

การศึกษาเครือข่ายควบคุมยีนโดยภาวะเหนือพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม  
ด้วยการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วัน



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 RETROTRANSPOSON LINE1  
METHYLATION ANALYSIS



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  
เกี่ยวข้องกับโรคอหิวาต์ซึมสเปกตรัมด้วยการวิเคราะห์ระดับ  
เมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วัน

โดย

นางสาวชญานิน ตั้งสุวรรณศรี

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุวรรณ)

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

ชญาณิน ตั้งสุวรรณศรี : การศึกษาเครือข่ายควบคุมยีนโดยภาวะเหนือพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วย การวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วัน (INVESTIGATION OF EPIGENETIC GENE REGULATORY NETWORKS ASSOCIATED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD) BY GLOBAL RETROTRANSPOSON LINE1 METHYLATION ANALYSIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ, 141 หน้า.

ออทิซึมสเปกตรัมเป็นความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาทและสมองที่มีความชุก 1 ใน 68 คนของเด็กใน สหรัฐอเมริกา โดยจะมีระดับความรุนแรงและอาการแสดงทางคลินิกแตกต่างกันออกไปในแต่ละบุคคล ออทิซึมสเปกตรัมจัดเป็นโรคที่ไม่ทราบสาเหตุการเกิดที่แน่ชัด แต่เป็นที่เชื่อกันว่าสาเหตุของการเกิดโรคนั้นอาศัยปัจจัยร่วมหลายปัจจัย ได้แก่ ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม การวินิจฉัยออทิซึมสเปกตรัมในปัจจุบัน ใช้วิธีอิงจากการสังเกตพฤติกรรมผู้ป่วย วินิจฉัยโรคและความรุนแรงตามลักษณะอาการทางคลินิกเท่านั้น ยังไม่มีสารบ่งชี้ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่สามารถใช้ในการวินิจฉัย หรือติดตามความรุนแรงของโรคอย่างจำเพาะ โดยผลการศึกษาก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีความผิดปกติในระดับยีนชีวโมเลกุลมากมายทั้งในสมองและเลือด ซึ่งมีหลายประการที่สอดคล้องกับพยาธิสภาพระดับชีวโมเลกุลที่เกิดขึ้นในสมอง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มียีนหรือโปรตีนชนิดใดที่สามารถใช้ในการอธิบายโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ทั้งหมดในปัจจุบัน แสดงให้เห็นว่าอาจมีกลไกอื่น ๆ ที่สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ ยิ่งไปกว่านั้น แม้โรคออทิซึมสเปกตรัมจะเป็นโรคที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูง แต่มีฝาแฝดร่วมไข่จำนวนไม่น้อยที่คนหนึ่งเป็นโรคแต่อีกคนไม่เป็น หรือมีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากัน เนื่องจากฝาแฝดร่วมไข่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการเมื่อแรกเกิด แสดงให้เห็นว่า กลไกเหนือพันธุกรรมหรือเอพิเจเนติกส์อาจเป็นสาเหตุหรือมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม รีโทรทรานสโพซอนไลน์วัน (retrotransposon LINE-1) เป็นส่วนของจีโนมที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และมีอยู่ถึงประมาณร้อยละ 20 และในจีโนมมนุษย์ อย่างไรก็ตามบทบาทของ LINE-1 ในผู้ที่เป็ออทิซึมสเปกตรัมยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าพบการควบคุมที่ผิดปกติของ LINE-1 ในสมองของหนูที่ขาด MECP2 และมีพฤติกรรมคล้ายออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ของผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม และผลต่อการแสดงออกของยีน รวมไปถึงบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของยีนนั้น ๆ โดยทำการศึกษาในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว (lymphoblastoid cell lines; LCLs) ของผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติ นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ร่วมด้วย โดยได้ทำการวิเคราะห์ร่วมระหว่างรายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม และได้คัดเลือกรายชื่อยีนมาทำการศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และความสัมพันธ์ของเครือข่ายการควบคุมยีนของยีนเหล่านั้นด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ซึ่งพบว่ายีนเหล่านั้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาทและสมอง ในส่วนของการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในดีเอ็นเอซึ่งสกัดมาจาก LCLs ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติ และดำเนินการโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ซึ่งพบว่าใน LCLs ของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมมีระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับคนปกติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในแต่ละกลุ่มของ LCLs ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งถูกจัดแบ่งกลุ่มตามหลักเกณฑ์ของ ADI-R เนื่องจากออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีลักษณะอาการและความรุนแรงที่หลากหลายมาก คณะผู้วิจัยพบว่าแต่ละกลุ่มมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ที่จำเพาะ และในบางกลุ่มไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ LINE-1 นอกจากนี้ยังพบว่าการเมธิเลชันของ LINE-1 มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ LINE-1, C1orf27 และ ARMC8 โดยการวิเคราะห์ด้วย quantitative RT-PCR การศึกษาของเราแสดงให้เห็นว่าในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมบางกลุ่ม มีกลไกการควบคุมการเมธิเลชันของ LINE-1 ที่ผิดปกติ และอาจไปรบกวนการแสดงออกของ LINE-1 และเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับสาเหตุของการเกิดโรคและความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเมธิเลชันของ LINE-1 ต่อกลไกการเกิดโรคหรือต่อความเสี่ยงในการเกิดออทิซึมสเปกตรัมได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาบทบาทความสำคัญของ LINE-1 ในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ภาควิชา เคมีคลินิก

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2560

# # 5776654037 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: AUTISM SPECTRUM DISORDER / RETROTRANSPOSON / LONG INTERSPERSED ELEMENT-1 / LINE-1 METHYLATION / LINE-1 EXPRESSION / DNA METHYLATION / EPIGENETIC REGULATION / GENE EXPRESSION PROFILES / TRANSCRIPTOME / LINE-1

CHAYANIN TANGSUWANSRI: INVESTIGATION OF EPIGENETIC GENE REGULATORY NETWORKS ASSOCIATED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER (ASD) BY GLOBAL RETROTRANSPOSON LINE1 METHYLATION ANALYSIS. ADVISOR: TEWARIT SARACHANA, Ph.D., 141 pp.

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disorders with the prevalence of 1 in 68 children in United States. The exact cause of ASD remains unclear. Long Interspersed Element-1 (LINE-1) is a transposable element which makes up approximately 20% of the human genome. The function of LINE-1 is still unclear but the dysregulation of LINE-1 has been reported in the brain of MECP2-mutant mice which exhibit ASD-like behaviors. However, the role of LINE-1 in individuals with ASD remains unknown. In this study, we therefore aimed to investigate the regulation of LINE-1 in ASD by DNA methylation and gene expression profiling analyses. To determine whether ASD-related genes contain LINE-1 insertions, we conducted a meta-analysis of gene expression profiles previously published in transcriptomic studies in ASD. Pathway analysis of genes that are differentially expressed and predicted to contain LINE-1 insertions were conducted using Ingenuity Pathway Analysis (IPA). To determine whether DNA methylation on LINE-1 may regulate the expression of LINE-1 and the LINE-1-containing genes, DNA methylation analysis of lymphoblastoid cell lines from ASD and unaffected individuals was performed, and the LINE-1 methylation levels were correlated with the expression of LINE-1. Moreover, the expression of two differentially expressed genes (i.e. C1orf27 and ARMC8) predicted to contain LINE-1 insertions, were also validated by qRT-PCR analysis. Meta-analysis of ASD transcriptome profiles from independent studies revealed 501 genes that are differentially expressed and potentially contain LINE-1 insertions. IPA analysis showed that these genes are involved in ASD-related mechanisms and networks, including sex hormone receptor signaling and axon guidance signaling. Moreover, we found that LINE-1 methylation was dysregulated in ASD, and further subgrouping of ASD individuals based on the Autism Diagnostic Interview-Revised scores revealed specific methylation patterns that were altered in each subgroup. Furthermore, LINE-1 methylation levels were correlated with the expression of LINE-1, C1orf27, and ARMC8. Our study demonstrates that at least in some ASD individuals LINE-1 methylation is dysregulated, which potentially causes disruptions in LINE-1 expression and may alter the expression of LINE-1-containing genes associated with ASD etiology or susceptibility. The role of LINE-1 in ASD deserves further investigation.

Department: Clinical Chemistry Student's Signature .....

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular Medicine  
Medicine Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความเมตตาและกรุณาของ อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ อาจารย์ผู้ซึ่งทำหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก คอยให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัย รวมไปถึงชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาและข้อผิดพลาดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย อีกทั้งยังให้การช่วยเหลือ สนับสนุนในด้านต่าง ๆ ตั้งแต่แรกเริ่มจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ

ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เจตน์สว่าง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.Valarie W. Hu จากมหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน แห่งประเทศสหรัฐอเมริกา และคณะ ที่ได้ให้คำแนะนำ และแนวทางในการดำเนินการวิจัย อีกทั้งยังให้การอนุเคราะห์เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวที่ใช้เป็นโมเดลในการศึกษานี้ รวมไปถึงเครื่องมือที่ใช้การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาว์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และการสนับสนุนงานวิจัยทางด้านการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้ รวมถึงให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำวิจัยด้วยความเต็มใจ

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนเพื่อทำการการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย และทุน ๙๐ ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ภาควิชาการศึกษาด้าน ปีการศึกษา 2559 รุ่นที่ 34 ครั้งที่ 1/2560

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยส่งเสริมและให้กำลังใจตลอดมา ซึ่งส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ .....	ฐ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย .....	4
คำถามงานวิจัย .....	5
สมมติฐานงานวิจัย .....	5
กรอบแนวคิดการวิจัย .....	6
ระเบียบการวิจัย .....	7
ขอบเขตของการวิจัย.....	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
บทที่ 2 .....	9
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	9
ออทิซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorder).....	9
อุปนิสัยการณ้และความชุกของออทิซึมสเปกตรัม .....	10
ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม กับความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม .....	11
ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม กับความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม .....	13

กลไกการควบคุมทางเอพิเจเนติกส์ในออตซิมสเปกตรัม .....	14
กลไกการเกิดเมธิเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation) .....	15
ความผิดปกติของกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชันในออตซิมสเปกตรัม .....	18
รีโทรทรานสโพซอนชนิดไลน์วัน (LINE-1 หรือ L1) .....	22
บทบาทของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วันกับการเกิดโรคออตซิมสเปกตรัม .....	29
Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs) .....	32
บทที่ 3 .....	34
วิธีดำเนินการวิจัย .....	34
3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็โรคออตซิมสเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม Connection Up and Down Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAMx) .....	34
3.2 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ที่เป็โรคออตซิมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม MultiExperiment Viewer (MeV) .....	39
3.3 การวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและเครือข่ายการควบคุมยีนของยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็โรคออตซิมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....	41
3.4 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย .....	42
3.5 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	44
3.5.1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	44
3.5.2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย .....	45
3.5.3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย .....	46
3.6 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว .....	49
3.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ .....	49



3.6.2. ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ .....	49
3.6.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์ .....	50
3.6.4 การเก็บเซลล์ .....	51
3.7. การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว .....	53
3.7.1. การสกัดดีเอ็นเอ .....	54
3.7.2. การสกัดอาร์เอ็นเอ .....	55
3.8. การทำปฏิกิริยา Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA).....	56
3.9. การวิเคราะห์ระดับ DNA methylation ของ LINE-1 .....	62
3.10. การวิเคราะห์การแสดงออกของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นโรคอหิว ซีมสเปกตรัมและคนปกติด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR.....	63
3.11. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน C1orf27 และ ARMC8 ใน LCLs ของผู้ที่เป็นโรค อหิวซีมสเปกตรัมและคนปกติด้วย quantitative PCR .....	66
3.12. การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	67
บทที่ 4 .....	69
ผลการวิจัย .....	69
4.1. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และกลุ่มยีนมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคอหิวซีมสเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม Connection Up and Down Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAMx) .....	69
4.2. ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ที่เป็นโรคอหิว ซีมสเปกตรัมด้วย SAM.....	71
4.3. ผลการวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและเครือข่ายการควบคุมยีนของยีน ที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในอหิวซีมสเปกตรัม โดยใช้ โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....	73
4.4. ผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 .....	77

4.5. ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 .....	80
4.6. ผลการวิเคราะห์หารายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน 56 LCLs ของ GSE15402 โดยใช้โปรแกรม CU-DREAMx .....	82
4.7. ผลการวิเคราะห์ระดับและยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกมาจากโปรแกรม CU-DREAMx (C1orf27 และ ARMC8).....	84
4.8. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างระดับเมธิเลชันและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มย่อยและกลุ่ม age-matched control.....	85
4.9. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างระดับเมธิเลชันและระดับการแสดงออกของยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติ (C1orf27 และ ARMC8).....	90
4.10. ผลการวิเคราะห์ Receiver-Operating Characteristic (ROC) curve .....	93
บทที่ 5 .....	96
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	96
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย .....	96
รายการอ้างอิง .....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	141

## สารบัญตาราง

<b>ตารางที่ 1</b> รายการ GEO DataSets ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการ แสดงออกที่ผิดปกติ กับกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่สิ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx .....	36
<b>ตารางที่ 2</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญ จาก ทั้ง 5 GEO DataSets ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx .....	71
<b>ตารางที่ 3</b> ผลวิเคราะห์รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ และมีระดับการ แสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา จากการ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ที่มีระดับความน่าเชื่อถือสูง (high confidence level, SAM).....	72
<b>ตารางที่ 4</b> ผลการวิเคราะห์ biological functions และ canonical pathways ที่มีความเกี่ยว กลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม .....	74
<b>ตารางที่ 5</b> ผลการวิเคราะห์เครือข่ายการควบคุมยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบ ประสาทและสมองของกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม IPA.....	75
<b>ตารางที่ 6</b> ผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิ ซึมสเปกตรัมตัวอย่างเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ .....	78
<b>ตารางที่ 7</b> ผลการวิเคราะห์รูปแบบการเมธิเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของ ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมตัวอย่างแต่ละกลุ่มย่อยเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่า กัน.....	79
<b>ตารางที่ 8</b> ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในเซลล์ไลน์ เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มคนปกติด้วยเทคนิค qRT-PCR.....	81
<b>ตารางที่ 9</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ ในรูปแบบต่าง ๆ และกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน 56 LCLs ของ GSE15402 ที่ถูกจำแนกออกเป็นแต่ละกลุ่มย่อย ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx.....	83

ตารางที่ 10 ผลการยีนพิษทางการแสดงออกของยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ microarray ซึ่งได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 ด้วยเทคนิค qRT-PCR.....85



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อกลไกการทำงานทางเอพิเจเนติกส์.....15

ภาพที่ 2 กลไกการเกิด Epigenetic Crosstalk ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดดีเอ็นเอเมธิเลชัน..18

ภาพที่ 3 บทบาทหน้าที่ในระดับโมเลกุลของ MECP2 ในการควบคุมการแสดงออกของยีน.....20

ภาพที่ 4 องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในจีโนมมนุษย์โดยประมาณ .....22

ภาพที่ 5 ชนิดและองค์ประกอบของ genetic elements ที่เคลื่อนที่ได้ในจีโนมมนุษย์ทั้งหมด .23

ภาพที่ 6 กระบวนการ retrotransposition ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 .....26

ภาพที่ 7 เหตุการณ์ที่อาจทำให้เกิดการรบกวนการทำงานของยีนจากการ retrotransposition ของ LINE-1.....27

ภาพที่ 8 กระบวนการควบคุมยีนของ LINE-1 เมื่อเข้าแทรกตัว โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายกับยีน.....29

ภาพที่ 9 วิวัฒนาการการค้นพบรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม .....31

ภาพที่ 10 หลักการตรวจวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx software ในการศึกษา.....35

ภาพที่ 11 ความแตกต่างเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟท์ระหว่างลำดับเบสที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิล กับลำดับเบสที่มีการเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่งของเบสไซโตซีน.....56

ภาพที่ 12 วิธีการโดยย่อของขั้นตอนการเตรียม CT Conversion Reagent.....57

ภาพที่ 13 แผนผังโดยย่อของขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับสารไบซัลไฟด์ .....59

ภาพที่ 14 Restriction sites ของ TaqI restriction enzyme และ TspI restriction enzyme .....60

ภาพที่ 15 รูปแบบของการเกิด LINE-1 methylation .....62

ภาพที่ 16 Venn diagram แสดงจำนวนยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติที่มีการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไป .....71

ภาพที่ 17 ภาพเครือข่ายการควบคุมยีน (networks) ที่มีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาทจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA.....76

ภาพที่ 18 COBRA LINE-1 amplicons บน non-denaturing 8% polyacrylamide gel ....77

<b>ภาพที่ 19</b> ผลการวิเคราะห์การกระจายข้อมูลของระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics .....	80
<b>ภาพที่ 20</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่ม language impairment.....	87
<b>ภาพที่ 21</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M หรือ mild autism.....	88
<b>ภาพที่ 22</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S หรือ savant skills.....	89
<b>ภาพที่ 23</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน C1orf27 .....	91
<b>ภาพที่ 24</b> ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน ARMC8.....	92
<b>ภาพที่ 25</b> ผลการวิเคราะห์ ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ของกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมและกลุ่มคนปกติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics .....	94
<b>ภาพที่ 26</b> ผลการวิเคราะห์ ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาและกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากันด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics .....	95
<b>ภาพที่ 27</b> กลไกการควบคุม RORA expression โดยฮอว์โมนเพศ .....	99
<b>ภาพที่ 28</b> ภาพรวมของกลไกที่เกิดขึ้นจากการศึกษาวิจัยนี้ .....	105

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ออทิสซึมเป็นกลุ่มอาการที่มีความหลากหลายของลักษณะอาการทางคลินิกหรือที่เรียกว่าออทิสซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder; ASD) โดยจะมีความบกพร่องทางด้านพฤติกรรม 2 ด้านหลัก ได้แก่ ด้านการปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและการใช้ภาษาพูดและภาษากายในการติดต่อสื่อสาร (social interaction and communication) และด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมซ้ำ ๆ (restricted interests and repetitive behaviors) โดยอาการทางคลินิกมักจะแสดงออกในอายุช่วงต้นของชีวิต

ออทิสซึมสเปกตรัมกำลังเป็นปัญหาหลักทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก โดยมีความชุกทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 1 ใน 100 (Fombonne, 2005) โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา นั้น โรคออทิสซึมสเปกตรัมถูกจัดว่าเป็นโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติทางการพัฒนาของระบบประสาทที่มีความชุก (prevalence) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยตามรายงานล่าสุดของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค ประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) พบว่าเด็กที่เป็นออทิสซึมสเปกตรัมมีความชุกอยู่ที่ 1 ใน 68 คน (Christensen et al., 2016) ส่วนในประเทศไทย การศึกษาล่าสุดในปี พ.ศ. 2548 ซึ่งทำการเก็บข้อมูลเพื่อสำรวจความชุกของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมในประเทศไทยโดยกรมสุขภาพจิตแห่งประเทศไทย รายงานว่าความชุกของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมในประเทศไทยอยู่ที่ประมาณ 1 ใน 1,000 คน ซึ่งทำการทำการสำรวจไว้ในปี พ.ศ. 2548 ในปัจจุบัน คาดการณ์ว่าแนวโน้มว่าความชุกที่แท้จริงของออทิสซึมสเปกตรัมของประเทศไทยในปัจจุบันน่าจะมีระดับที่สูงกว่าผลการศึกษาเดิม อันเนื่องมาจากความเจริญก้าวหน้าและความพร้อมทางด้านเครื่องมือเทคโนโลยีในการตรวจวินิจฉัยโรค (Poolsuppsit, 2005)

ในปัจจุบัน ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสาเหตุการเกิดออทิสซึมสเปกตรัมที่แท้จริงยังไม่สามารถสรุปได้ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่าออทิสซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูงประมาณร้อยละ 90 (Liu et al., 2001) โดยมีหลักฐานสนับสนุนจากการศึกษาในฝาแฝด 2 ประเภท ได้แก่ monozygotic (MZ) twin หรือแฝดแท้ และ dizygotic (DZ) twin หรือแฝดเทียม ซึ่งพบว่าในฝาแฝด monozygotic (MZ) twin จะมีภาวะของออทิสซึมสเปกตรัมที่ตรงกันประมาณร้อยละ 70-90 ส่วนในฝาแฝด dizygotic (DZ) twin จะมีภาวะของออทิสซึมสเปกตรัมที่ตรงกันเพียงร้อยละ 10 (Bailey et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ในพี่น้อง (sibling study) ของผู้ป่วย

