for microarrays
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNMT	DNA methyltransferase
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders5
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GEO	Gene Expression Omnibus
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
LCLs	lymphoblastoid cell lines
M	Molar
<sup>m</sup> C	Methylated Cytosine
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein 2

mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
ORF2	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein
ROC	Receiver Operating Characteristic (ROC)
RORA	RAR Related Orphan Receptor A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SINE	Short interspersed nuclear elements
TBE	Tris/Borate/EDTA
U	Unit
<sup>4</sup> C	Unmethylated cytosine
X	Fold or times

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธนิศ แซ่หลิว เกิดเมื่อวันที่ 19 มีนาคม พ.ศ.2534 ที่จังหวัดอุดรธานี จบการศึกษา  
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี  
การศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ในปีการศึกษา 2557 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา  
ระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่  
พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา และ ทุน ๘๐  
ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