ออทิสซึมสเปกตรัม พบว่าพี่น้องในครอบครัวของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม มีโอกาสที่จะเป็นออทิสซึมสเปกตรัมมากกว่าคนปกติถึง 20 เท่า (Bolton et al., 1994; Fombonne, 2005) แต่อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมนั้น ในปัจจุบันพบได้เพียงร้อยละ 10-15 เท่านั้น แสดงว่าผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่เหลือส่วนใหญ่ในปัจจุบันอีกกว่าร้อยละ 85 ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด หรือเป็น idiopathic cases (Barton & Volkmar, 1998) ในปัจจุบันนี้ ได้มีการศึกษาต่าง ๆ มากมายที่พยายามจะระบุสาเหตุของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด และการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีสมัยใหม่และเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพได้เข้ามาช่วยขยายขอบเขตของการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ (cytogenetic studies) (Jiao et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค genome-wide association study (GWAS) หรือการค้นหา single nucleotide polymorphisms (SNPs) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับโรคออทิสซึมสเปกตรัม และล่าสุดได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคที่เรียกว่า next-generation sequencing มาใช้ในการค้นหาตำแหน่งจำเพาะในจีโนมที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดออทิสซึมสเปกตรัม (ASD susceptibility loci) (Kumar et al., 2008; Weiss et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาด้วยวิธีการเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดและการค้นพบยังคงมีนัยสำคัญทางสถิติต่ำ และมักมีอัตราการค้นพบซ้ำในการวิจัยน้อย ส่งผลให้ในปัจจุบันยังไม่มี ASD susceptibility loci โดเมนโครโมโซมที่จะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ต่อการเกิดออทิสซึมสเปกตรัมของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมได้มากกว่าร้อยละ 1 (Weiss et al., 2008) ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า การใช้ความผิดปกติของยีนเดียว (single gene) หรือตำแหน่งบนโครโมโซมเพียงตำแหน่งเดียว อาจจะไม่สามารถอธิบายชีวพยาธิสภาพของออทิสซึมสเปกตรัมได้ทั้งหมด เนื่องจากโรคนี้น่าจะเป็นผลมาจากความผิดปกติของยีนหลายยีน (multigenic disorder) และอาจเกิดจากปัจจัยสำคัญอื่นร่วมด้วย ซึ่งปัจจัยนั้นอาจถูกควบคุมผ่านทางกลไกที่เรียกว่ากลไกเหนือพันธุกรรม หรือกลไกทางเอพิเจเนติกส์ (epigenetic mechanisms) ได้ โดยกลไกทางเอพิเจเนติกส์ที่อาจเกี่ยวข้องกับออทิสซึมสเปกตรัม ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation) การปรับแต่งของฮิสโตน (histone modification) และการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยอาร์เอ็นเอ (noncoding RNA) ในปัจจุบัน DNA methylation เป็นหนึ่งในกลไกทางเอพิเจเนติกส์ที่ได้รับความสนใจในการทำการศึกษและทางการวิจัยอย่างกว้างขวางในออทิสซึมสเปกตรัม มีการศึกษารายงานว่า แม้โรคออทิสซึมสเปกตรัมจะเป็นโรคที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูง และฝาแฝดร่วมไข่จะมีลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการเมื่อแรกเกิด แต่มีฝาแฝดร่วมไข่จำนวนไม่น้อยที่คนหนึ่งเป็นโรคแต่อีกคนไม่เป็น หรือมีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากัน และยังมีการศึกษาพบว่าระดับ DNA methylation ในฝาแฝดร่วมไข่นั้นมีความแตกต่างกันอยู่มากด้วย (Wong et al., 2014) ที่น่าสนใจคือมีการศึกษาพบว่า DNA methylation มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบประสาทและสมอง ที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิสซึมสเปกตรัม โดย Nguyen และ



คณะ ได้ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยา DNA methylation ในบริเวณ promoter ของยีนตัวจีโนมมนุษย์ โดยการนำเทคนิคที่เรียกว่า CpG island microarray มาประยุกต์ใช้ โดยทำการวิเคราะห์เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของแฝดร่วมไข่ที่คนหนึ่งเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมรุนแรงแต่อีกคนหนึ่งไม่เป็น (discordant monozygotic twins) และพี่น้องที่ไม่ได้เป็นโรค ซึ่งพบว่าแฝดผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมรุนแรงมีระดับ methylation แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากพี่น้องที่ไม่ได้เป็นโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งบนยีน BCL2 และยีน RORA ซึ่งโปรตีนจากสองยีนนี้มีการแสดงออกที่ลดลงในสมองส่วน cerebellum และ ส่วน frontal cortex ของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม อีกทั้งยังพบว่า CpG islands กว่า 70 ตำแหน่งในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมมีระดับ methylation ที่ผิดปกติ ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่าความผิดปกติของระดับ DNA methylation ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม น่าจะเป็นแบบ global methylation มากกว่าการเกิดที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง (Nguyen, Rauch, Pfeifer, & Hu, 2010) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ให้ความสนใจเฉพาะบริเวณ promoter ของยีน ที่ผลิตโปรตีนเท่านั้น แต่ไม่ครอบคลุมตรวจวิเคราะห์ระดับ methylation ในส่วนของจีโนมที่ไม่ได้ผลิตโปรตีนซึ่งกินพื้นที่เป็นส่วนใหญ่ขององค์ประกอบในจีโนม โดยส่วนของจีโนมที่ไม่สามารถผลิตโปรตีนได้นั้น องค์ประกอบส่วนใหญ่ ได้แก่ Introns และ Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons ซึ่ง non-LTR retrotransposons ที่สำคัญ คือ Long Interspersed Elements (LINEs)

Long Interspersed Elements (LINEs) เป็นส่วนของจีโนมที่มีลักษณะเป็น Repeat sequences มีอยู่ประมาณร้อยละ 21 ในจีโนมมนุษย์ ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ LINE-1 LINE2 และ LINE3 ซึ่ง Long Interspersed Element-1 (LINE-1) เป็นส่วนของจีโนมมนุษย์ที่สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งได้ด้วยตัวเอง (autonomous mobile elements) มีอยู่ประมาณร้อยละ 17 และเป็นกลุ่มเดียวที่มีความ active ในจีโนมมนุษย์ โดยมีหลักฐานพบว่า LINE-1 อาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม ที่ผ่านมามีการศึกษาพบว่าเกิดการ retrotransposition ของ LINE-1 ใน neuronal progenitor cells และในสมองของหนูและมนุษย์ (Coufal et al., 2009; Muotri et al., 2005) และในปี ค.ศ. 2006 Muotri และคณะ ยังพบว่าการ retrotransposition ของ LINE-1 ในขณะที่มีการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง สามารถส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนและการทำงานของระบบประสาทได้ด้วย (Muotri & Gage, 2006) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2010 Muotri และคณะก็ได้ทำการศึกษาในสมองของหนูทดลองที่ขาดโปรตีน methyl-CpG binding protein 2 (MECP2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมปฏิกิริยา methylation บนจีโนม และเป็นหนูที่มีพฤติกรรมคล้ายออทิซึมสเปกตรัม โดยพบว่า มีการเคลื่อนที่ (retrotransposition) ของ LINE-1 เพิ่มขึ้นในเซลล์ประสาทสมองของหนูที่ขาดโปรตีน MECP2 มากกว่าในหนูปกติ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาใน neuronal progenitor cells ซึ่งพัฒนามาจาก human induced

pluripotent stem cells และ human tissues ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ที่พบว่าใน neural progenitor cells ของผู้ป่วยที่ขาดโปรตีน MECP2 มีการเคลื่อนที่ของ LINE-1 มากกว่าใน neural progenitor cells ของคนปกติ (Muotri et al., 2010) จากหลักฐานทางการศึกษาที่ได้กล่าวไปข้างต้น บ่งชี้ว่าการควบคุมที่ผิดปกติของการเคลื่อนที่และการแสดงออกของ LINE-1 น่าจะมีส่วนในการเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติของการพัฒนาทางระบบประสาท และอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการพัฒนาทางระบบประสาท เช่น ออทิสซึมสเปกตรัมได้ด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าว ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เกี่ยวกับระดับเมธิเลชัน (methylation level) ของ LINE-1 ในหนูทดลองและในเซลล์จากผู้ป่วยที่ขาดโปรตีน MECP2 อีกทั้งยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ LINE-1 ในออทิซึมสเปกตรัมแบบไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic) ซึ่งเป็นผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมส่วนใหญ่ ทางคณะผู้ทำวิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าเซลล์จากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมจะมีระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ที่ผิดปกติไปจากเซลล์ของคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรค ซึ่งการศึกษานี้จะทำให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของการเมธิเลชันของ LINE-1 ต่อกลไกการเกิดโรคหรือต่อความเสี่ยงในการเกิดออทิซึมสเปกตรัมได้มากขึ้น นอกจากนี้อาจนำความรู้เกี่ยวกับระดับการเมธิเลชันของ LINE-1 มาใช้ในการพัฒนาเป็นสารบ่งชี้ (biomarker) เพื่อช่วยวินิจฉัยออทิซึมสเปกตรัมต่อไปในอนาคตได้ด้วย

#### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับ DNA methylation และ expression ของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติ
2. เพื่อเพื่อทำนายหน้าที่และปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติและมี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม

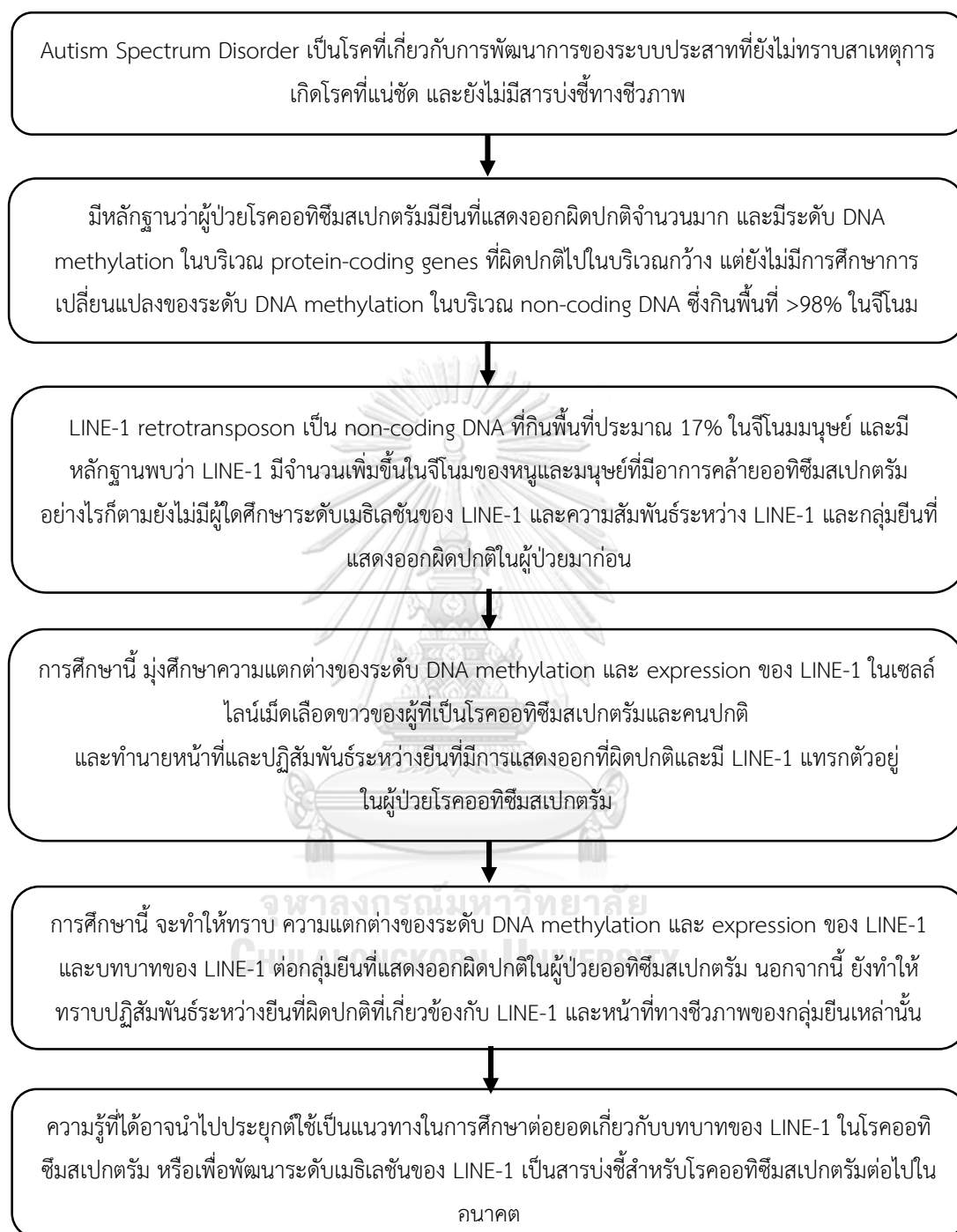
### คำถามงานวิจัย

1. ระดับ DNA methylation ของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมมีความแตกต่างไปจากคนปกติหรือไม่ และมีความสัมพันธ์กับยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมอย่างไร กลุ่มยีนที่ถูกควบคุมด้วยการ retrotransposition ของรีโทรทรานสโพซอนชนิด LINE-1 นี้ มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันและมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพระดับอนุชีววิทยาของออทิซึมสเปกตรัมอย่างไร
2. กลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม มีความสัมพันธ์กันและมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพระดับอนุชีววิทยาของออทิซึมสเปกตรัมอย่างไร

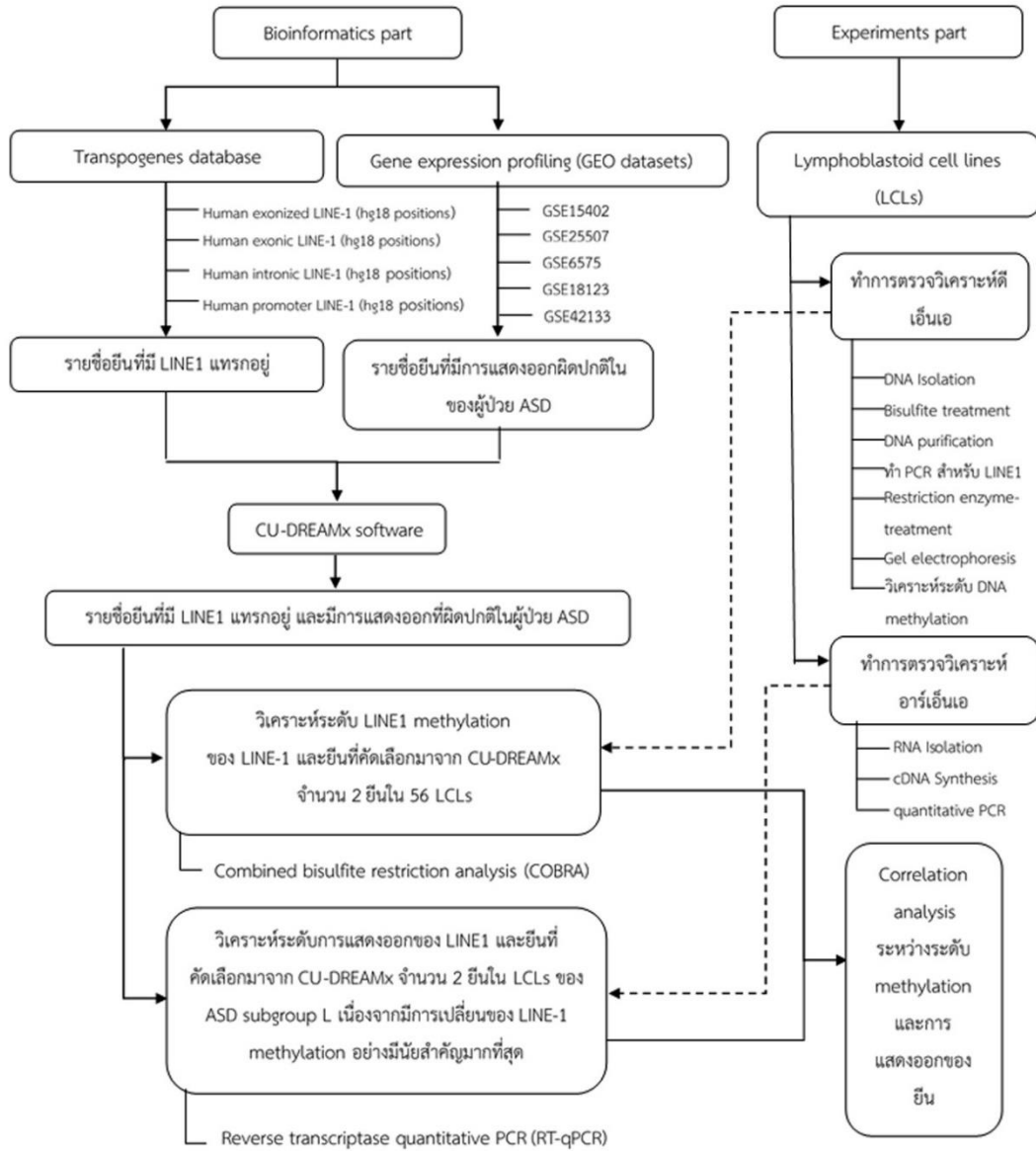
### สมมติฐานงานวิจัย

กลไก DNA methylation ของ LINE-1 มีความเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของ LINE-1 และยีนที่มีความผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม และกลุ่มยีนเหล่านั้นมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน และมีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม

## กรอบแนวคิดการวิจัย



## ระเบียบการวิจัย



## ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเครือข่ายการควบคุมยีนแบบเอพิเจเนติกส์ที่เกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัมด้วยการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 โดยทำการศึกษาใน lymphoblastoid cell lines (LCLs) ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) สำหรับ LINE-1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อลำดับเบสในตำแหน่ง regulatory region ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 เพื่อหาความแตกต่างของระดับเมธิเลชันระหว่างผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติ และประเมินความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพด้วย receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์จะใช้โปรแกรม Connection Up and Down Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAMx) เพื่อหากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติและมีการแทรกตัวของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม และใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ในการศึกษาความสำคัญ หน้าที่ทางชีวภาพและสร้างโครงข่ายทางชีวภาพ (Biological network and pathway analysis) ของยีน จากนั้นทำการยืนยันการแสดงออกด้วย qRT-PCR

ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือ การทำการศึกษาโดยใช้เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมและคนปกติ ทำให้ผลการทดลองที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อนหรืออาจมีความแตกต่างจากการใช้สิ่งตัวอย่างที่เป็น whole blood หรือเซลล์สมองจากผู้ที่เป็นโรคโดยตรงได้ นอกจากนี้จำนวน LCLs ของกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มย่อยยังมีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์รวม (pooling samples) อาจทำให้ผลการวิเคราะห์เอนเอียงไปทางกลุ่มตัวอย่างที่จำนวนมากได้

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบกลไกทางเอพิเจเนติกส์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งได้แก่ปฏิกิริยา methylation ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และทำให้ทราบบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ เครือข่ายควบคุมยีน และความสำคัญของยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งความรู้ที่ได้ อาจจะเป็นการศึกษานำร่อง หรือนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อเพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรคออทิซึมสเปกตรัมต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ออทิซึมสเปกตรัม (Autism spectrum disorder)

ออทิซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder; ASD) เป็นกลุ่มอาการที่มีความหลากหลายของลักษณะทางคลินิก โดยจะมีความบกพร่องทางด้านพฤติกรรม 2 ด้านหลัก ด้านแรก ได้แก่ ด้านการปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและการใช้ภาษาพูดและภาษากายในการติดต่อสื่อสาร (social interaction and communication) โดยเด็กที่เป็นออทิซึมจะมีลักษณะไม่ชอบเข้าสังคมซึ่งเป็นลักษณะอาการที่สำคัญ และขาดความรู้สึกสนใจร่วมกับผู้อื่น (attention-sharing behaviors) อาจมีอาการสบต่าน้อย เด็กที่เป็นออทิซึมมักเริ่มพูดจาสื่อสารได้ช้ากว่าเด็กปกติ การใช้ภาษามักเป็นลักษณะการท่องจำ พูดจาวกวน ซ้ำไปซ้ำมา หรืออาจพูดเฉพาะเรื่องที่ตนเองให้ความสนใจ ความบกพร่องด้านที่สอง ได้แก่ ด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมซ้ำ ๆ (restricted interests and repetitive behaviors) ซึ่งเป็นสิ่งที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดและเป็นตัวช่วยที่ดีในการใช้วินิจฉัยโรค เด็กที่เป็นออทิซึมอาจแสดงพฤติกรรมหรือการเคลื่อนไหวร่างกายแบบซ้ำไปซ้ำมาและจำกัดอยู่กับสิ่งที่สนใจไม่กี่ชนิด เช่น การโยกศีรษะไปมา การสะบัดมือ เป็นต้น ในเด็กโตที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมบางราย อาจเป็นแบบ high functioning คือจะมีความสนใจในบางเรื่องเป็นอย่างมาก ในกลุ่มที่มีความสนใจในด้านวิชาการนั้น หากได้รับการส่งเสริมและการสนับสนุนที่เหมาะสม อาจทำให้เด็กออทิซึมในกลุ่มนี้สามารถพัฒนาการเรียนรู้และการเข้าสังคมได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามตามลักษณะทางคลินิกต่างๆข้างต้น มักจะเกิดขึ้นในช่วงปฐมวัย (Gmitrowicz & Kucharska, 1994) คู่มือการวินิจฉัยโรคและสถิติของโรคที่มีความผิดปกติทางจิตฉบับที่ 5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth edition; DSM-5) ซึ่งถูกตีพิมพ์ขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2556 โดยสมาคมจิตแพทย์อเมริกัน (American Psychiatric Association) ร่วมกับผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่เกี่ยวข้อง ได้กำหนดเกณฑ์การวินิจฉัยเชิงพฤติกรรมเพื่อใช้ในการวินิจฉัยกลุ่มอาการออทิซึมเพียงอย่างเดียว ซึ่งได้เปลี่ยนแปลงจากคู่มือการวินิจฉัยโรคและสถิติของโรคที่มีความผิดปกติทางจิตฉบับที่ 4 (DSM-IV) ที่จัดกลุ่มอาการออทิซึมให้อยู่ในกลุ่ม Pervasive developmental disorder (PDD) ซึ่งไม่ทราบสาเหตุการเกิดที่แน่ชัด และจำแนกการวินิจฉัย PDD ออกเป็น 5 กลุ่มย่อย ได้แก่

- 1). กลุ่มออทิสติก (autistic disorder) เป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติอย่างเห็นได้ชัดในการพัฒนาการทางด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคม ด้านการใช้ภาษาพูดและภาษากายในการติดต่อสื่อสาร และด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมซ้ำ ๆ โดยถือเป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติรุนแรงที่สุด

2). กลุ่มแอสเพอร์เกอร์ (Asperger disorder) เป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติอย่างรุนแรงทางการพัฒนาการทางด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคม และด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมซ้ำ ๆ แต่มีการพัฒนาการทางการใช้ภาษาและการติดต่อสื่อสาร และสติปัญญาอยู่ในเกณฑ์ปกติ

3). กลุ่มซีดีดี (Childhood Disintegrative Disorder; CDD) เป็นกลุ่มอาการที่มีการพัฒนาการด้านพฤติกรรม, ความรู้สติปัญญา และด้านภาษาเป็นปกติในช่วงแรก และการพัฒนาการทั้งหมดจะถดถอย ในช่วงระหว่างอายุ 2 ถึง 10 ปี

4). กลุ่มพีดีดีเอ็นโอเอส (Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified; PDD-NOS) เป็นกลุ่มที่มีอาการทางออทิซึมสเปกตรัม แต่ไม่สามารถถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยอื่นๆได้

5). กลุ่มเรตต์ (Rett disorder) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการบกพร่องทางการพัฒนาการของสมองหลังคลอด ซึ่งมีสาเหตุมาจากการมีความผิดปกติของยีนเดี่ยว (single-gene defect) ได้แก่ เกิดการ mutations หรือ microdeletions ของ Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) gene บนโครโมโซม Xq28 มักจะพบในเด็กผู้หญิง

DSM-5 ยังมีการปรับเปลี่ยนเกณฑ์การวินิจฉัยโรคจาก 3 ด้านหลัก ใน DSM-IV ซึ่งได้แก่ ด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคม ด้านการสื่อสารและด้านพฤติกรรมซ้ำและความสนใจที่จำกัด ให้เหลือเพียง 2 ด้านหลัก ได้แก่ ด้านการสื่อสารทางสังคมและด้านของรูปแบบที่จำกัดและเกิดซ้ำของพฤติกรรมความสนใจ นอกจากนี้ ในคู่มือ DSM-5 ยังมีการกำหนดระดับความรุนแรงของอาการในผู้ที่ได้รับ การวินิจฉัยแล้วว่าเป็นกลุ่มอาการออทิซึมสเปกตรัมอีกด้วย (Gibbs, Aldridge, Chandler, Witzlsperger, & Smith, 2012)

### อุบัติการณ์และความชุกของออทิซึมสเปกตรัม

ออทิซึมสเปกตรัมกำลังเป็นปัญหาหลักทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก ซึ่งมีความชุกทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 1 ใน 100 (Fombonne, 2005) โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา ออทิซึมสเปกตรัมนั้นจัดว่าเป็นโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติทางการพัฒนาของระบบประสาทและสมองที่มีความชุก (prevalence) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยข้อมูลจาก Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network หน่วยงานสำรวจและประเมินความชุกของออทิซึมสเปกตรัมในพื้นที่เฝ้าระวังของประเทศสหรัฐอเมริกา จัดตั้งโดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) ทำการสำรวจในกลุ่มเด็กอายุ 8 ปีที่พ่อแม่หรือผู้ปกครองที่อาศัยอยู่ภายใน 14 พื้นที่ของ ADDM ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเด็กอายุ 8 ปี ระหว่างปี พ.ศ. 2549 และปี พ.ศ. 2551 ความชุกของออทิซึมสเปกตรัมสูงขึ้นคิดเป็น



ร้อยละ 23 โดยเพิ่มจาก 9 ใน 1,000 คน ในปี พ.ศ. 2549 เป็น 11 ใน 1,000 คน ในปี พ.ศ. 2551 และหากเปรียบเทียบระหว่างปี พ.ศ. 2545 และปี พ.ศ. 2551 ความชุกของออทิซึมสเปกตรัมสูงขึ้น คิดเป็นร้อยละ 78 โดยเพิ่มจาก 6 ใน 1,000 คน ในปี พ.ศ. 2545 เป็น 11 ใน 1,000 คน ในปี พ.ศ. 2551 (Christensen et al., 2016) แม้ว่าอัตราการตรวจพบโรคที่เพิ่มขึ้นส่วนหนึ่งอาจมาจากปัจจัยด้านต่างๆ เช่น อายุที่สามารถจะตรวจพบ การอพยพย้ายถิ่นฐาน และการเปลี่ยนแปลงทางด้านเกณฑ์การวินิจฉัย รวมไปถึงความเจริญก้าวหน้าและการพัฒนาการในการตรวจวินิจฉัย แต่พบว่าปัจจัยเหล่านี้ไม่สามารถอธิบายความชุกที่เพิ่มขึ้นของออทิซึมสเปกตรัมได้ทั้งหมด บ่งชี้ว่าแนวโน้มของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมนั้นมีจำนวนที่เพิ่มขึ้นจริง (Hertz-Picciotto & Delwiche, 2009) ส่วนในประเทศไทย การศึกษาทางด้านความชุกและระบาดวิทยา รวมถึงการรักษายังคงมีขอบเขตที่จำกัด แต่มีการศึกษาล่าสุดในปี พ.ศ. 2548 ซึ่งทำการเก็บข้อมูล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความชุกของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทย เพื่อใช้ประเมินสถานการณ์และวางแผนการรักษาที่มีประสิทธิภาพ รายงานว่าความชุกของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทยอยู่ที่ประมาณ 1 ต่อ 1,000 คน (Poolsuppasit, 2005) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทย ออทิซึมสเปกตรัมยังไม่เป็นที่รู้จักและแพร่หลายมากนัก อีกทั้งในพื้นที่ห่างไกล ผู้ป่วยอาจได้รับโอกาสในการเข้าตรวจและรับการดูแลรักษาด้านสุขภาพอย่างไม่ทั่วถึง ขาดความพร้อมทางด้านเครื่องมือเทคโนโลยีในการตรวจวินิจฉัยโรค ส่งผลให้ผลสำรวจทางด้านความชุกของโรคที่สำรวจตามสถานพยาบาล หรือโรงพยาบาล ได้น้อยเกินกว่าความเป็นจริง ด้วยเหตุนี้ จึงมีแนวโน้มว่าความชุกที่แท้จริงของออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทยในปัจจุบัน น่าจะสูงกว่าผลการศึกษาที่ได้ทำการสำรวจไว้ในปี พ.ศ. 2548 นอกจากนี้แล้ว การขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีวพยาธิสภาพ ความเสี่ยงและกลไกการเกิดโรค อาจทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมามากขึ้นด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม กับความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม

ในปัจจุบัน ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเกิดออทิซึมสเปกตรัมยังมีจำกัด แต่อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาพบว่าออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีการทอดทางพันธุกรรมสูงถึงประมาณร้อยละ 90 (Liu et al., 2001) โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับฝาแฝด (twin studies) ซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของออทิซึมสเปกตรัม โดยทำการศึกษาในฝาแฝด 2 ประเภท ได้แก่ monozygotic (MZ) twin หรือแฝดแท้ ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกันทุกประการ และ dizygotic (DZ) twin หรือแฝดเทียม ซึ่งจะมีลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกันเพียงครึ่งหนึ่ง พบว่าในฝาแฝด monozygotic (MZ) twin มีภาวะของออทิซึมสเปกตรัมที่ตรงกันประมาณร้อยละ 70-90 ส่วน dizygotic (DZ) twin จะมีภาวะของออทิซึมสเปกตรัมที่ตรงกันเพียงร้อยละ 10 (Bailey et al.,

1995) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวพี่น้อง (sibling) ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม พบว่าพี่น้องในครอบครัวของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม มีโอกาสที่จะเป็นออทิซึมสเปกตรัมมากกว่าคนปกติถึง 20 เท่า (Bolton et al., 1994; Fombonne, 2005) การค้นพบว่าออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูงมาก ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามทำการศึกษาความผิดปกติในด้านพันธุกรรมของออทิซึมสเปกตรัม จนในปัจจุบันสามารถรวบรวมรายชื่อยีนที่เป็นสาเหตุของความผิดปกติทางระบบประสาท และมีความเกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม (autism candidate genes) ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งองค์ความรู้เหล่านั้นสามารถนำมาสู่การพัฒนาการวินิจฉัยโรคในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ นอกจากนี้ ยังมีการนำเทคโนโลยีและเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ มาช่วยในการขยายขอบเขตการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของออทิซึมสเปกตรัมด้วย เช่น การวิเคราะห์ single nucleotide polymorphism (SNPs) หรือการวิเคราะห์ความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคนที่เกิดจากนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งทำให้แสดงผลทางกายภาพออกมาได้แตกต่างกัน ซึ่งมนุษย์แต่ละคนจะมีส่วนของจีโนมที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ไม่เกินร้อยละ 0.1 ส่งผลให้นักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์สามารถใช้ประโยชน์จากความแตกต่างนี้มาทำการตรวจวิเคราะห์ทาง SNPs เพื่อศึกษาข้อมูลพันธุกรรมบนโครโมโซม และใช้ในการทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ โดยมีการค้นพบว่า SNP-based diagnostic models ได้แก่ SNP rs878960 ใน Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3 (GABRB3) สามารถนำมาใช้ในการแบ่งแยกผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามระดับความรุนแรงของอาการที่แสดงออกได้ (Jiao et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค genome-wide association study (GWAS) หรือการค้นหา SNPs ที่สัมพันธ์กับโรค ซึ่งเป็นการศึกษา SNPs จำนวนมากในคราวเดียวกัน ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบความเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆของแต่ละบุคคล และล่าสุดได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคที่เรียกว่า next-generation sequencing มาใช้ศึกษาการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (copy number variants; CNVs) ในส่วนของจีโนมที่ใช้สร้างโปรตีน หรือการศึกษาเพื่อค้นหาลำดับเบสชนิดใหม่และชนิดที่หายากในจีโนมทั้งหมด เพื่อประเมิน Rare Variant, Common Disease (RVCD) หรือความแปรผันที่พบได้ยาก มาใช้ในการค้นหาตำแหน่งจำเพาะในจีโนมที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดออทิซึมสเปกตรัม (ASD susceptibility loci) เช่น มีการศึกษาพบว่า การเกิด deletions และ duplications ที่ตำแหน่ง 16p11.2 บนโครโมโซม (Kumar et al., 2008; Weiss et al., 2008) สามารถตรวจพบได้ในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม และจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดออทิซึมสเปกตรัมมากขึ้นเมื่อตรวจพบร่วมกัน โดยจะพบในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมคิดเป็น ร้อยละ 1 จากผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ส่วนในคนปกติจะพบเพียงน้อยกว่าร้อยละ 0.1 เท่านั้น (Weiss et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาด้วยวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดคือ การค้นพบยังมีนัยสำคัญทางสถิติต่ำ (Glessner et al., 2009) ส่งผลให้ในปัจจุบัน

ยังไม่มี ASD susceptibility loci โดเมนโครโมโซมที่จะสามารถอธิบายความสัมพันธ์ต่อการเกิดออทิสซึมสเปกตรัมของผู้ที่เป็นโรคออทิสซึมสเปกตรัมได้มากกว่าร้อยละ 1 ดังผลการค้นพบที่ได้กล่าวไปแล้ว ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่า การศึกษายีนเพียงยีนเดียว (single gene) หรือตำแหน่งบนโครโมโซมเพียงตำแหน่งเดียว อาจจะไม่สามารถอธิบายชีวพยาธิสภาพของออทิสซึมสเปกตรัมได้ทั้งหมด เนื่องจากโรคนี้น่าจะเป็นผลมาจากความผิดปกติของยีนหลายยีน (multigenic disorder) ที่มีความเกี่ยวข้องร่วมกัน และที่สำคัญอัตราส่วนของผู้ที่เป็นโรคออทิสซึมสเปกตรัมที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมนั้น ในปัจจุบันอธิบายได้เพียงร้อยละ 10-15 เท่านั้น แสดงว่าผู้ที่เป็นโรคออทิสซึมสเปกตรัมที่เหลือส่วนใหญ่ในปัจจุบันอีกกว่าร้อยละ 85 ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด หรือเป็น idiopathic cases (Barton & Volkmar, 1998) โดยเชื่อว่าปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมอาจเป็นปัจจัยร่วมของความผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่มนี้

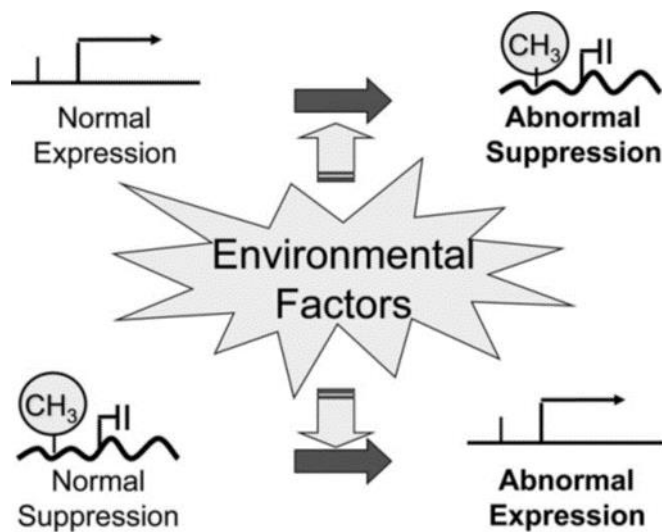
### ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม กับความผิดปกติในออทิสซึมสเปกตรัม

นอกจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรมที่เป็นสาเหตุของออทิสซึมสเปกตรัมแล้ว ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการทำงานของเซลล์เช่นกัน โดยมีการศึกษาวิจัยพบว่าสิ่งแวดล้อมที่มีความสัมพันธ์กับออทิสซึมสเปกตรัม เช่น อาหารที่รับประทาน, อายุของมารดา, การติดเชื้อของมารดาขณะตั้งครรภ์ (maternal infection), การสัมผัสสารเคมี สารพิษ และสารก่อภูมิแพ้ (allergens) มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง ที่อาจชักนำไปสู่การเกิดออทิสซึมสเปกตรัมได้ (Koufaris & Sismani, 2015) ดังเช่นมีการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของกระบวนการเกิด DNA methylation ของยีน p16 จากการได้รับสารตะกั่ว (lead) ในคนวัยผู้ใหญ่ที่เป็นเพศชาย โดย p16 เป็น tumor suppressor gene ที่มีความเกี่ยวข้องกับ neurodegeneration ซึ่งพบว่าคนที่มียาระดับสารตะกั่วในเลือดสูง จะมีการเกิด complete DNA methylation ในขณะที่คนที่มียาระดับสารตะกั่วในเลือดต่ำ มักพบเพียงการเกิด partial DNA methylation หรือไม่พบการเกิด DNA methylation เลย (Arendt, Holzer, & Gartner, 1998; Kovatsi et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณการได้รับสารอาหาร เช่น folate ก็มีความสัมพันธ์กับโรคออทิสซึมสเปกตรัมเช่นกัน เนื่องจาก folate เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยมีความสำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับ folate ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย จะส่งผลให้เกิดความบกพร่องของการทำงานของ Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) ซึ่งเป็นเอนไซม์มีความสำคัญต่อกลไก DNA replication และ DNA methylation อย่างมาก (Rosenblatt, 2001; Selhub, 2002) เมื่อการทำงานของ MTHFR enzyme เปลี่ยนแปลงไป จะส่งผลต่อกระบวนการ DNA methylation ส่งผลให้เกิดการ

ขาดเสถียรภาพของจีโนม (genomic instability) และเพิ่มความเสี่ยงต่อการ mutation ของยีน (Goin-Kochel et al., 2009; Scriver CR, 2002) ยิ่งไปกว่านั้น DNA methylation ยังเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญของกลไกทางเอพิเจเนติกส์ (epigenetic mechanisms) ที่ใช้ควบคุมการทำงานของยีน หรือระดับการแสดงออกของยีน โดยกลไกนี้เป็นเหมือนสะพานเชื่อมระหว่างปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมและรูปแบบการแสดงออกของยีน ดังนั้นการศึกษากลไกทางเอพิเจเนติกส์ในผู้ที่เป็โรคออทิซึมสเปกตรัมที่ไม่สามารถระบุสาเหตุทางพันธุกรรมได้นั้น จะช่วยให้สามารถทำความเข้าใจถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นมาจากปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมต่อกลไกทางอณูชีววิทยาภายในเซลล์ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมได้

### กลไกการควบคุมทางเอพิเจเนติกส์ในออทิซึมสเปกตรัม

ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคออทิซึมสเปกตรัมที่มีในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุสาเหตุที่ทำให้เกิดออทิซึมสเปกตรัมได้ทั้งหมด ยังคงมีช่องว่างอยู่ระหว่างสาเหตุที่เกิดจากปัจจัยภายใน (intrinsic factors) ได้แก่ ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม (genetic factors) และปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) ได้แก่ ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม (environment factors) เนื่องจากมีการศึกษารายงานว่า แม้โรคออทิซึมสเปกตรัมจะเป็นโรคที่มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูง และฝาแฝดร่วมไข่จะมีลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการเมื่อแรกเกิด แต่มีฝาแฝดร่วมไข่จำนวนไม่น้อยที่คนหนึ่งเป็นโรคแต่อีกคนไม่เป็น หรือมีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากัน (Wong et al., 2014) ซึ่งทำให้เกิดข้อสันนิษฐานว่าอาจมีกลไกทางชีวภาพบางกลไกที่เข้ามาเชื่อมต่อระหว่างปัจจัยทั้งสองด้านนี้ โดยกลไกนั้นเรียกว่ากลไกทางเอพิเจเนติกส์ (epigenetic mechanisms) ดังภาพที่ 1 (Ahmad, 2012) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการพัฒนาของระบบประสาทและสมองดังเช่นออทิซึมสเปกตรัม อาจเป็นผลมาจากการควบคุมยีนที่ผิดปกติ (dysregulation) ของกลไกทางเอพิเจเนติกส์ แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในจีโนมที่สามารถสร้างโปรตีนได้ (protein-coding region) ซึ่งถ้าหากเกิดขึ้นกับโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบประสาทและสมอง ก็อาจส่งผลทำให้การทำงานของระบบประสาทและสมองผิดปกติได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเกิดในช่วงอายุที่อยู่ในช่วงที่มีการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง



ภาพที่ 1 ผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อกลไกการทำงานของเอพิเจเนติกส์

โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการควบคุมของกลไกทางเอพิเจเนติกส์ได้ (Ahmad, 2012)

กลไกทางเอพิเจเนติกส์เป็นกลไกเหนือพันธุกรรม กล่าวคือเป็นกลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่เป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงนี้สามารถผันกลับได้และถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ และจากข้อสันนิษฐานข้างต้นที่ว่ากลไกการควบคุมทางเอพิเจเนติกส์นี้ อาจมีส่วนร่วมในการก่อให้เกิดอหิวาต์ซึมสเปกตรัมได้ ทำให้นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยหลายกลุ่มเริ่มหันมาศึกษาทางด้านเอพิเจเนติกส์ในอหิวาต์ซึมสเปกตรัมมากขึ้น โดยกลไกทางเอพิเจเนติกส์ที่น่าสนใจและอาจเกี่ยวข้องกับอหิวาต์ซึมสเปกตรัม ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation) การปรับแต่งของฮิสโตน (histone modification) และการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยอาร์เอ็นเอ (noncoding RNA) ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันหรือปฏิกิริยาการเติมหมู่เมธิลของดีเอ็นเอ นั้น มีความสัมพันธ์ต่อโรคอหิวาต์ซึมสเปกตรัมเป็นอย่างมาก

#### กลไกการเกิดเมธิเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation)

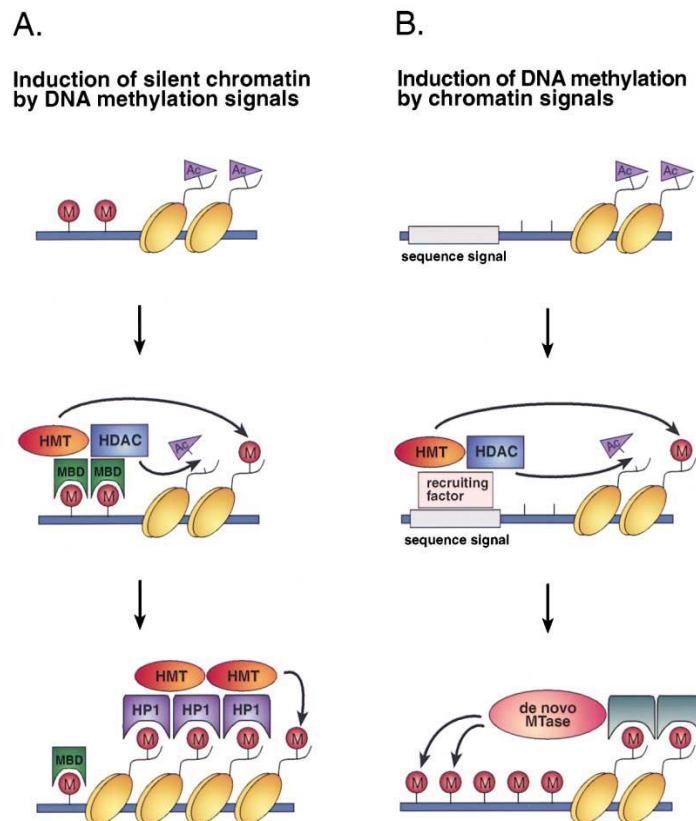
กระบวนการดีเอ็นเอเมธิเลชันในมนุษย์จะเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เป็นคาร์บอนตัวที่ 5 ของเบสไซโตซีน (5-methylcytosine หรือ 5-C<sup>m</sup>) ในบริเวณที่เป็น CpG dinucleotides หรือที่เรียกว่า CpG islands ซึ่งมักจะอยู่ในบริเวณที่เป็น promoter, transcription start sites และในบริเวณที่เป็น enhancer regions (Dahl, Gronbaek, & Guldborg, 2011) โดยการทำงานของกลไกนี้จะเป็นการ

ยับยั้งการแสดงออกของยีน (Ndlovu, Denis, & Fuks, 2011) ดีเอ็นเอเมธิลเลชันอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม DNA methyltransferases family ได้แก่ DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b ซึ่ง DNMT3a และ DNMT3b เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเติมหมู่เมธิลให้กับเบสไซโตซีน ส่วน DNMT1 เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการปรับเปลี่ยนให้ดีเอ็นเอเป็นเมธิลเลชันทั้งสองสาย (modifies hemi-methylated DNA) ขณะเกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ (DNA replication) (Pradhan & Esteve, 2003)

กระบวนการดีเอ็นเอเมธิลเลชัน เป็นสื่อกลางในการยับยั้งการแสดงออกของยีน (transcriptional repression) ได้โดยผ่านทาง 3 กลไกหลักๆ ได้แก่ 1). การขัดขวางกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยตรง 2). ทำให้เกิดการรวมตัวของ repressive protein complexes ซึ่งจะทำงานร่วมกันในการยับยั้งการแสดงออกของยีน และ 3). การส่งสัญญาณ (cross-talk) กับ histone Post-translational modifications (PTMs) ซึ่งทั้ง 3 กลไกนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างดีเอ็นเอ ส่งผลให้ transcription factors มาจับไม่ได้ จึงไม่เกิดการ transcription เกิดการระงับการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการมาจับสายดีเอ็นเอ ของ methyl binding proteins (MBPs) ตรงเบสไซโตซีนที่ถูก methylated ทำให้ป้องกันการมาจับของ transcription factors และเกิดการขัดขวางการมาจับของ chromatin remodeling complexes (Liyanage et al., 2014) ในมนุษย์ กระบวนการดีเอ็นเอเมธิลเลชันสามารถตอบสนองต่อการทำงานในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้ การควบคุมการแสดงออกของยีน (regulation of specific genes) ในช่วงที่มีการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยทำหน้าที่ในการกวดการแสดงออกของยีนในระยะยาว (Cedar & Bergman, 2009) การประทับตราทางพันธุกรรม (genomic imprinting) เป็นกระบวนการทางการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งเป็นอิสระจากกฎการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล ซึ่งยีนที่ถูกประทับตราจะแสดงออกก็ต่อเมื่ออัลลีล (allele) นั้นๆ ได้รับมาจากบิดาหรือมารดาเท่านั้น (Ferguson-Smith, 2011) การปิดการทำงานของโครโมโซมเอ็กซ์ (X-chromosomal inactivation) เนื่องจากเพศหญิงมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นสองเท่าของเพศชาย กระบวนการนี้จึงเป็นกระบวนการที่ทำให้การแสดงออกของโครโมโซมเอ็กซ์ในเพศหญิงไม่แสดงออกเป็นสองเท่าของเพศชาย โดยการแสดงออกจะมีระดับที่ใกล้เคียงกับเพศชาย (Chow, Yen, Ziesche, & Brown, 2005) และการควบคุมเสถียรภาพของโครโมโซม (preservation genomic stability) เป็นการควบคุมดูแลให้เกิดความเสถียรของโครโมโซม เมื่อมีส่วนใดในจีโนมที่จะมีส่วนทำให้เกิดความไม่เสถียรของโครโมโซม เช่น การไปปิดหรือยับยั้งการทำงานของรีโทรทรานสโพซอนที่มากเกินไป เป็นต้น (Maksakova, Mager, & Reiss, 2008)

นอกจากนี้การเกิดดีเอ็นเอเมธิลเลชันยังมีความเกี่ยวข้องกับกลไกทางเอพิเจเนติกส์อื่น ๆ เช่น histone modification ผ่านทางกระบวนการที่เรียกว่า “Epigenetic Crosstalk” ซึ่งส่งผลต่อการ

ควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณนั้นได้ ดังภาพที่ 2 โดยดีเอ็นเอเมธิเลชันสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิด heterochromatin ได้โดยเมื่อ DNMT ทำการเติมหมู่เมธิลที่บริเวณ promoter ของยีน จะเกิดการส่งสัญญาณให้ methyl binding protein (MBP) families มาจับที่หมู่เมธิล จากนั้น MBP จะเหนี่ยวนำเอนไซม์สองตัว ได้แก่ histone deacetylases (HDAC) ให้มาทำการดึงหมู่ acetyl ออกจาก histone และจากนั้น histone methylases (HMT) จะทำหน้าที่ในการเติมหมู่เมธิลให้กับ histone tails ที่อยู่บน nucleosomes ซึ่งจะทำให้เกิดเป็น recognition sites ของ chromatin silencers ต่าง ๆ เช่น heterochromatin protein 1 (HP1) เมื่อ chromatin silencers จับที่หมู่เมธิลที่เกิดจากการเติมของ HMT ผลก็คือทำให้เกิดการระงับการ transcription ของยีน (ภาพที่ 2A) นอกจากนี้ในทางตรงกันข้าม chromatin เองก็สามารถที่จะส่งสัญญาณไปเหนี่ยวนำให้เกิดดีเอ็นเอเมธิเลชันได้เช่นเดียวกัน โดยสัญญาณเริ่มต้นอาจจะอยู่ที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอซึ่งมีการส่งสัญญาณให้ protein factors ที่จับจำเพาะกับลำดับเบสนั้นมาจับ จากนั้นจะเกิดการเหนี่ยวนำ HDAC และ HMT มาและเกิดกระบวนการดั่งที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ซึ่งสุดท้าย HMT จะทำให้เกิดการเติมหมู่เมธิลที่ histone tails ซึ่ง histones ที่ผ่านกระบวนการ modification เหล่านี้ อาจจะเป็น recognition sites ของ protein factors ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดดีเอ็นเอเมธิเลชันในบริเวณนั้น ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเป็นในลักษณะการเหนี่ยวนำ de novo DNA methyltransferases (MTase) ให้มาเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโตซีนของสายดีเอ็นเอ (ภาพที่ 2B) (Ben-Porath & Cedar, 2001)



## ภาพที่ 2 กลไกการเกิด Epigenetic Crosstalk ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดดีเอ็นเอเมธิเลชัน

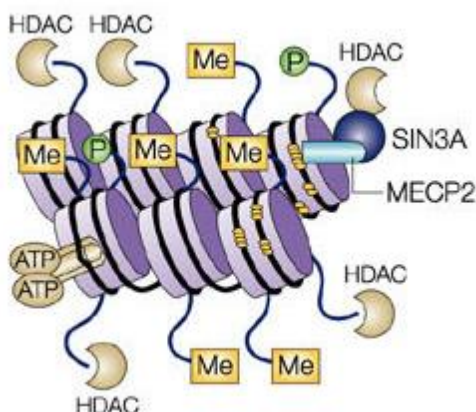
(A) การเหนี่ยวนำให้เกิด silent chromatin โดยกระบวนการ DNA methylation เมื่อเกิดการเติมหมู่เมธิลที่สายดีเอ็นเอ จะชักนำให้ MBD มาจับที่หมู่เมธิลนั้น และเกิดการเหนี่ยวนำให้ HDAC มาทำการดึงหมู่ acetyl ออก จากนั้น HMT จะทำหน้าที่เติมหมู่เมธิลที่บริเวณ chromatin tails ซึ่งจะกลายเป็น recognition sites ของ chromatin silencers ต่าง ๆ เช่น HP1 ทำให้เกิดการระงับการ transcription ของยีน (B) การเหนี่ยวนำให้เกิด DNA methylation โดย chromatin signals เกิดขึ้นได้โดยการที่ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอนั้นเป็น recognition sites ของ factors ต่าง ๆ เกิดการส่งสัญญาณให้ factors มาจับ จากนั้นจะเกิดการเหนี่ยวนำ HDAC ให้มาดึงหมู่ acetyl ออกและ HMT ให้เข้ามาเติมหมู่เมธิลบริเวณ chromatin tails ซึ่ง histones ที่ผ่านกระบวนการ modification เหล่านี้ อาจจะเป็น recognition sites ของ protein factors ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดดีเอ็นเอเมธิเลชันในบริเวณนั้น ซึ่งส่วนใหญ่ มักจะเป็นในลักษณะการเหนี่ยวนำ de novo DNA methyltransferases (MTase) ให้มาเติมหมู่เมธิลที่ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (Ben-Porath & Cedar, 2001)

## ความผิดปกติของกลไกดีเอ็นเอเมธิเลชันในออทิซึมสเปกตรัม

กระบวนการดีเอ็นเอเมธิเลชันมีเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ย้ายหมู่เมธิลมาเติมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน ได้แก่ DNMT ดังนั้นหากเกิดความผิดปกติขึ้นกับ DNMT ในระหว่างที่มี



การพัฒนาของระบบประสาทและสมอง ก็อาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ ตามมาได้ ดังเช่นมีการศึกษาพบว่า การเกิด deletion ของ DNMT1 ในเซลล์ประสาทและ astroglia ที่กำลังพัฒนาในสมองส่วน cortex และ hippocampus ของหนู สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท และส่งผลต่อการเกิดความบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำ โดยส่วนหนึ่งของเซลล์ประสาทที่เกิด hypomethylation อาจจะไม่เกิดการตายของเซลล์ประสาท แต่มีการแตกกิ่งก้านสาขาของ dendrites ที่มากขึ้น และมีความสามารถในการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นได้น้อยลง (Hutnick et al., 2009) อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าหนูที่ขาด DNMT1 และ DNMT3a ในเซลล์ประสาทระยะ post-mitotic จะมีความผิดปกติในระยะยาวของการสื่อกระแสประสาทใน Cornu Amonis 1 (CA1) hippocampal neurons ซึ่งทำให้เกิดความบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำเช่นกัน (J. Feng et al., 2010) ซึ่งจากหลักฐานทางการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นความสำคัญของกระบวนการดีเอ็นเอเมธิเลชันนั้นในระหว่างที่มีการพัฒนาของระบบประสาท และแสดงให้เห็นว่า DNMT นั้นมีความสำคัญต่อกระบวนการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท (synaptic plasticity) ซึ่งถ้าหากเกิดความผิดปกติไปก็อาจจะส่งผลต่อการเกิดการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง และอาจเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ ดังมีการศึกษาที่พบว่าผู้ที่เป็ออทิซึมสเปกตรัมนั้นมีความผิดปกติของ synaptic plasticity ด้วย (Xu et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการเกิดดีเอ็นเอเมธิเลชันนั้นมีความสัมพันธ์ต่อโรคออทิซึมสเปกตรัมมาก โดยมีการศึกษาพบว่ามีฝาแฝดร่วมไข่จำนวนไม่น้อยที่คนหนึ่งเป็นโรคแต่อีกคนไม่เป็น หรือมีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากันนั้น มีระดับ DNA methylation ที่ความแตกต่างกันอยู่มากด้วย (Wong et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าโรค Rett syndrome ซึ่งเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาท และมีความผิดปกติทางพฤติกรรมคล้ายกับออทิซึมสเปกตรัม เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ชื่อว่า methyl-CpG binding protein 2 (MECP2) (Bienvenu et al., 2000) ซึ่ง MECP2 เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยการทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการถอดรหัส (transcriptional repressor) จากดีเอ็นเอไปเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) โดยมีความสัมพันธ์กับ co-repressor complexes เช่น histone deacetylase (HDACs) และ mSin3 ในการทำหน้าที่ร่วมกันยับยั้งการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ปรับแต่งโครงสร้างโครมาตินได้ โดยการไปจับกับตำแหน่ง CpG ที่มีหมู่เมธิลในยีนเป้าหมาย และส่งสัญญาณให้เอนไซม์ดัดแปลงฮิสโตน (histone modification enzymes) มาจับและทำปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดการระงับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998) ดัง **ภาพที่ 3** (Johnstone, 2002)



### ภาพที่ 3 บทบาทหน้าที่ในระดับโมเลกุลของ MECP2 ในการควบคุมการแสดงออกของยีน

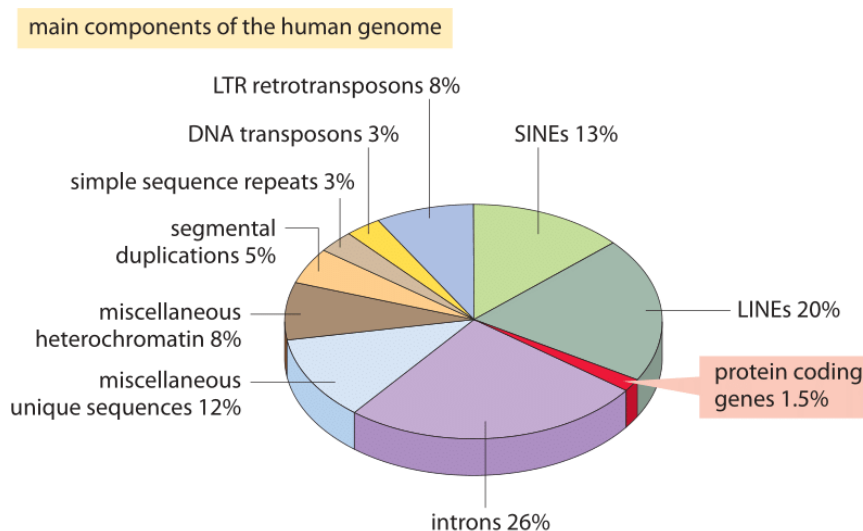
โดยจากภาพจะเห็นว่า MECP2 สามารถทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยการควบคุมกระบวนการ transcription และการจัดรูปแบบโครงสร้างของโครมาติน (Johnstone, 2002)

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการดีเอ็นเอเมธิเลชันในบริเวณต่าง ๆ ภายในสมองของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ สมองส่วน temporal cortex และ cerebellum (Ladd-Acosta et al., 2014) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมธิเลชันในสมองนั้น มีความสัมพันธ์กับการเกิดออทิซึมสเปกตรัม โดยในสมองส่วน temporal cortex ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีระดับเมธิเลชันลดลง (hypomethylation) ในยีน proline-rich transmembrane protein 1 (PRRT1) (Lai, 2002) และ chromosome 11 open reading frame 21 (C11orf21) (Goschnick & Jackson, 2007) ส่วนในสมอง cerebellum พบว่ามีระดับเมธิเลชันเพิ่มสูงขึ้น (hypermethylation) ในยีน Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A, Flavoprotein Pseudogene 3 (SDHAP3) (Rossignol & Frye, 2012) และในปี ค.ศ. 2010 ที่ผ่านมา Muotri และคณะได้ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเมธิเลชันของดีเอ็นเอในบริเวณที่เป็น promoter ของยีนในจีโนมมนุษย์ในออทิซึมสเปกตรัม โดยทำการวิเคราะห์ methylation profiling ขนาดใหญ่ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า CpG island microarray ของ lymphoblastoid cell lines (LCLs) จากเลือดของแฝดแท้หรือแฝดร่วมไข่ที่คนหนึ่งเป็นออทิซึมสเปกตรัมรุนแรง แต่อีกคนหนึ่งไม่เป็น (monozygotic twins discordant) และพี่น้องของพวกเขาที่ไม่ได้เป็นออทิซึมสเปกตรัมเช่นกัน โดยผลการศึกษา methylation profiling พบว่าระดับเมธิเลชันของยีนในแฝดผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมรุนแรงมีความแตกต่างกับแฝดและพี่น้องที่ไม่ได้เป็นออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) แสดงให้เห็นว่ายีนที่มีระดับเมธิเลชันที่ผิดปกตินั้น ทำหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของยีน และการพัฒนาของระบบประสาท

นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับอูเทิมสเปกตรัม โดยยีนที่น่าสนใจได้แก่ B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2) เป็น anti-apoptotic protein ซึ่งอยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Fatemi, Stary, Halt, & Realmuto, 2001) และ retinoic acid-related orphan receptor alpha (RORA) ซึ่งเป็นสมาชิกอยู่ใน NR1 subfamily ของ nuclear hormone receptors ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของหลาย ๆ ยีน (Gold, Gent, & Hamilton, 2007) โดยมีการศึกษาพบว่าการแสดงออกที่ลดลงในสมองส่วน cerebellum และ frontal cortex ของผู้ที่เป็นโรคอูเทิมสเปกตรัมเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติที่ไม่ได้เป็นอูเทิมสเปกตรัมที่มีเพศและอายุเดียวกัน (Nguyen et al., 2010)

จากหลักฐานทางการศึกษาข้างต้น ทำให้ทราบว่าความผิดปกติของกลไกการควบคุมทางเอพิเจเนติกส์อย่าง DNA methylation มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งในสมองและเลือดของผู้ที่เป็นโรคอูเทิมสเปกตรัม อย่างไรก็ตาม การศึกษาระดับเมธิเลชันโดยใช้เทคนิค CpG microarray ที่ทำให้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับเมธิเลชันเกิดขึ้นในหลาย ๆ บริเวณพร้อมกัน แต่การศึกษานี้เป็นการศึกษาเฉพาะในส่วนของยีนที่ผลิตโปรตีนได้เท่านั้น ซึ่งเป็นบริเวณที่กินพื้นที่ในจีโนมเพียงแค่ร้อยละ 1-2 ซึ่งในความเป็นจริงแล้ว ในจีโนมยังมีส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ ซึ่งในจำนวนนั้นมีประมาณร้อยละ 40-50 ที่เป็นส่วนประของจีโนมที่เคลื่อนที่ได้ (Transposable elements) ดังภาพที่ 4 (Milo & Phillips, 2016)





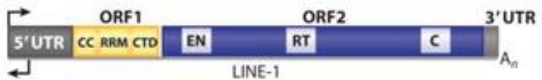
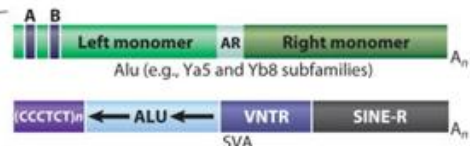



#### ภาพที่ 4 องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในจีโนมมนุษย์โดยประมาณ

ซึ่งพบว่าในส่วนของยีนที่สามารถผลิตโปรตีนได้ (protein coding) มีอยู่เพียงประมาณร้อยละ 1.5 ในขณะที่ Transposable elements เป็นส่วนที่มีมากที่สุดในจีโนมมนุษย์ คือประมาณร้อยละ 40-50 ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่สำคัญ ได้แก่ LINEs ประมาณร้อยละ 20 และ SINEs ประมาณร้อยละ 13 นอกจากนี้ยังมี ส่วนประกอบที่สำคัญอีก เช่น intron ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 26 ของจีโนมมนุษย์ (Milo & Phillips, 2016)

#### รีโทรทรานส์โพซอนชนิดไลน์วัน (LINE-1 หรือ L1)

ส่วนของจีโนมที่สามารถเคลื่อนที่ได้ในจีโนมทั้งหมดของมนุษย์ เรียกว่า ทรานส์โพซอน (transposon) ซึ่งทรานส์โพซอนทั้งหมด สามารถจัดประเภทออกตามลักษณะในการออกเคลื่อนที่ไปแทรกในลำดับเบสของดีเอ็นเออื่นๆ ถ้าเป็นดีเอ็นเอเคลื่อนที่ จะเรียกว่า ดีเอ็นเอทรานส์โพซอน (DNA transposons) ซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 3 ในจีโนมมนุษย์ทั้งหมด (human genome reference; HGR) และถ้าเป็นอาร์เอ็นเอจะเรียกว่า รีโทรทรานส์โพซอน (retrotransposons) (Beck, Garcia-Perez, Badge, & Moran, 2011) ดังภาพที่ 5

Type of mobile element	Example structure	HGR percentage	Active?
<b>DNA transposons</b>			
Transposons		~3%	No
	Mariner		
<b>Retrotransposons</b>			
Autonomous retrotransposons			
LTR retrotransposons		~8%	Uncertain (none known)
	HERV-K		
Non-LTR retrotransposons			
		~21%	Yes
	LINE-1		
Nonautonomous retrotransposons			
SINEs		~10% <1% ~2,700 copies	Yes
	Alu (e.g., Ya5 and Yb8 subfamilies)		
Processed pseudogenes		<1% ~11,000 copies	
	RPL21		

ภาพที่ 5 ชนิดและองค์ประกอบของ genetic elements ที่เคลื่อนที่ได้ในจีโนมมนุษย์ทั้งหมด

โดยจะแสดงชนิด โครงสร้าง ร้อยละของแต่ละชนิดที่มีใน human genome reference sequence (HGR) ;human endogenous retrovirus-K (HERV-K): long terminal repeat (LTR), group-specific antigen (Gag), polymerase (Pol), envelope protein (Env) ;LINE-1: untranslated region (UTR), coiled coil (CC), RNA recognition motif (RRM), carboxyl-terminal domain (CTD), endonuclease (EN), reverse transcriptase (RT), cysteine-rich domain (C) ;Alu: component sequences of the RNA polymerase III promoter (A และ B), the adenosine-rich segment separating the 7 SL monomers (AR) ;SINE-R/VNTR/Alu (SVA): variable number of tandem repeats (VNTR), domain derived from a HERV-K (SINE-R),. A<sub>n</sub> Signifies a poly (A) tail (A<sub>n</sub>) (Beck et al., 2011; Lander, 2011)

ในจีโนมมนุษย์ Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1 หรือ L1) มีความยาวประมาณ 6-8 kb พบอยู่ประมาณร้อยละ 17 ของ human genome reference (HGR) แต่มีเพียง human-specific LINE-1 (L1Hs) เท่านั้น ที่สามารถเคลื่อนที่เพื่อเพิ่มจำนวน (retrotransposition) และย้ายตำแหน่งด้วยตัวเองไปยังบริเวณต่าง ๆ จีโนมมนุษย์ได้ (autonomously active human retrotransposons) จึงถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ transposons Class I โดยการ retrotransposition ของมันจะเป็นลักษณะที่เรียกว่า copy-and-paste mechanisms (Beck et al., 2010; Beck et al., 2011; Lander, 2011)

ส่วนใหญ่การเกิด retrotransposition ของ LINE-1 ไปแทรกตัวในส่วน intragenic regions จะไปรบกวนบริเวณที่เป็น codon code แล้วชักนำให้เกิด missense หรือ nonsense mutations ในบริเวณที่เป็น coding regions ทำให้ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนในบริเวณนั้น ๆ (Kazazian et al., 1988) อีกทั้งที่บริเวณ 5'UTR (untranslated region) ของ LINE-1 ยังมีทั้ง sense และ antisense promoter ซึ่งเมื่อเกิดการ insertion ของ LINE-1 จะทำให้สามารถสร้าง transcription sites บริเวณใหม่หรือไปเสริมการทำงานของ promoter เดิมที่มีอยู่แล้วก็ได้ (Speek, 2001) นอกจากนี้แล้วการ insertion ของ LINE-1 ยังสามารถส่งผลกระทบต่อทั้งจีโนมได้ด้วย โดยการเปลี่ยนแปลงกลไกการเกิดเอพิเจเนติกส์ ซึ่งอาจชักนำให้เกิด chromatin modifiers เช่น การเกิดกระบวนการ methylation ที่ 5'UTR ของ LINE-1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มี CpG island แล้วทำให้เกิด chromatin condensation จากนั้นจึงเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ซึ่งผลนี้ก็สามารถมีอิทธิพลไปยังบริเวณอื่นๆของยีน รวมไปถึงปลาย 3'UTR ที่มีไม่ใช่ตำแหน่งที่มี CpG island แต่เป็น AT rich (Coufal et al., 2009; Garcia-Perez et al., 2010) นอกจากนี้โปรตีนที่ผลิตโดย LINE-1 ยังมีความสามารถในการ autonomous retrotransposition แล้ว มันยังสามารถที่จะไปรวมตัวกับ Small Interspersed Element (SINE) เพื่อเคลื่อนย้าย SINEs กลับเข้าไปในจีโนมได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า “Hijacked by SINEs” (J. M. Chen, Ferec, & Cooper, 2007)

ในเซลล์ร่างกายส่วนใหญ่ LINE-1 มักจะอยู่ในภาวะสงบนิ่ง แต่ในระหว่างการพัฒนาของเซลล์ประสาทและสมองนั้น LINE-1 จะมีการแสดงออกและการ retrotransposition ในระดับที่สูง ซึ่งการ retrotransposition ของ LINE-1 นี้จะสามารถไปเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ neuronal transcriptomes และรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ไป insert และยีนที่อยู่ใกล้เคียง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดโรคหรือความผิดปกติต่าง ๆ ของระบบประสาทและสมองได้ (Thomas, Paquola, & Muotri, 2012)

### โครงสร้างของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วัน

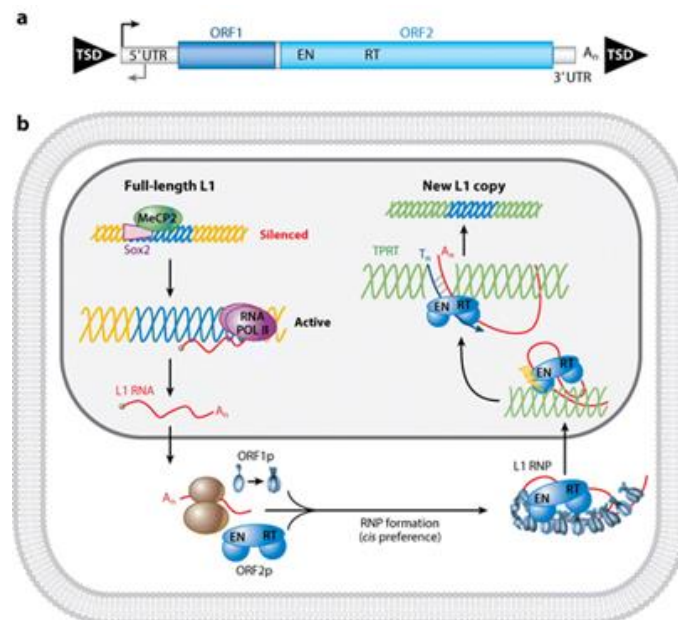
โครงสร้างของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 จะประกอบด้วย 5' untranslated region (UTR) และจะมี Open Reading Frame (ORF) 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ORF1 และ ORF2 บริเวณที่เป็น ORF1 เป็น nucleic acid chaperone ซึ่งเป็นส่วนที่จะทำให้เกิดความเสถียรภาพของโมเลกุล LINE-1 RNA จะประกอบไปด้วยโครงสร้าง 3 ส่วน ได้แก่ amino-terminal coiled coil (CC) domain ซึ่งเป็นชนิด leucine zipper domain (Holmes, Singer, & Swergold, 1992), RNA recognition motif (RRM) และ carboxyl-terminal domain (CTD) (Khazina & Weichenrieder, 2009) ซึ่งโครงสร้างทั้ง 3 ส่วนนี้มีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันไป โดย RRM และ CTD มีบทบาทสำคัญในการทำให้โปรตีน

ORF1 สามารถจับกับกรดนิวคลีอิกได้ (Januszzyk et al., 2007; Khazina & Weichenrieder, 2009) ส่วนบริเวณ ORF2 จะเป็นบริเวณที่จะจับกับ 3'UTR ของโมเลกุล LINE-1 RNA เพื่อที่จะ reintegration กลับเข้าไปในจีโนม ซึ่งบริเวณ ORF2 นี้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ zinc-knuckle domain, endonuclease domain และ reverse transcriptase domain โดยที่ endonuclease และ reverse transcriptase activities นั้น มีความสำคัญมากต่อการ retrotransposition และ insertion ของ LINE-1 จากนั้นด้านปลายอีกด้านจะเป็น 3' UTR ซึ่งถูกคั่นด้วย poly A tail ดังภาพที่ 6a. (Richardson, Morell, & Faulkner, 2014) บริเวณด้าน 5' UTR จะเป็นตำแหน่งที่อยู่ของ internal RNA polymerase II promoter ทำให้สามารถเกิดกระบวนการ transcription ได้โดยตรงด้วยตัวมันเอง นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย cis-acting binding sites สำหรับ transcription factors หลายชนิด ได้แก่ Yin Yang 1 (YY1), Runt-related transcription factor 3 (RUNX3) และ SRY (sex determining region Y)-box หรือ SOX family transcription factors (Athaniyar, Badge, & Moran, 2004; Minakami et al., 1992; Swergold, 1990) และนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยส่วนของ cysteine-rich domain ซึ่งอยู่ก่อนไปทาง carboxyl terminus (Doucet et al., 2010; Ergun et al., 2004) ดังภาพที่ 5 (Richardson et al., 2014; Thomas et al., 2012)

### กระบวนการเคลื่อนที่ของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วัน (LINE-1 retrotransposition)

การทำงานของ LINE-1 เริ่มจากการ transcription ของ full-length LINE-1 จาก internal RNA polymerase II promoter ทางด้าน 5' UTR ของตัวมันเอง ดังภาพที่ 6b. (Richardson et al., 2014) จากนั้นจะได้เป็น LINE-1 mRNA ซึ่งจะถูกส่งออกไปยังไซโทพลาสซึมและจะถูก translation ด้วยกลไกที่เรียกว่า unconventional termination-reinitiation ซึ่งเป็นกลไกที่ไม่จำเป็นต้องใช้ initiation codon AUG ในการเริ่มต้น (Alisch, Garcia-Perez, Muotri, Gage, & Moran, 2006) ทำให้มีจำนวน copies ของโปรตีน ORF1 และ ORF2 เพิ่มขึ้น จากนั้นโมเลกุลของโปรตีน ORF1 และ ORF2 จะกลับไปจับกับ encoding LINE-1 mRNA รวมเป็น cis-preference ซึ่งจะชักนำให้เกิดการสร้าง LINE-1 ribonucleoprotein (RNP) particle (Kulpa & Moran, 2006) จากนั้น LINE-1 RNP จะถูกส่งกลับเข้าไปในนิวเคลียส ซึ่งในนิวเคลียส endonuclease ของ LINE-1 จะทำการตัดสายดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริเวณ 5'-TTTT/A-3' เพื่อปลดปล่อยส่วนของ 3'-OH ซึ่งจะถูกนำมาใช้ต่อไปในการเป็น primer โดย LINE-1 Reverse Transcriptase เพื่อเริ่มต้นกระบวนการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ LINE-1 mRNA เป็น template ขั้นตอนนี้เรียกว่า termed target-site-primed reverse transcription (TPRT) ซึ่งสุดท้ายจะเกิดการแทรกของ LINE-1 เข้าทาง 5' UTR

เกิดเป็น LINE-1 copy ใหม่ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (Cost, Feng, Jacquier, & Boeke, 2002; Q. Feng, Moran, Kazazian, & Boeke, 1996; Jurka, 1997)



Richardson SR, et al. 2014.  
Annu. Rev. Genet. 48:1-27

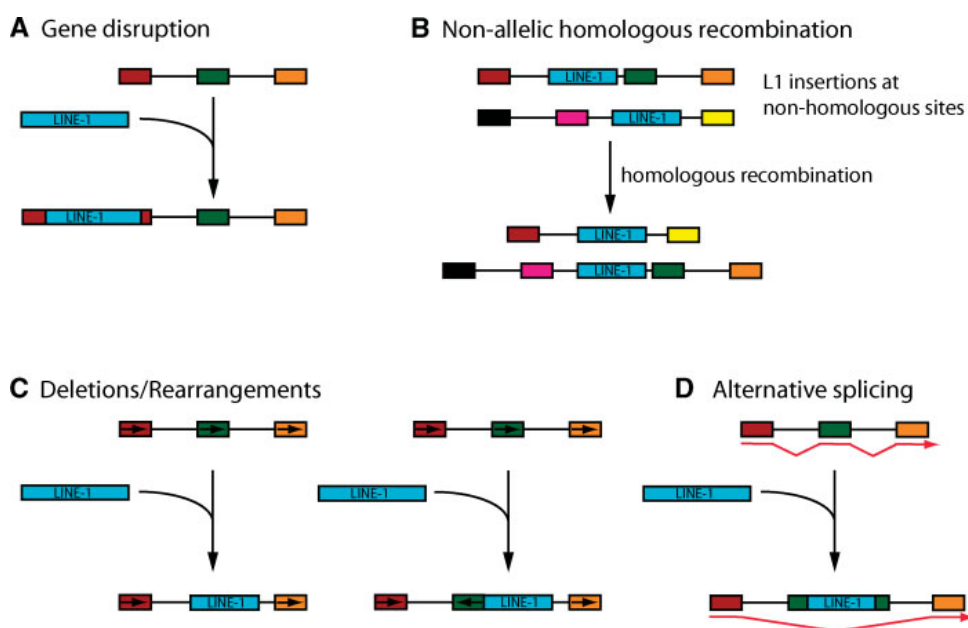
### ภาพที่ 6 กระบวนการ retrotransposition ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1

ภาพ (a) แสดงถึงโครงสร้างของ LINE-1 บริเวณของ 5' UTR ประกอบไปด้วย internal promoter (ลูกศรสีดำหนา) มี open reading frame 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ORF1 และ ORF2 ในส่วนของ ORF2 จะประกอบด้วย endonuclease (EN) และ reverse transcriptase (RT) ในส่วนของปลายสายจะมี 3' UTR และ poly-A tail ( $A_n$ ) และ LINE-1 จะถูกขนานข้างทั้งสองด้วย target-site duplications (TSD) ส่วนภาพ (b) แสดงถึงกลไกการเคลื่อนที่ของ LINE-1 (Richardson et al., 2014)

โดย LINE-1 สามารถ retrotransposition ไปแทรกยังส่วนต่าง ๆ ของจีโนม เช่น exon, intron และ promoter ซึ่งเมื่อเข้าแทรกตัวในยีนต่าง ๆ แล้ว sequences ของ LINE-1 อาจทำหน้าที่เป็นได้ทั้งจุดเริ่มต้น หรือจุดที่ทำให้เกิดการยับยั้งการ transcription ของยีน หรืออาจกลายเป็น exon ของยีนก็ได้ เป็นต้น โดยผลที่มีโอกาสเกิดขึ้นได้หลังจากการ retrotransposition ของ LINE-1 ไปแทรกตัวในยีนต่าง ๆ (ภาพที่ 7) ได้แก่ การรบกวนทำงานของยีนจากการเข้าแทรกตัวในส่วนที่สำคัญของยีนนั้น ๆ เช่น การเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ใน exon ของยีน (ภาพที่ 7A) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อการ transcription และการผลิตโปรตีนของยีน, การเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ในบริเวณที่เป็น non-homologous (ภาพที่ 7B) ซึ่งสามารถทำให้เกิด genome rearrangements



หรือเกิดความผิดปกติต่อ chromosome ได้ อีกทั้งการเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ยังสามารถส่งผลให้เกิดการ deletions หรือการ rearrangements ของ genome ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 7C) นอกจากนี้การเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ในบริเวณที่เป็น introns ของยีน ยังสามารถทำให้เกิดกระบวนการ exon skipping หรือ alternative splicing ได้ด้วย (ภาพที่ 7D) (Han & Boeke, 2005)



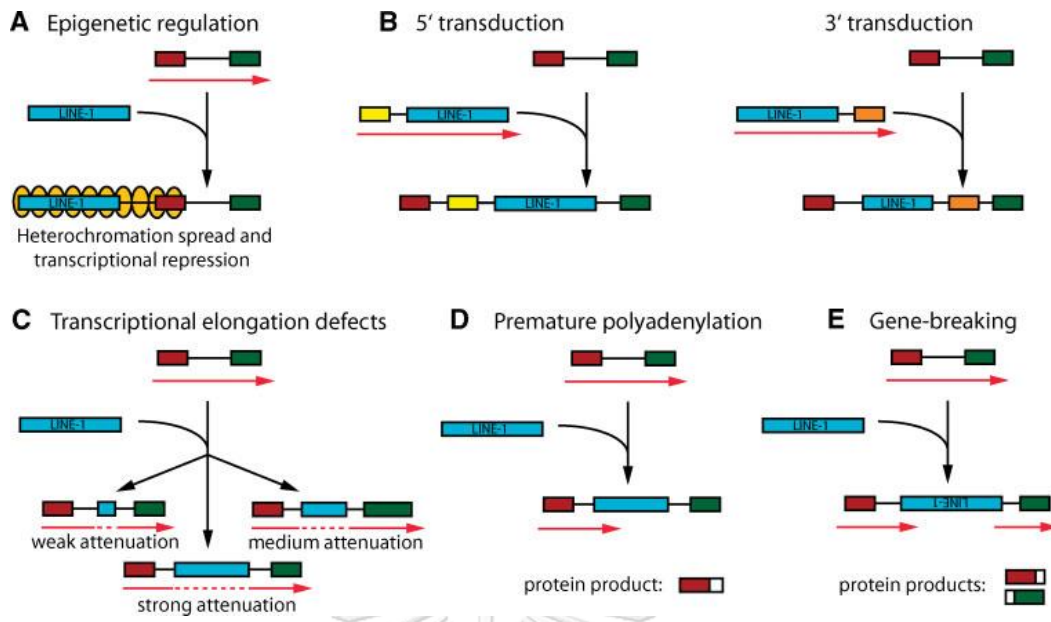
ภาพที่ 7 เหตุการณ์ที่อาจทำให้เกิดการรบกวนการทำงานของยีนจากการ retrotransposition ของ LINE-1

โดยกล่องสีต่าง ๆ แสดงแทน exon และเส้นตรงทึบสีดำ แสดงแทน introns ภาพ (A) การเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ในส่วนที่สำคัญของยีน เช่น exon ภาพ (B) การเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ในบริเวณที่เป็น non-homologous ทำให้เกิด homologous recombination และอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่าง ๆ ของโครโมโซม ภาพ (C) การเกิด deletions หรือ genome rearrangements จากการแทรกตัวของ LINE-1 ภาพ (D) การเข้าแทรกตัวของ LINE-1 ในบริเวณที่เป็น exon ของยีน ทำให้เกิดกระบวนการ exon skipping หรือ alternative splicing (Han & Boeke, 2005)

นอกจาก LINE-1 จะ retrotransposition ไปแทรกยังส่วนต่าง ๆ ของยีนและทำให้เกิดการรบกวนการทำงานของยีนแล้ว LINE-1 ยังสามารถควบคุมหรือส่งผลต่อการทำงานของยีนได้ โดยที่ไม่ได้ทำให้เกิดความเสียหายต่อยีนนั้น ๆ ผ่านทางกระบวนการดังแสดงใน ภาพที่ 8 ได้แก่ (1) การควบคุมยีนผ่านทางกลไก epigenetic modification โดยการที่ LINE-1 ไปเข้าแทรกตัวบริเวณ upstream ของยีน และเนื่องจาก LINE-1 promoter มี sequences ที่สามารถชักนำให้เกิด

กระบวนการ methylation ได้ และนำไปสู่การเกิด heterochromatin แม้เป็นวงกว้างไปจนถึง promoter ของยีน ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการ transcription ของยีน และเกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่อมาด้วย (ภาพที่ 8A) หรือ (2) อาจเกิดการ transduction ทาง 5'-UTR หรือ 3'-UTR ของ LINE-1 ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้โดยการ transcribes ในส่วนที่เป็น endogenous promoter ร่วมกับ LINE-1 ไปแทรกยัง intron ของยีน ถ้าเป็นการ transcribes ของ upstream endogenous promoter ร่วมกับ LINE-1 จะเรียกว่า 5' transduction แต่ถ้าเป็นการ transcribes ส่วนของ downstream endogenous promoter ร่วมกับ LINE-1 จะเรียกว่า 3' transduction ซึ่งจากการ transduction นี้ จะอำนวยให้ sequences ที่ถูก transduced เช่น อาจจะเป็นบริเวณที่เป็น exon, regulatory sequences หรือ poly A สามารถไปแทรกตัวในบริเวณใหม่ในจีโนมได้ (เช่น TF binding sites) โดยอาศัย LINE-1 เป็นตัวพาไป (ภาพที่ 8B) หรืออาจเกิด (3) กระบวนการ transcriptional elongation โดยการลดหรือยับยั้งการ transcription ของยีน จากการที่ LINE-1 เข้าไปแทรกตัวใน introns ของยีน ซึ่งประสิทธิภาพในการลดหรือยับยั้งการ transcription ของยีน นั้นแปรผันตรงกับความยาวของ LINE-1 ที่เข้าแทรกตัวใน introns นั้น ๆ (ภาพที่ 8C) และ (4) เนื่องจาก LINE-1 มีส่วนของ poly A อยู่จำนวนมาก เมื่อ LINE-1 เข้าแทรกตัวใน endogenous genes จะสามารถทำให้เกิดกระบวนการ premature polyadenylation ซึ่งส่งผลให้เกิด mRNA isoforms ใหม่ ๆ ที่สามารถ translation ในส่วนของ introns ซึ่งจะกลายมาเป็น 3'-UTR ของยีนได้ ทำให้เกิดโปรตีน isoforms ใหม่ ๆ ที่มีความหลากหลาย นอกจากนี้ (5) การที่ full-length bidirectional LINE-1 promoter เข้าแทรกตัวในบริเวณ introns ของ endogenous genes ไม่เพียงแต่สามารถทำให้เกิดการ transcription จาก sense promoter ไปหยุดในบริเวณต่าง ๆ ของ LINE-1 poly A ได้ แต่ยังสามารถทำให้เกิด downstream transcript โดยเริ่มจาก LINE-1 antisense promoter ซึ่งจากเหตุนี้ ทำให้ทำให้เกิดถึง 2 LINE-1 transcripts ซึ่งสามารถ translation ออกมาเป็นโปรตีนที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่โดยรวมแล้วมีความคล้ายคลึงกับ full-length ของโปรตีนต้นแบบ (Han & Boeke, 2005; Thomas et al., 2012)

ซึ่งจากความสามารถในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีความหลากหลายของ LINE-1 นี้ แสดงให้เห็นว่า การ retrotransposition ของ LINE-1 มีความสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งถ้าหากเกิดความผิดปกติต่อการ retrotransposition ของ LINE-1 ก็อาจส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนและการผลิตโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป และอาจส่งผลต่อเครือข่ายการควบคุมยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับยีน ๆ และสุดท้ายคือส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อหน้าที่ทางชีวภาพต่าง ๆ ได้

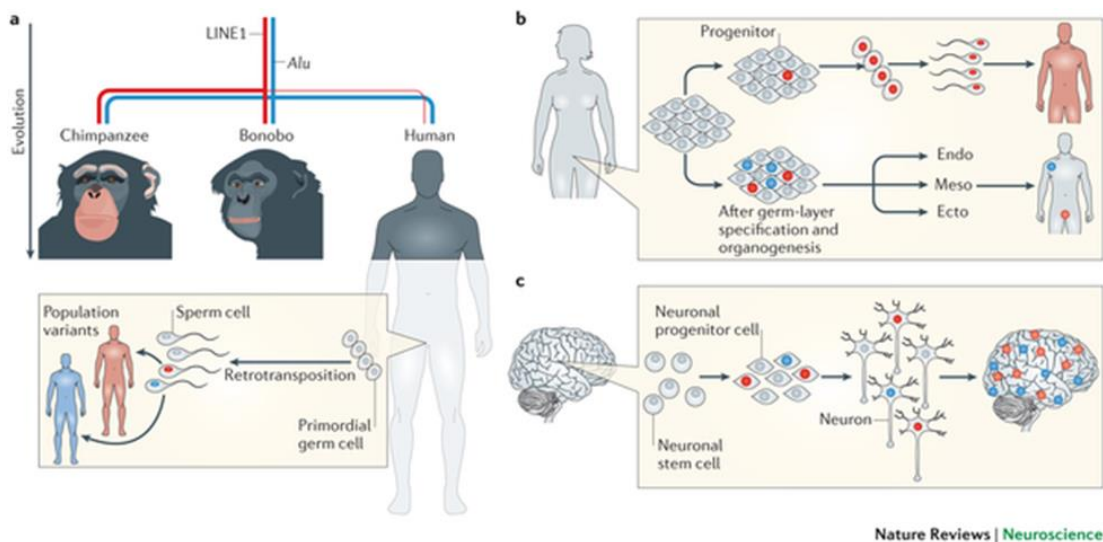


ภาพที่ 8 กระบวนการควบคุมยีนของ LINE-1 เมื่อเข้าแทรกตัว โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายกับยีน โดยกลองสี่ต่าง ๆ แสดงแทน exon กลองสี่ขาว แสดงแทน intron transcripts และเส้นตรงทึบสีดำ แสดงแทน introns ภาพ (A) Epigenetic regulation เป็นควบคุมยีนของ LINE-1 ผ่านกระบวนการ epigenetic mechanisms เช่นการเกิด DNA methylation ในบริเวณ LINE-1 promoter แล้วเกิด heterochromatin เป็นวงกว้างไปจนถึง gene promoter ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนตามไปด้วย ภาพ (B) Transduction เป็นการ transcription ในส่วนของ upstream หรือ downstream endogenous promoter ร่วมกับ LINE-1 แล้วไปแทรกในบริเวณที่เป็น intron ของยีน ทำให้ยีนสามารถนำ sequences ที่ถูก transduced ไปแทรกยังบริเวณใหม่ ๆ ของจีโนมได้ โดยอาศัย LINE-1 เป็นตัวพาไป ภาพ (C) Transcriptional elongation defects เป็นกระบวนการที่ LINE-1 เข้าแทรกตัวใน introns ของยีนแล้วทำให้เกิดการลดหรือยับยั้งการ transcription ของยีน โดยประสิทธิภาพในการลดหรือยับยั้งนี้ขึ้นอยู่กับความยาวของ LINE-1 ที่เข้าแทรกตัวใน introns ภาพ (D) Premature polyadenylation โดย LINE-1 ที่เข้าแทรกตัวใน endogenous genes สามารถหยุดการ transcription ก่อนกำหนดได้ ทำให้เกิด mRNA isoforms ใหม่ และผลิตโปรตีน isoforms ใหม่ ๆ ตามมา ภาพ (E) Gene breaking เป็นกระบวนการควบคุมยีนโดยอาศัย sense และ antisense promoter ของ LINE-1 ที่มีความสามารถในการ transcription ได้ทั้ง 2 ทาง ทำให้เกิด 2 transcripts ที่ผลิตโปรตีนออกมาแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่โดยรวมคือมีความคล้ายคลึงกับ full-length ของโปรตีนต้นแบบ (Han & Boeke, 2005)

### บทบาทของรีโทรทรานสโพซอนไลน์วันกับการเกิดโรคมะเร็ง

ในช่วงแรกยังมีการเชื่อกันว่ารีโทรทรานสโพซอนในจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะพบเพียงแคใน germ cells, pluripotent cells และ cancer tissues เท่านั้น แต่ในระยะหลังได้มีการศึกษา

พบว่ามียีโรทรานสโพซอนชนิด LINE-1 ในระบบประสาทและสามารถเคลื่อนที่ได้ในภายในสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย ดัง **ภาพที่ 9c** (Erwin, Marchetto, & Gage, 2014) โดยในปี ค.ศ. 2005 Alysson R. Muotri และคณะ ได้พบว่า engineered human LINE-1 สามารถเคลื่อนที่ได้ใน neural progenitor cells (NPCs) ของหนูในหลอดทดลอง (adult rat NPCs in vitro) และในสมองของหนูทดลอง (transgenic mice in vivo) ซึ่งการเคลื่อนที่ของ LINE-1 ใน NPCs ของหนูในหลอดทดลอง มีอิทธิพลต่อการแสดงออก (neuronal gene expression) และการเปลี่ยนแปลงของยีนในเซลล์ประสาท (neuronal gene differentiation) โดยกระบวนการเคลื่อนที่ของ LINE-1 สามารถพบได้ทั้งในส่วนที่เป็น neurogenic และ non-neurogenic areas ในสมองของหนูวัยผู้ใหญ่ แสดงให้เห็นถึงว่า การเคลื่อนที่ของ LINE-1 ไม่ได้เกิดเฉพาะเพียงแต่ใน mature NPSc เท่านั้น แต่ยังสามารถเกิดในเซลล์ประสาทที่กำลังมีการพัฒนาอยู่ได้เช่นกัน ซึ่งในปี ค.ศ. 2016 Erwin และคณะได้พบว่า LINE-1 มีโอกาสที่จะชักนำให้เกิดการสูญเสียเสถียรภาพของ DNA หรือ DNA double stranded break โดยเฉพาะบริเวณที่มีการ insertion ของ LINE-1 หรือ germ-line LINE-1 loci เนื่องจากมีการ upregulation ของ ORF2 endonuclease ระหว่างที่มีการพัฒนาหรือการ differentiation ของเซลล์ประสาท (Erwin et al., 2016) นอกจากนี้ในเชิงกลไกในระดับโมเลกุลพวกเขาพบว่า SOX2 อาจมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของ LINE-1 ใน hippocampus neural stem cells (HNC) ของหนูโตเต็มวัย และในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์ประสาท การลดลงของ SOX2 พบว่ามีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ LINE-1 และเพิ่มขึ้นของเคลื่อนที่ของ LINE-1 ซึ่งการค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทบางส่วน อาจมีการแสดงออกไม่คงที่ ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของการ retrotransposition ของ LINE-1 ที่เกิดขึ้น (Muotri et al., 2005)



Nature Reviews | Neuroscience

### ภาพที่ 9 วิวัฒนาการการค้นพบรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

ภาพ (a) แสดงถึงการมีบรรพบุรุษร่วมกันของมนุษย์ ลิงชิมแปนซีและลิงโบโนโบ รีโทรทรานสโพซอนพบใน germ lines ซึ่งมีผลทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (genomic variation) เป็นการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) โดยพบว่า Alu retrotransposition rates (เส้นหนาสีน้ำเงิน) ในระหว่างทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความใกล้เคียงกัน แต่ใน LINE-1 retrotransposition rates พบว่ามีการถูกระงับลงในมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่า LINE และ Alu elements สามารถพบได้ในเซลล์สืบพันธุ์มนุษย์ และถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ ภาพ (b) แสดงถึงกระบวนการ retrotransposition ในร่างกายมนุษย์สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา ระหว่างกระบวนการสร้างตัวอ่อน (embryogenesis) กระบวนการ retrotransposition ที่เกิดใน early pluripotent progenitor cells จะส่งผลต่อ somatic mosaicism โดยเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะเหล่านี้จะไปอยู่ตามเนื้อเยื่อและบริเวณจำเพาะต่างๆในร่างกาย รวมไปถึงใน germ lines ด้วย ส่วน retrotransposition ที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการ germ-layer specification และกระบวนการสร้างอวัยวะ (organogenesis) อาจจะมีผลต่อเนื้อเยื่อที่จำเพาะนั้นๆ แต่จะไม่มีผลเช่นนั้นใน germ lines ส่วนในภาพ (c) แสดงถึงการเกิด retrotransposition ในร่างกายซึ่งเพิ่มขึ้นในขณะที่เซลล์ประสาทต้นกำเนิด (neural stem cells) กำลังมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท (neurons) ส่งผลให้เซลล์ประสาทในร่างกายมีความจำเพาะเจาะจงและมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว โดย retrotransposition rates และบริเวณที่จะเกิด retrotransposition จะเป็นลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละบุคคล ซึ่งจะแตกต่างกันไป (Erwin et al., 2014)

นอกจากการศึกษาที่พบว่า LINE-1 สามารถพบและเคลื่อนที่ในเซลล์ประสาทในสมองหนูทดลองได้ ยังมีหลักฐานอื่นพบว่าในหนูที่เป็นต้นแบบของโรค Rett's syndrome ซึ่งจะขาดโปรตีน MeCP2 ที่เป็นโปรตีนที่สำคัญต่อปฏิกิริยาเมธิเลชัน (global DNA methylation) และมีความสำคัญต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง (neurodevelopmental disease)

โดยหนูที่ขาดโปรตีน MeCP2 นั้น จะมีการแสดงออกและการ retrotransposition ของ LINE-1 เพิ่มขึ้นมากกว่าในหนูปกติ และเมื่อทำการศึกษาใน neuronal progenitor cells ซึ่งพัฒนามาจาก human induced pluripotent stem cells และ human tissues ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม ยังก็พบว่าในผู้ที่เป็นโรค Rett's syndrome ซึ่งมีการ mutation ของโปรตีน MeCP2 นั้น ก็มีการเคลื่อนที่ของ LINE-1 มากขึ้นกว่าปกติเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้จากการทดลองในหนูทดลอง (Muotri et al., 2010) จากหลักฐานทางการศึกษาที่ได้กล่าวไปข้างต้น บ่งชี้ว่าการควบคุมที่ผิดปกติของการ retrotransposition และการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 น่าจะมีส่วนในการเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติและโรคของการพัฒนาทางระบบประสาทและสมอง เช่น ออทิสซึมสเปกตรัมได้ด้วย

### Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs)

เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว หรือ Lymphoblastoid cell lines (LCLs) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบีลิมโฟไซท์ (peripheral B lymphocytes) ที่ได้รับการ infected ด้วย Epstein-Barr virus (EBV) ในหลอดทดลอง โดยที่ EBV นั้นเป็นไวรัสชนิด lymphotropic gamma herpes virus ทำให้เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวมีคุณสมบัติเพาะเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่อง แบ่งตัวได้เร็ว เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจะมีการแสดงออกของ Epstein-Barr virus nuclear antigens 6 ชนิด ได้แก่ EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C และ EBNA3L และมีการแสดงออกของ latent infection membrane protein 3 ชนิด ได้แก่ LMP1, LMP2A และ LMP2B นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของโปรตีน small untranslated nuclear RNA molecules หรือ non-polyadenylated RNAs 2 ชนิด ได้แก่ EBER1 และ EBER2 (Farrell, 1995; Young & Rickinson, 2004) เนื่องจากข้อดีในด้านความสะดวกในการเพาะเลี้ยง การดูแลรักษาเซลล์ และความง่ายต่อการนำมาใช้งานแล้ว เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวยังสามารถนำมาสกัดสารพันธุกรรม ได้แก่ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนได้ รวมถึงการมี somatic mutation rate ที่ต่ำเพียงร้อยละ 0.3 (Mohyuddin et al., 2004) ทำให้ในปัจจุบันมีการนำเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวมาใช้ในการศึกษาและการวิจัยต่างๆในทางชีววิทยาและทางการแพทย์อย่างแพร่หลายมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิเคราะห์ความสอดคล้องของระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันในสมองและในเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วย Parkinson disease (PD) ซึ่งเป็นโรคที่เกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท (neurodegenerative disorder) ที่พบมากในผู้สูงอายุ และพบว่าการผิดปกติของการควบคุมกระบวนการดีเอ็นเอเมธิเลชันมีความเกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดโรค โดยทำการวิเคราะห์ genome-wide DNA methylation ในสมองและเลือดของผู้ป่วย PD และทำการศึกษารูปแบบการเกิดเมธิเลชันในยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ PD ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันในสมองของ

ผู้ป่วย PD นั้นมีความสอดคล้องกับระดับตีเอ็นเมธเลชันในเลือดของผู้ป่วย PD ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับตีเอ็นเอเมธเลชันในสมองสามารถสะท้อนความผิดปกติภายในเลือดได้ ซึ่งอาจจะเป็นสัญญาณที่ดีในการพัฒนาเพื่อใช้เลือดเป็นตัวแทนของการวินิจฉัยระดับตีเอ็นเอเมธเลชันจากเนื้อเยื่อสมองได้ (Masliah, Dumaop, Galasko, & Desplats, 2013)



### บทที่ 3

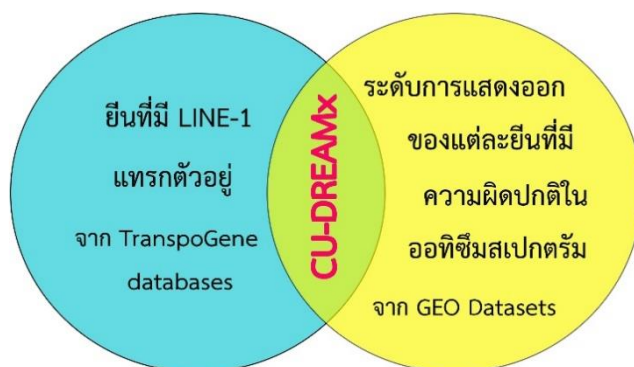
#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคอหิวาต์ชิมสเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม Connection Up and Down Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAMx)

ในการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์จะใช้โปรแกรม Connection Up and Down Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAMx) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ microarray datasets โดยเอาผล gene expression profiling ที่ต้องการศึกษา ซึ่งอาจมี conditions แตกต่างกันไป มาทำการวิเคราะห์หาสิ่งที่มีร่วมกัน เช่น gene regulation pathways หรือค้นหารายชื่อยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของยีน การศึกษาการควบคุมยีนที่มีความสำคัญ การศึกษาโรคที่ต่างกันแต่มีการควบคุมยีนเหมือนกัน การศึกษาเซลล์ที่ใช้กระบวนการควบคุมยีนร่วมกัน และการศึกษา common gene regulation pathways เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ต่างกัน (Aporntewan & Mutirangura, 2011)

ในงานวิจัยนี้โปรแกรม CU-DREAMx จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์บทบาท หรือความสัมพันธ์ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 กับระดับการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในผู้ป่วยอหิวาต์ชิมสเปกตรัม ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx จะแสดงให้เห็นทราบถึงกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ เพื่อนำมาวิเคราะห์บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพว่ากลุ่มยีนนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับ LINE-1 มีความสำคัญต่อความผิดปกติในผู้ป่วยอหิวาต์ชิมสเปกตรัมอย่างไร ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 10





### ภาพที่ 10 หลักการตรวจวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx software ในการศึกษา

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยอูเทอริสเปกตรัม และกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ จาก microarray data โดยโปรแกรม CU-DREAMx จะทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนจาก microarray data ด้วย t-test และนำมา overlap (chi-square test) กับรายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ ที่ได้รวบรวมจาก TranspoGene database

การวิเคราะห์จะใช้ข้อมูลรายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ในทุกรูปแบบ ได้แก่ Human exonized LINE-1 (hg18 positions), Human exonic LINE-1 (hg18 positions), Human intronic LINE-1 (hg18 positions) และ Human promoter LINE-1 (hg18 positions) ที่รวบรวมจาก TranspoGenes database (Levy, Sela, & Ast, 2008) มาทำการหาความสัมพันธ์แบบ intersection กับรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในอูเทอริสเปกตรัม ที่ได้จากฐานข้อมูล Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets ได้แก่ การศึกษา GSE15402 ซึ่งเป็น gene expression profiling ของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวที่ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค microarray โดย Dr. Valarie Hu และคณะ ได้ดำเนินการไว้ในปี ค.ศ. 2009 (Hu et al., 2009) และนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ในการศึกษานี้ด้วย โดยเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวนี้ ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่ม S, กลุ่ม M และกลุ่ม L รวมไปถึงกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังได้ทำการคัดเลือก GEO DataSets ของ gene expression profiling จากการศึกษาอื่น ๆ อีก 4 การศึกษามาทำการวิเคราะห์ร่วมด้วย โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกได้แก่ (1) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับ transcriptomics ของผู้ป่วยอูเทอริสเปกตรัมที่เป็นมนุษย์ด้วยเทคนิค microarrays เนื่องจากในการวิเคราะห์จะใช้โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ microarray data โดยเฉพาะ (2) เป็นการศึกษาที่ใช้สิ่งตัวอย่างเป็นเซลล์ เลือดหรือเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยอูเทอริสเปกตรัมที่เป็นมนุษย์ เนื่องจากต้องการศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยอูเทอริสเปกตรัมที่เป็นมนุษย์เท่านั้น (3) เป็นการศึกษาที่มีขนาดของกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ เพื่อเป็นตัวแทน

ของกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมที่มีความหลากหลาย ซึ่งการศึกษาที่คัดเลือกมาได้นั้น ประกอบด้วย GSE25507, GSE6575, GSE18123 and GSE42133 โดยรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

GEO datasets	Topic	Sample Type	Sample Size			References
			Normal	ASD	Total	
GSE 15402	Gene expression profiling differentiates autism case-controls and phenotypic variants of autism spectrum disorders	lymphoblastoid cell lines (LCLs)	29	87	116	(Hu et al., 2009)
GSE 25507	Autism and Increased Paternal Age Related Changes in Global Levels of Gene Expression Regulation	peripheral blood lymphocytes (PBLs) of children	64	82	146	(Alter et al., 2011)
GSE 6575	Gene expression in blood of children with autism spectrum disorder	blood of children	12	35	47	(Gregg et al., 2008)
GSE 18123	Characteristics and predictive value of blood transcriptome signature in males with autism spectrum disorders	blood	115	170	285	(Kong et al., 2012)
GSE 42133	Cell cycle networks link gene expression dysregulation, mutation, and brain maldevelopment in autistic toddlers	leukocytes	56	91	147	(Pramparo et al., 2015)

ตารางที่ 1 รายการ GEO DataSets ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติกับกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่สิ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม CU-DREAMx โดยในตารางแสดงรายละเอียดของ GEO DataSets ทั้ง 5 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมที่ได้รับการคัดเลือกมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในการศึกษานี้

### 3.1.1 ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx

3.1.1.1. รายชื่อยีนที่พบว่ามี การแทรกตัวของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 อยู่ในทั้ง 4 รูปแบบ โดยดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลของ TranspoGene database ได้แก่

3.1.1.1.1. Human exonized LINE-1 (hg18 positions):

รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่ในบริเวณที่เป็น introns แล้ว DNA sequences ของ LINE-1 ทำให้เกิดเป็น exons ขึ้นภายในยีน

3.1.1.1.2. Human exonic LINE-1 (hg18 positions):

รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่ในบริเวณที่เป็น exons ของยีน

3.1.1.1.3. Human intronic LINE-1 (hg18 positions):

รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่ใน บริเวณที่เป็น Introns ของยีน

3.1.1.1.4. Human promoter LINE-1 (hg18 positions):

รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่ในบริเวณที่เป็น promoter ของยีน

3.1.1.2. ข้อมูลระดับการแสดงออกของยีนจากทั้ง 5 การศึกษาในตารางที่ 1 ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จาก <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds> โดยข้อมูลที่ดัดแปลงข้อมูลของแต่ละ GEO DataSets ซึ่งจะประกอบด้วยรูปแบบการแสดงออกของยีนและเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.1.1.2. โปรแกรม CU-DREAMx ซึ่งสามารถดำเนินการดาวน์โหลดได้จาก

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

3.1.1.2.1. CU-DREAMx application file

3.1.1.2.2. Template files

### 3.1.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx

3.1.2.1 ทำการคัดเลือกรายชื่อยีนที่ดาวน์โหลดจาก TranspoGene database และเลือกเอาเฉพาะยีนที่พบการแทรกตัวของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 โดยนำเฉพาะ Gene Symbols มาเก็บไว้ในรูปแบบไฟล์นามสกุล .txt โดยแยกไฟล์การแทรกตัวในแต่ละรูปแบบ

3.1.2.1 กรอกข้อมูลลงใน template file เพื่อกำหนดค่าการวิเคราะห์ต่างๆ โดยเลือกตัวสถิติวิเคราะห์เป็น t-test เลือก parameter เป็น 2-tail distribution, 2 series with unequal standard deviation ที่ความสำคัญ p-value เท่ากับ 0.05 และเลือกให้วิเคราะห์แบบ up หรือ down regulation หลังจากนั้นกำหนดกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มทดลอง (experiment groups) ของแต่ละการศึกษา โดยนำ code name ของแต่ละสิ่งตัวอย่างจากไฟล์ Series Matrix มากรอกใส่ และสุดท้ายทำการ save ไฟล์เป็นนามสกุล .xls

3.1.2.2 สร้างโฟลเดอร์และนำไฟล์ที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์มารวมไว้ด้วยกัน และย้ายไปไว้ที่ drive: C โดยตั้งชื่อว่า CU-DREAM

3.1.2.3 เปิดโปรแกรม CU-DREAMx ผ่าน Command Prompt และพิมพ์คำสั่งของโปรแกรมลงไปเพื่อเริ่มดำเนินการวิเคราะห์ดังนี้

3.1.2.3.1 `cd c:\CU-DREAM` กด Enter

3.1.2.3.2 `cu-dreamx GSE(ที่ต้องการวิเคราะห์).xls LINE-1_บริเวณที่มีการแทรกตัวของ LINE-1 ที่ต้องการวิเคราะห์.txt` กด enter เช่น `cu-dreamx GSE15402.xls LINE-1_intronic.txt` เป็นต้น จากนั้นรอนโปรแกรมวิเคราะห์เสร็จ

3.1.2.3.3 ผลการวิเคราะห์จะปรากฏอยู่ในโฟลเดอร์ CU-DREAM ที่เดียวกับไฟล์ทั้งหมด ซึ่งผลการวิเคราะห์นั้นจะแสดงรายชื่อยีนทั้งหมด โดยแยกเป็นกลุ่มยีนที่มีการแทรกตัวของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในบริเวณที่ทำการวิเคราะห์ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ กับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติ แต่ไม่พบว่ามีการแทรกตัวของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในบริเวณดังกล่าว ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ของทั้ง 5 การศึกษาจะเป็นดัง **ตารางที่ 2**

จากนั้นกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัม จากผลการวิเคราะห์ของแต่ละการศึกษาจะถูก

นำมาหาอินเตอร์เซกชันที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติร่วมกันใน 3 การศึกษาขึ้นไป โดยใช้ Venn diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) ซึ่งผลที่ได้แสดงใน **ภาพที่ 16** และ **ตารางภาคผนวกที่ 1ก** จากนั้นรายชื่อยีนดังกล่าวจะถูกนำไปวิเคราะห์หาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ และเครือข่ายควบคุมยีนต่อไปด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ภายใต้ความร่วมมือกับมหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดีซี เพื่อหาว่ายีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ LINE-1 นั้นมี biological functions และ pathways รวมถึง gene regulatory networks ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือไม่ อย่างไร

นอกจากนี้ โปรแกรม CU-DREAMx ยังถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างรายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่กับกลุ่มยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติใน 56 LCLs ของผู้ที่เป็โรคออทิซึมสเปกตรัมในรายที่ไม่ทราบสาเหตุทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่เคยได้รับการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนมาแล้วในการศึกษาหมายเลข GSE15402 และได้รับการจัดแบ่งกลุ่มของ LCLs ออกเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะอาการทางคลินิก ได้แก่กลุ่ม L กลุ่ม M และกลุ่ม S รวมถึงได้รับการวิเคราะห์ทาง transcriptomics มาแล้ว โดย Valarie Hu และคณะ (Hu et al., 2009)

### 3.2 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ที่เป็โรคออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม MultiExperiment Viewer (MeV)

โปรแกรม MultipleExperiment Viewer (MeV) (Saeed et al., 2006) เป็นเครื่องมือที่ใช้ดูการประมวลผลของการวิเคราะห์ทาง microarray อีกทั้งยังสามารถใช้ศึกษารายชื่อยีนและรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติได้อีกด้วย โดยโปรแกรมสามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Significance Analysis of Microarrays (SAM) โดยกำหนดค่า expression cut-off ที่ร้อยละ 70 และที่น้อยกว่าร้อยละ 5 FDR (False Discovery Rate) ในการศึกษานี้ โปรแกรม MeV จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์รายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมจาก GEO DataSets แล้วจากนั้นกลุ่มยีนที่พบว่ามีแสดงออกที่ผิดปกติจากการวิเคราะห์ด้วย SAM จะถูกนำไป overlap กลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่ได้จากโปรแกรม CU-DREAMx ซึ่งจะให้ได้กลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น (high confidence) เนื่องจากโปรแกรม CU-DREAMx เป็นการตรวจวิเคราะห์ทางสถิติแบบ t-test แต่ MeV สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยสถิติแบบ SAM ซึ่งเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้เทคนิคทาง microarray มากกว่า

โดยการศึกษาจะใช้ Gene Expression Profiling ของ 56 LCLs ซึ่งเป็นการศึกษาด้วยเทคนิค microarray analysis ของ Dr. Valarie Hu และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 (Hu et al., 2009) ในการวิเคราะห์ และเนื่องจากทำการพิจารณาร่วมกับผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของ LINE-1 ซึ่งจะกล่าวต่อไป คณะผู้วิจัยจึงได้เลือก Gene Expression Profiling ของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา (language impairment) มาทำการวิเคราะห์ด้วย SAM โดยโปรแกรม MeV เนื่องจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มนี้ ในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการดังที่ได้กล่าวต่อไป พบว่ามีระดับเมธิเลชันของ LINE-1 และการแสดงออกของ LINE-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติอย่างมีนัยสำคัญ ดัง **ตารางที่ 7 และ 8** คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาต่อในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L นี้

โดยขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย MeV software มีดังต่อไปนี้

- 3.2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวกลุ่มย่อยของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้ แบ่งเป็น 2 ชุด ได้แก่
  - 3.2.1.1. Gene Expression Profiling ของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม L (n=6) เทียบกับกลุ่ม control (n=20)
  - 3.2.1.2. Gene Expression Profiling ของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวกลุ่ม L (n=6) เทียบกับกลุ่ม age-matched control (n=6)
- 3.2.2 นำไฟล์ข้อมูลโฟลด์ลงโปรแกรม MeV (microarray software suit; www.tm4.org)
- 3.2.3 ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค microarray ผลการวิเคราะห์ในบางเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจะไม่พบข้อมูลการแสดงออกของยีนบางยีน ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วย MeV software นี้ จึงจะทำการกำหนดค่า expression cut-off ที่ร้อยละ 70 ซึ่งหมายความว่า ยีนที่จะนำมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติจะต้องเป็นยีนที่มีการแสดงออกร้อยละ 70 ของ 56 เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวขึ้นไปเท่านั้น
- 3.2.4 เลือกเทคนิคการคำนวณโปรแกรมเป็นแบบ Significance Analysis of Microarrays (SAM) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ p-value เท่ากับ 0.05
- 3.2.5 เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติเสร็จสิ้นแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการเลือกข้อมูลวิเคราะห์ที่ได้โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นของข้อมูลที่ร้อยละ 95 (95% confidence interval) หรือ 5% FDR

(False Discovery Rate) ซึ่งหมายความว่า ในรายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 นั้น จะมียีนไม่เกินร้อยละ 5 ที่ไม่ได้มีการแสดงออกที่ผิดปกติ ในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมจริง

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MeV นี้ จะได้รายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติ ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ ภาษาที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง จากนั้นนำไปเปรียบเทียบแบบ intersection กับรายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่ได้จากโปรแกรม CU-DREAMx ทำให้ได้รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่น่าเชื่อถือมากขึ้น หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกยีน 2 ยีน ได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 (ตารางที่ 3) เพื่อนำไปวิเคราะห์ ระดับการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qRT-PCR และ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 กับระดับ การแสดงออกของยีน (Correlation analysis) ซึ่งจะกล่าวในขั้นตอนต่อ ๆ ไป

### 3.3 การวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและเครือข่ายการควบคุมยีนของยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity System, Redwood, USA) เป็นโปรแกรม ที่ใช้วิเคราะห์และตีความข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้าน omics ต่างๆ โดยสามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่สนใจเพื่อหา regulators, relationships, biological functions และ pathways หรือ networks เพื่ออธิบายถึงรูปแบบการแสดงออกของข้อมูล โดยอาศัยองค์ความรู้ข้อมูลจากฐานข้อมูล biological systems ที่มีอยู่ ซึ่ง IPA software จะช่วยให้ในการทำนายหาเป้าหมายการทำงานของยีน โปรตีน สารเคมี รวมถึงยาต่าง ๆ นอกจากนี้ ยังช่วยทำนายผลกระทบทางชีวภาพและกระบวนการเกิดโรค และทำให้เราสามารถทำความเข้าใจและเชื่อมโยงข้อมูลจำนวนมากได้ โดย IPA software จะคำนวณ คำนัยสำคัญของความสัมพันธ์ด้วยสถิติแบบ Fisher's Exact Test

ในงานวิจัยนี้จะใช้ IPA software จะถูกนำมาใช้ในการทำนายหน้าที่ทางชีวภาพ (biological functions) และเครือข่ายการควบคุมยีน (gene regulatory networks) ของกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ออทิซึมสเปกตรัม ที่พบว่ามีความผิดปกติร่วมกัน ใน 3 การศึกษาขึ้นไป รวมทั้งสิ้น 501 ยีน

โดยวิธีดำเนินการวิเคราะห์ด้วย IPA software มีดังต่อไปนี้

- 3.3.1 อัฟโหลดไฟล์รายชื่อยีน 501 ยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ลงในระบบของ IPA software ซึ่งไฟล์รายชื่อยีนนั้นต้องเป็นไฟล์จาก Microsoft excel ที่มีนามสกุล .xls
- 3.3.2 กำหนดค่า parameters ต่าง ๆ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้
  - 3.3.2.1. ใช้องค์ความรู้จากทุกฐานข้อมูลที่มีอยู่ในการวิเคราะห์
  - 3.3.2.2. วิเคราะห์อ้างอิงในมนุษย์เท่านั้น (human)
  - 3.3.2.3. ใช้ค่าความเชื่อมั่นที่ระดับสูงสุด (high confidence)
  - 3.3.2.4. ค่า parameters อื่น ๆ กำหนดให้เป็นไปตามค่าตั้งต้นของโปรแกรม
- 3.3.3 หลังจากกำหนด parameters เรียบร้อยแล้ว จะดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งผลการวิเคราะห์จะแสดงในโพลเดอร์ Analyses
- 3.3.4 ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแสดงข้อมูลที่สำคัญของกลุ่มยีนที่เรานำมาวิเคราะห์ เช่น pathways diseases and functions และ networks ที่ยีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องและมีความสัมพันธ์ นอกจากนี้ ยังแสดงผลของเป้าหมายและการทำงานของยีนที่สนใจต่อโมเลกุลต่าง ๆ ด้วย

### 3.4 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว (lymphoblastoid cell lines, LCLs) ซึ่งพัฒนามาจาก mononuclear cells ของผู้ที่เป็นโรคที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติ ซึ่งเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. Valerie Hu แห่งมหาวิทยาลัยจอร์จ กรุงวอชิงตัน กรุงวอชิงตัน ดีซี และได้ผ่านการคัดกรองเอาเฉพาะผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมแบบโปรแบนด์ (autistic probands) จำนวน 1,954 ราย ซึ่งจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (subgroups) เพื่อช่วยลดความหลากหลายทางชีวพยาธิสภาพ (biopathological heterogeneity) ได้แก่ กลุ่มที่มีความผิดปกติทางด้านการใช้ภาษาอย่างรุนแรง (severe language impairment; L) กลุ่มที่มีความรุนแรงน้อย (mild autism; M) กลุ่มที่มีความสามารถพิเศษหรือเรียกว่าอัจฉริยะออทิสติก (autistic savant; S) และกลุ่มที่มีความกำกวมระหว่างกลุ่มอื่นๆหรือมีความผิดปกติที่ไม่ชัดเจน (intermediate autism; I) โดยใช้ข้อมูลจากพฤติกรรมผู้ที่เป็นโรค 123 ประการในชุดแบบทดสอบถามเพื่อวินิจฉัยโรคออทิซึมที่เรียกว่า The Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) ซึ่งเป็นแบบสอบถามที่แพทย์



ผู้เชี่ยวชาญใช้ในการวินิจฉัยภาวะออทิซึมสเปกตรัมและความรุนแรงของโรค ที่ใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกาและในประเทศที่พัฒนาแล้วอื่น ๆ ทั่วโลก ซึ่งมุ่งเน้นไปที่การประเมินทางพฤติกรรม ได้แก่ ด้านการสื่อสาร ด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคม และด้านความสนใจที่จำกัดและพฤติกรรมซ้ำ ๆ โดยการให้คะแนนขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ที่ดูแล จากนั้นจึงทำการคัดแยกผู้ที่เป็นโรคที่มีภาวะ cognitive impairment (Raven's scores น้อยกว่า 70 ซึ่งเป็นคะแนนที่ได้จากการทดสอบ Raven's Progressive Matrices test แบบทดสอบทางเหตุและผลในรูปแบบอวัจนภาษา ซึ่งใช้ทดสอบได้กับเด็กอายุตั้งแต่ 5 ปีจนถึงผู้ใหญ่) ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมชัดเจน ได้แก่ Fragile X syndrome, Rett's syndrome, tuberous sclerosis, chromosome 15q11-q13 duplication เป็นต้น ผู้ป่วยที่คลอดก่อนกำหนด (อายุน้อยกว่า 35 สัปดาห์) และผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยโรคจิตประสาทที่เป็นโรคที่เกิดร่วมกับภาวะออทิซึม (comorbid disorders) เช่น bipolar disorder, obsessive compulsive disorder และ severe anxiety ออกไป โดยคงเหลือไว้เฉพาะผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมแบบไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic autism) ซึ่งเป็นผู้ป่วยส่วนใหญ่ โดย Dr. Valarie Hu และคณะได้นำกลุ่มของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมที่ผ่านการคัดเลือกนี้มาทำการตรวจวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) โดยตัดกลุ่ม intermediate autism ออกไปเนื่องจากมีความชัดเจนไม่เพียงพอในการจำแนกกลุ่ม ทำให้เหลือกลุ่มผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมเพียง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม S M และ L และกลุ่มคนปกติที่ได้รับการตรวจวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์แล้ว (Hu et al., 2009) ซึ่งสำหรับกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้ ในส่วนของกลุ่มผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกจาก 3 กลุ่มย่อยข้างต้น ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่มีความสามารถพิเศษหรือเรียกว่าอัจฉริยะออทิสติก (autistic savant; S) จำนวน 20 ราย กลุ่มที่มีความรุนแรงน้อย (mild autism, M) จำนวน 10 ราย และกลุ่มที่มีความผิดปกติทางการใช้ภาษาอย่างรุนแรง (severe language impairment, L) จำนวน 6 ราย และ นอกจากนี้จะใช้กลุ่มคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม (control group) อีกจำนวน 20 ราย รวมทั้งสิ้น 56 ราย และจะเลือกใช้เฉพาะเพศชายเนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่าโรคออทิซึมเป็นโรคที่เกิดในเพศชายมากกว่าเพศหญิงและเพื่อลดความซับซ้อนอันเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างเพศ (ตารางภาคผนวก 4ก)

### 3.5 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.5.1. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

รายชื่อเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	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

## 3.5.2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

รายชื่ออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัท
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

### 3.5.3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.5.3.1. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว

รายชื่อสารเคมี	บริษัท
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	VWR, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	HyClone Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Fatal bovine serum	Sigma Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Penicillin/ Streptomycin/ Fungizone	Wisent Bio Products, ประเทศแคนาดา
RNAlater solution	Ambion, ประเทศสหรัฐอเมริกา
RPMI1640 medium	HyClone Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Tryphan blue	Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา

#### 3.5.3.2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรมจากเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว

รายชื่อสารเคมี	บริษัท
0.1 M sodium citrate ใน 10% ethanol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
100% ethanol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
75% ethanol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
8 mM NaOH	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
Isopropyl alcohol	Merck Millipore, ประเทศเยอรมนี
RNase-free water หรือ 0.5% SDS	Thermo scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Chloroform	VWR, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Genezol reagent	Geneaid, ประเทศไต้หวัน

3.5.3.3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ด้วยเทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

รายชื่อสารเคมี	บริษัท
25 bp DNA ladder	Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
40% acrylamide and bis-acrylamide solution, 19:1	Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Ammonium Persulfate (APS)	Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Boric acid	Bio basic, ประเทศแคนาดา
DEPC-treated water	Bio basic, ประเทศแคนาดา
RNase and DNAase away	Bio basic, ประเทศแคนาดา
dNTP Mix, PCR Grade, 10mM	QIAGEN, ประเทศสหรัฐอเมริกา
EDTA	Sigma Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา
10 mg/ml Ethidium Bromide	VWR, ประเทศสหรัฐอเมริกา
EZ DNA Methylation-Gold™ KIT	Zymo research, ประเทศ สหรัฐอเมริกา
HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN, ประเทศสหรัฐอเมริกา
Taq I restriction enzyme (10U/μL)	Thermo scientific, ประเทศ สหรัฐอเมริกา
Tas I restriction enzyme (10U/μL)	Thermo scientific, ประเทศ สหรัฐอเมริกา
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio basic, ประเทศแคนาดา
Tris	Bio basic, ประเทศแคนาดา
UltraPure Distilled water	Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5.3.4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ LINE-1, C1orf27 และ ARMC8 ด้วยเทคนิค qRT-PCR

รายชื่อสารเคมี	บริษัท
AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix	Bioneer, ประเทศเกาหลี
AccuPower® RT PreMix tube	Bioneer, ประเทศเกาหลี
DEPC-treated water	Bio basic, ประเทศแคนาดา
RNase and DNAase away	Bio basic, ประเทศแคนาดา
RQ1 RNase-free DNase	Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา
UltraPure Distilled water	Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 3.6 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว

การเพาะเลี้ยง lymphoblastoid cell lines (LCLs) จะทำการเพาะเลี้ยงตามระเบียบวิธีการซึ่งแนะนำโดย Rutgers University Cell and DNA Repository ผู้ผลิตและดูแลรักษาเซลล์ใน Autism Genetic Research Exchange (AGRE) collection กล่าวโดยย่อ เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงใน Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่ผสม fetal bovine serum ร้อยละ 15 และ penicillin/streptomycin ร้อยละ 1 โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ซึ่งเซลล์จะถูกแบ่งทุกๆ 3-4 วัน และจะถูกเก็บในวันที่ 3 ในขณะที่อยู่ใน logarithmic growth phase ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเฉลี่ย 3 สัปดาห์หลังจากที่มีการแบ่ง จากนั้นเซลล์จะถูกเก็บรักษาใน RNAlater (Life Technologies) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยคงสภาพสารพันธุกรรมจนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การเพาะเลี้ยง LCLs จะต้องทำใน biosafety cabinet class II เสมอ โดยอุปกรณ์ที่ใช้ทุกอย่างจะต้องอยู่ในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ โดยต้องทำความสะอาดด้วย 70% alcohol ก่อนนำไปใช้เสมอ และอุปกรณ์ทุกชนิดที่ใช้จะต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวีเป็นเวลา 15-20 นาทีก่อนทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและการเก็บเซลล์โดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

#### 3.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

Media ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย RPMI1640 medium, Fetal bovine serum, Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B solution โดยจะใช้อัตราส่วนดังต่อไปนี้

- 3.6.1.1. RPMI1640 medium ปริมาตร 250 mL
- 3.6.1.1. Fetal bovine serum ปริมาตร 45 mL
- 3.6.1.1. Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B solution ปริมาตร 3 mL

#### 3.6.2. ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

- 3.6.2.1. ในกรณีที่เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ตามอัตราส่วนข้างต้น ให้นำขวดแก้ว duran ที่ผ่านการ autoclave เรียบร้อยแล้ว มาต่อเข้ากับตัว filter cup ซึ่งตัว filter cup นี้ จะ

ประกอบด้วยกระดาษกรองและฝาปิด ดังนั้นจึงควรระวังและไม่สัมผัสกับบริเวณที่เป็นกระดาษกรอง

- 3.6.2.2. เปิดฝา filter cup แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640, Fetal bovine serum และ Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B solution ตามอัตราส่วนข้างต้นลงไป
- 3.6.2.3. สังเกตว่าสารที่เติมไปจะค่อย ๆ ไหลผ่านกระดาษกรอง จากนั้นใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า vacuum ดูดสารทั้งหมดให้ลงไปในช่วงแก้ว duran หลังจากนั้นถอด filter cup ออก (การใช้ vacuum ดูดสารลงมา อาจจะได้ว่าเป็นการ mix สารทางอ้อมด้วย)
- 3.6.2.4. ทำการ label ที่ภาชนะใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ทุกครั้งว่า เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์อะไร วันที่เตรียม ชื่อผู้เตรียมและระบุวันหมดอายุด้วย โดยอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ LCLs จะมีอายุ 30 วันนับหลังจากวันที่เตรียม

### 3.6.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์

- 3.6.3.1. ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 9 mL ลงใน culture flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (T-25) แล้วนำไปอุ่นในตัวเลี้ยงเซลล์ก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในแต่ละครั้ง
- 3.6.3.2. นำ LCLs ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว มาละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.6.3.3. นำเซลล์ใส่ลงใน culture flask ที่เตรียมไว้ในข้อ 2. โดยการปิเปตต์เซลล์เบา ๆ ลงไปที่ก้น flask ซึ่งจะสังเกตเห็นเป็นชั้นของเซลล์บาง ๆ อยู่ที่บริเวณก้น culture flask หลังจากนั้นทำการเขย่า culture flask เบา ๆ เพื่อให้เซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมเข้ากัน
- 3.6.3.4. นำ culture flask จากข้อ 3. ไปเก็บไว้ในตัวเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5
- 3.6.3.5. เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ต้องทำการเปลี่ยน culture flask ให้เป็นขนาด 75 ตารางเซนติเมตร โดยการปิเปตต์เซลล์ขึ้นและลงหลาย ๆ ครั้งใน culture flask



ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน จากนั้นปิเปตต์เซลล์ ปริมาตร 8 mL ออกจาก culture flask ดังกล่าว แล้วนำไปใส่ยัง culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ลงไปปริมาตร 12 mL เพื่อให้ครบปริมาตร 20 mL

- 3.6.3.6. สำหรับ culture flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตรที่มีปริมาณเซลล์เหลืออยู่ 2 mL นั้น จะทำการใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปเพิ่มไปอีก 8 mL เพื่อให้ครบปริมาตร 10 mL (สำหรับ flask นี้จะนำมาใช้เลี้ยงสำหรับ maintenance เซลล์)
- 3.6.3.7. เมื่อทำการเปลี่ยนย้าย flask เรียบร้อยแล้ว จะนำ culture flask ไปเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยต้องคอยตรวจสอบและสังเกตเซลล์และลักษณะของอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน หากอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองจะต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ สำหรับการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จะต้องตั้ง culture flask ดังกล่าวไว้ในตู้ incubator ก่อน เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนอยู่ที่ก้น culture flask จากนั้นปิเปตต์อาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาทิ้งให้มากที่สุด และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป ให้มากกว่าปริมาตรที่ปิเปตต์ออกมาประมาณ 1 mL
- 3.6.3.8. เมื่อดำเนินการเลี้ยงเซลล์ไปได้ประมาณ 3 สัปดาห์ หรือเมื่อเซลล์มีปริมาณมากพอที่ต้องการ จะต้องทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป สำหรับขั้นตอนการเก็บเซลล์จะแสดงขั้นตอนต่อไป

#### 3.6.4 การเก็บเซลล์

ในการเก็บเซลล์นั้น จะต้องใช้อาหารสำหรับเก็บเซลล์ (freezing medium) ซึ่งมีส่วนประกอบในอัตราส่วนดังต่อไปนี้ fetal bovine serum ปริมาตร 90 mL และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 mL

### 3.6.4.1. ขั้นตอนการตรวจสอบและนับเซลล์ก่อนการเก็บเซลล์มีดังต่อไปนี้

- 3.6.4.1.1. ปิเปตต์เซลล์ใน culture flask ทั้งขนาด 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร แบบขึ้นและลง เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน จากนั้นปิเปตต์ใส่ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mL แล้วทำการปิเปตต์ขึ้นและลงอีกครั้ง เนื่องจากเซลล์จะมีการตกตะกอนเร็วมาก
- 3.6.4.1.2. ปิเปตต์เซลล์ในข้อ 1. ปริมาตร 1 mL ใส่ลงใน microcentrifuge tube
- 3.6.4.1.3. นำเซลล์ในข้อ 2. มาย้อมด้วยสี trypan blue ด้วยอัตราส่วน เซลล์ต่อสี trypan blue เท่ากับ 9 ต่อ 1 จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer โดยจะนับในช่องที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแดง (25 ช่องเล็ก) ถ้าหากเซลล์มีปริมาณตั้งแต่ 20 ล้านเซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตรขึ้นไป จึงจะดำเนินการเก็บเซลล์ได้

#### หมายเหตุ

- ปริมาณเซลล์ทั้งหมด = ปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้  $\times$  dilution factor  $\times$  10<sup>4</sup> เซลล์/mL
- ลักษณะเซลล์เมื่อย้อมด้วยสี trypan blue จะพบว่าเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินคือเซลล์ตาย เซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินคือเซลล์เป็น

### 3.6.4.2. ขั้นตอนการเก็บเซลล์ LCLs โดยละเอียดมีดังต่อไปนี้

- 3.6.4.2.1. การเก็บเซลล์ ดำเนินการโดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนแรกสำหรับเก็บใน freezing medium ปริมาตร 10 mL โดยแบ่งใส่ในหลอด centrifuge tube ขนาด 15 mL เพื่อนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว จนกว่าจะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์อื่น ๆ ต่อไป ส่วนที่สองสำหรับเก็บใน RNAlater (Life Technologies) ปริมาตร 20 mL เพื่อรักษาสารพันธุกรรมที่อยู่ในเซลล์ในระหว่างรอการสกัดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์
- 3.6.4.2.2. นำเซลล์ในข้อ 3.3.4.2.1. ไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส โดยความเร็ว 600 RCF เป็นเวลา 10 นาที

- 3.6.4.2.3. เมื่อปั่นเสร็จจะเห็นเซลล์ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นใช้ Pasteur pipette ที่ต่อกับ vacuum ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ให้คงเหลือไว้แต่เซลล์ที่ตกตะกอน
- 3.6.4.2.4. ส่วนแรกสำหรับเก็บใน freezing medium จะเติม freezing medium ลงไปปริมาตร 2.2 mL จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นและลง ให้ตะกอนของเซลล์กับ freezing medium ผสมเข้ากัน ต้องระวังอย่าให้เป็นฟอง จากนั้นทำการแบ่งใส่ cryotube โดยใส่ ปริมาตร 1 mL ต่อ tube แล้วนำไปเก็บรักษาใน freezing container ที่ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อครบเวลาจะย้ายเซลล์ไปเก็บในไนโตรเจนเหลวต่อไป
- 3.6.4.2.5. ส่วนที่สองสำหรับเก็บใน RNAlater จะเติม RNAlater ลงไปปริมาตร 1.6 mL แล้วใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นและลง เพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยระวังอย่าให้เกิดฟองเช่นกัน จากนั้นปิเปตต์เซลล์ลงในหลอด nuclease-free tube แล้วเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัดสารพันธุกรรม

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนข้างต้นยกเว้นการนับเซลล์จะต้องทำใน biological safety cabinet class II และขั้นตอนการเก็บเซลล์ทุกขั้นตอนจะต้องรักษาอุณหภูมิของเซลล์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ

### 3.7. การสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวด้วย TRIzol reagent โดยจะใช้เซลล์ไลน์ที่ถูกเก็บรักษาไว้ใน RNAlater ที่ -80 องศาเซลเซียส โดยก่อนที่จะนำมาสกัดด้วย TRIzol reagent จะต้องทำให้เซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวละลายที่อุณหภูมิห้องก่อน จากนั้นจึงดำเนินการเตรียมตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำ TRIzol reagent เติมลงไป Sample แต่ละหลอดในปริมาตร 1 mL และตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
2. เติม chloroform ลงไปปริมาตร 0.2 mL แล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลานาน 15 วินาที
3. ทำการ incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2-3 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. เมื่อปั่นเสร็จจะเห็นสารแยกออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นล่างสุดจะเห็นเป็นสีชมพู ซึ่งเป็นชั้นของโปรตีน ชั้นกลางที่เห็นเป็นชั้นสีขาวบาง ๆ จะเป็นชั้นของดีเอ็นเอ และชั้นบนสุดจะเป็นของเหลวสีใส โดยชั้นนี้จะเป็นชั้นของอาร์เอ็นเอ จากนั้นต้องทำการแยกเพื่อนำชั้นของดีเอ็นเอออกมา โดยค่อย ๆ คูดเอาชั้นอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นของเหลวสีใสด้านบนสุดแยกออกไปไว้อีกหลอด ซึ่งหลอดนี้จะนำไปสู่ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอต่อไป
5. จากนั้นจึงทำการคูดชั้นดีเอ็นเอแยกออกมา ซึ่งหลอดนี้จะนำไปสู่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอต่อไป ต้องระวังว่าไม่มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ เนื่องจากจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ส่วนชั้นล่างสุดเป็นชั้นของโปรตีน ทำการเก็บรักษาต่อไป

### 3.7.1. การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อแยกชั้นดีเอ็นเอออกมาได้แล้ว จะดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

- 3.7.1.1 ทำการเติม 100% ethanol ปริมาตร 0.3 mL ลงไปในหลอดดีเอ็นเอ จากนั้นปิดฝาหลอดแล้วเขย่าโดยการ invert หลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ดีเอ็นเอ ละลายเข้ากับ ethanol ที่เติมลงไป
- 3.7.1.2 นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกให้ได้ DNA pellet ออกมา ปั่นเสร็จทำการคูดน้ำใสด้านบน (supernatant) ทิ้งไปและจะเข้าสู่ขั้นตอนการล้าง DNA ต่อไป
- 3.7.1.3 ในขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอ จะล้าง DNA pellet ด้วย 0.1 sodium citrate ใน 10% ethanol ปริมาตร 1 mL
- 3.7.1.4 จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการผสมด้วยการ invert เบา ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดูส่วนที่เป็น supernatant ออก
- 3.7.1.5 จากนั้นทำซ้ำใหม่ในขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอตั้งแต่แรก 2 ถึง 3 ครั้ง
- 3.7.1.6 เมื่อเสร็จเรียบร้อย เติม 75% ethanol ปริมาตร 1.5-2 mL ลงไปในหลอด
- 3.7.1.7 ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 นาที ผสมด้วยการ invert เบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่ 2,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

- 3.7.1.8 คูด supernatant ที่ทิ้งไป จะเหลือแต่ส่วนที่เป็น DNA pellet ซึ่ง DNA pellet ที่ได้จะต้องถูกทำ air dry จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน Resuspension DNA
- 3.7.1.9 ในขั้นตอน Resuspension DNA จะดำเนินการตามขั้นตอนดังต่อไปนี้
- 3.7.1.10 เติม NaOH 8 mM ปริมาตร 0.3-0.6 mL ลงในหลอด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.7.1.11 คูด supernatant ซึ่งประกอบด้วย DNA ใส่ในหลอดใหม่ และพร้อมที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อไปได้หรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.7.2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอ เมื่อแยกชั้นของอาร์เอ็นเอออกมาใส่หลอดแล้ว จะดำเนินการตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

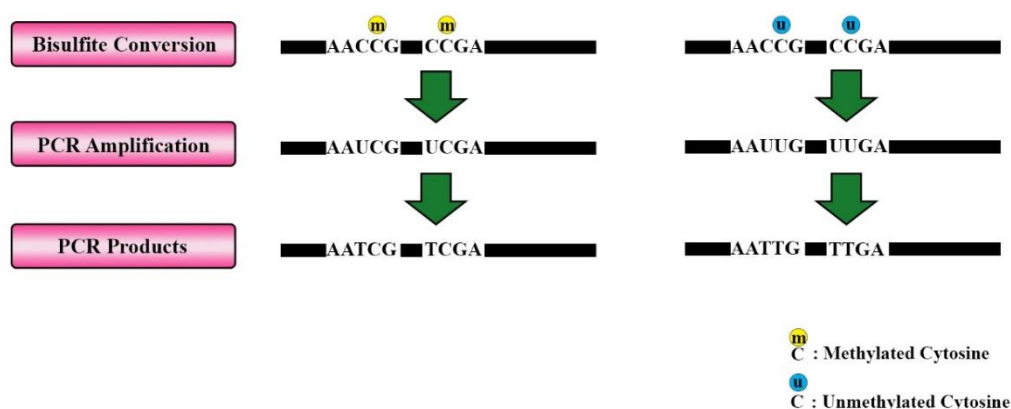
- 3.7.2.1. เติม 100% isopropanol ปริมาตร 0.5 mL แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 3.7.2.2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนการล้างอาร์เอ็นเอต่อไป
- 3.7.2.3. ในการล้างอาร์เอ็นเอ หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว จะคูด supernatant ที่ทิ้งไป เหลือแต่ส่วนที่เป็น RNA pellet โดยเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 mL ลงในหลอดที่เก็บ RNA pellet
- 3.7.2.4. นำไป vortex หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 7,500g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
- 3.7.2.5. ทำการคูด 75% ethanol ที่ทิ้งไป และทำให้ RNA pellet แห้งโดยใช้ air dry โดยจะใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอน resuspension RNA
- 3.7.2.6. ในขั้นตอน resuspension RNA โดยจะทำการ resuspension RNA pellet ใน Rnase-free water หรือในสารละลาย 0.5% SDS ใช้การปิเปตขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง

- 3.7.2.7. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้ว อาจเก็บรักษาอาร์เอ็นเอไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

### 3.8.การทำปฏิกิริยา Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

#### 3.8.1. การทำปฏิกิริยา Sodium Bisulfite Conversion กับดีเอ็นเอตัวอย่าง

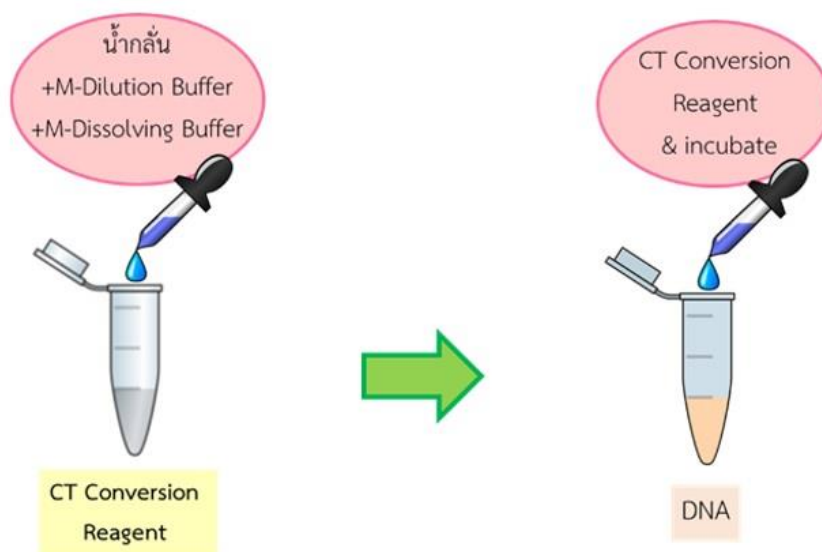
การทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ (Sodium bisulfite conversion) เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการใช้ตรวจสอบการเกิดเมธิเลชันของเบสไซโตซีนในบริเวณ CpG islands วิธีนี้จะเป็นการให้สารโซเดียมไบซัลไฟต์ (Sodium bisulfite) ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ เพื่อที่จะตรวจสอบรูปแบบการเมธิเลชัน ของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอปกติที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์แล้ว จะเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (C) เป็นเบสยูราซิล (U) แต่ในเบสไซโตซีนที่มีเมธิเลชัน (methylated cytosine หรือ C<sup>m</sup>) หลังการทำปฏิกิริยากับสารโซเดียมไบซัลไฟต์แล้ว จะยังคงเป็นเบสไซโตซีนเช่นเดิม ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ความแตกต่างเมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟท์ระหว่างลำดับเบสที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลกับลำดับเบสที่มีการเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่งของเบสไซโตซีน

โดยลำดับเบสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟท์ (bisulfite treatment) เบส C ที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิล (unmethylation DNA) จะเปลี่ยนแปลงเป็นเบสยูราซิล หรือเบส U ส่วนเบส C ที่มีการเติมหมู่เมธิล (methylated DNA) จะไม่เปลี่ยนแปลง ยังคงเป็นเบส C ดั้งเดิม ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ถูกทำปฏิกิริยากับไบซัลไฟต์แล้วได้ โดยสามารถใช้ในการแยกแยะระหว่าง unmethylation DNA และ methylated DNA ได้

ในการทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ ดีเอ็นเอที่สกัดออกมาปริมาณ 1  $\mu\text{g}$  จะถูกนำมาทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ โดยใช้ EZ DNA Methylation-Gold™ Kit ของ ZYMO RESEARCH, The Epigenetics Company กล่าวคือ จะต้องทำการเตรียม CT Conversion Reagent ก่อน โดยการเติมน้ำกลั่น 900  $\mu\text{L}$ , M-Dilution Buffer 300  $\mu\text{L}$  และ M-Dissolving Buffer 50  $\mu\text{L}$  ลงในขวดของ CT Conversion Reagent จากนั้นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาทีด้วย vortex mixer ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 วิธีการโดยย่อของขั้นตอนการเตรียม CT Conversion Reagent

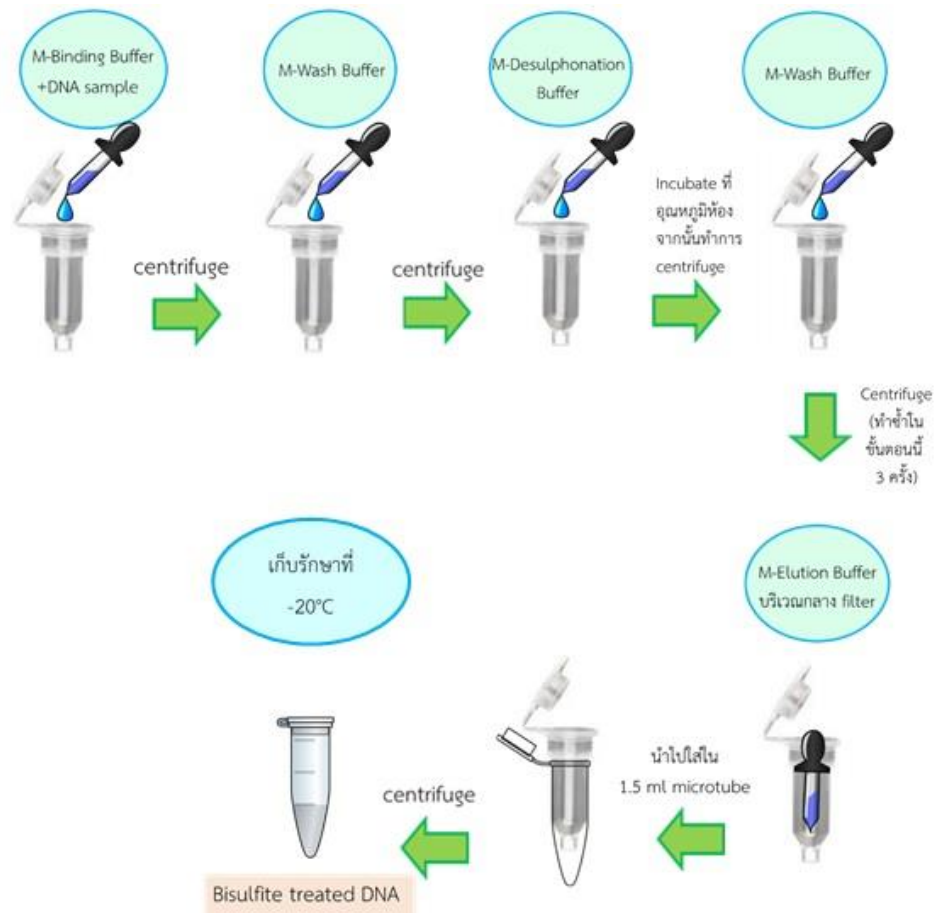
โดยใช้ EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (D5005&D5006) ของ ZYMO RESEARCH, The Epigenetics Company

จากนั้นจะดำเนินการตามขั้นตอนดังต่อไปนี้ ซึ่งแสดงใน ภาพที่ 13

- 3.8.1.1. เติม CT Conversion Reagent ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาณ 130  $\mu\text{L}$  ลงใน DNA Sample 20  $\mu\text{L}$  แล้วผสมให้เข้ากัน
- 3.8.1.2. นำไป incubate เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Bisulfite Conversion ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากขั้นนี้หากยังไม่ดำเนินการต่อจะสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 20 ชั่วโมง ก่อนจะมาดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

- 3.8.1.3. ในขั้นต่อไปเติม M-Binding Buffer 600  $\mu$ L ลงใน Zymo-Spin™ IC Column จากนั้นเติม sample แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ invert หลายๆครั้ง แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifugation ที่ความเร็ว RCF 12,000g เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.8.1.4. เติม M-Wash Buffer 100  $\mu$ L ลงไปใน column จากนั้นนำไปปั่นด้วย RCF 12,000g เป็นเวลา 30 วินาที
- 3.8.1.5. เติม M-Desulphonation Buffer 200  $\mu$ L แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที แล้วหลังจากนั้นนำไปปั่นด้วย RCF 12,000g อีก 30 วินาที
- 3.8.1.6. เติม M-Wash Buffer 200  $\mu$ L ลงใน column และปั่นด้วย RCF 12,000g อีก 30 วินาที (ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ 2 รอบ)
- 3.8.1.7. เติม M-Elution Buffer 10  $\mu$ L ลงตรงบริเวณ filter ของ column โดยตรง จากนั้นนำ column ไปใส่ไว้ใน 1.5 mL microtube แล้วปั่นด้วย RCF 12,000g 1 นาที เพื่อชะ DNA จาก column ให้ลงมาใน microtube
- 3.8.1.8. เมื่อเสร็จสิ้นทุกขั้นตอนแล้ว ให้เก็บรักษา ดีเอ็นเอ ที่ผ่านกระบวนการทำ Bisulfite Conversion แล้ว ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาดำเนินการขั้นต่อไป





ภาพที่ 13 แผนผังโดยย่อของขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับสารไบซัลไฟต์ โดยใช้ EZ DNA Methylation-Gold™ Kit ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ ZYMO RESEARCH, The Epigenetics Company

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 3.8.2. การทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

ในขั้นนี้จะใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มจำนวนลำดับเบสของดีเอ็นเอในบริเวณที่เราสนใจ ซึ่งในที่นี้คือ รีโทรทรานสโพซอน LINE-1 โดยดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์แล้ว จะถูกนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ forward และ reverse primer ที่มีความจำเพาะกับต่อลำดับเบสในตำแหน่ง regulatory region ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 (Genbank: M80343) ได้แก่ LINE-1 promoter ซึ่งไพรเมอร์ ได้แก่

**Forward primer** 5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTTT-3'

**Reverse primer** 5'-RTAAAACCTCCRAACCAATATAAA-3'

โดยที่ R แทนเบสพิวรีน (purine) ซึ่งได้แก่ เบสอะดีนีน (adenine; A) หรือ เบสกวานีน (guanine; G) และใช้ nuclease free water เป็น negative control ซึ่งจะทำการปฏิกิริยาเป็นจำนวน 40 รอบ โดยกำหนดสภาวะดังต่อไปนี้

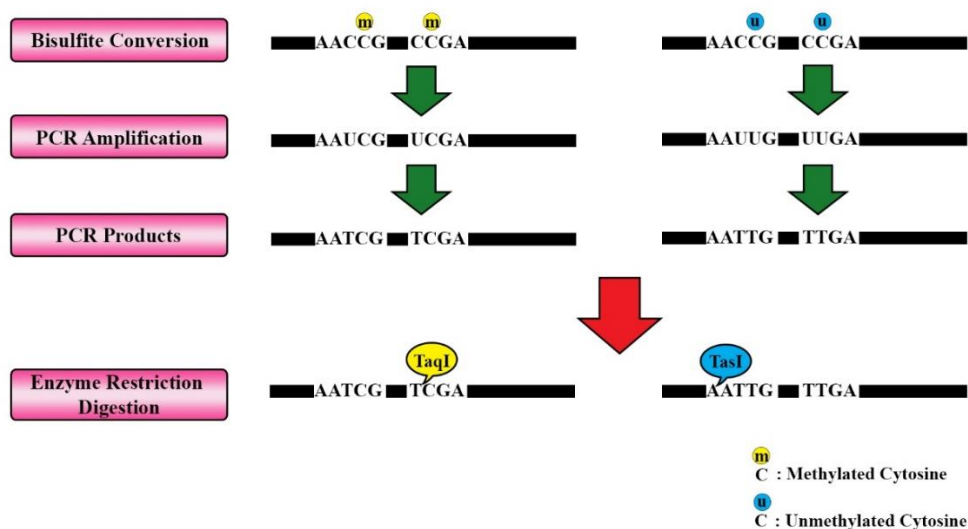
**Denaturing temperature:** 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

**Annealing temperature:** 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

**Extension temperature:** 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที

**Final extension:** 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที (หลังจากครบ 40 รอบแล้ว)

จากนั้นจะได้ LINE-1 amplicons ซึ่งมีขนาดประมาณ 160 bp ซึ่งต่อมาจะถูกย่อยด้วย TaqI และ TasI restriction enzymes ใน NEBuffer 3 โดยที่ TaqI restriction enzyme มีความจำเพาะกับ methylated DNA ส่วน TasI restriction enzyme มีความจำเพาะกับ unmethylated DNA ดังภาพที่ 14 โดยทำการ incubate ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 14 Restriction sites ของ TaqI restriction enzyme และ TasI restriction enzyme โดยที่ TaqI restriction enzyme มีความจำเพาะกับ methylated DNA โดยจะตัดจำเพาะต่อลำดับเบส TCGA ส่วน TasI restriction enzyme มีความจำเพาะกับ unmethylated DNA โดยจะตัดจำเพาะต่อลำดับเบส AATTG

### 3.8.3. การทำ Gel Electrophoresis

จะทำ gel electrophoresis โดยใช้ Mini-PROTEAN Tetra Cells ของ Bio-Rad บน non-denaturing 8% polyacrylamide gel ซึ่งเตรียมได้ดังต่อไปนี้

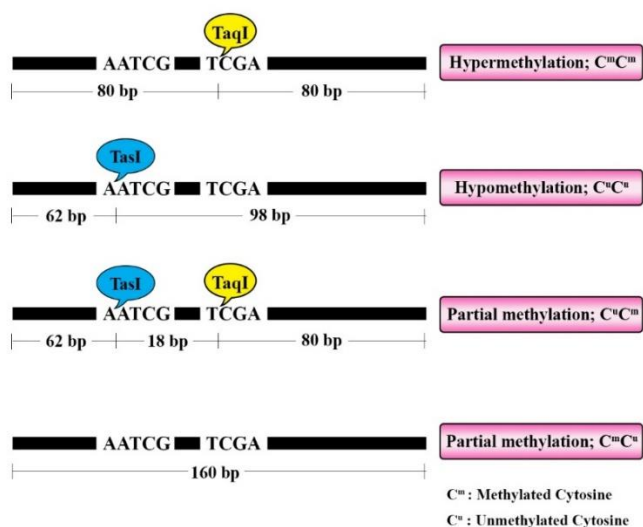
- 3.8.3.1. ทำการเตรียม 8% polyacrylamide gel (ปริมาตรต่อเจล 1 แผ่น) โดยการผสม Nuclease-free water ปริมาตร 7 mL, 10X TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer ปริมาตร 1 mL, 40% Acrylamide/Bis Solution, 19:1 ปริมาตร 2 mL, APS (Ammonium Persulfate) ปริมาตร 100  $\mu$ L และสุดท้ายคือเติม TEMED (Tetramethylethylenediamine) ปริมาตร 10  $\mu$ L คนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 3.8.3.2. หลังจากเติม TEMED แล้ว เจลจะเริ่มมีการ polymerization ดังนั้นต้องรีบนำส่วนผสมของเจลบรรจุใส่ในช่องว่างระหว่างกระจกที่มีความหนาของ spacer 1.5 mm หากใส่ช้าเจลอาจจะจับตัวเป็นก้อนก่อนได้ ซึ่งจะส่งผลต่อผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังต้องระวังอย่าให้เกิดฟอง หรือการรั่วไหลของเจลออกจากแผ่นกระจก จากนั้นเสียบ comb ด้านบนสุดของเจล เพื่อทำให้เกิด channels ในการหยอด samples
- 3.8.3.3. รอให้เจลเซ็ทตัวประมาณ 40 นาที จากนั้นนำแผ่นกระจกที่เจลเซ็ทตัวแล้ว ไปใส่ gel cassette
- 3.8.3.4. ประกอบ gel cassette เข้ากับกล่อง electrophoresis tank
- 3.8.3.5. เติม 1x TBE ซึ่งจะเป็น buffer ในขั้นตอนการทำ electrophoresis
- 3.8.3.6. ทำการหยอด Ladder ซึ่งใช้เป็น DNA step 25 bp และ PCR products ที่ผสมสี Nucleic Acid Gel Loading Dye, Blue (6X) ปริมาณ 5  $\mu$ L ซึ่งจะใช้เป็น bromphenol blue ลงไปในแต่ละ gel channel
- 3.8.3.7. จากนั้นดำเนินการทำ electrophoresis ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 110 V และกระแสไฟฟ้าคงที่ 400 mA เป็นเวลา 60 นาที
- 3.8.3.8. หลังจากนั้นเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการรัน gel electrophoresis แผ่นเจลจะถูกนำมาย้อมสีด้วย Ethidium Bromide 10 mg/mL แล้วนำไปเขย่าบน belly dancer เป็นเวลา 40 นาที

3.8.3.9. แผ่นเจลที่ย้อมสีแล้ว จะถูกนำไปถ่ายรูปรูปภายใต้แสง UV light ด้วย QuantityOne® 1-D analysis software, Bio-Rad จากนั้นจะนำรูปที่ได้ มาทำการวิเคราะห์ระดับ และรูปแบบดีเอ็นเอเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ต่อไป

โดยในการวิเคราะห์เมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 จะอาศัยการสังเกตขนาดและ ปริมาณของ methylated และ unmethylated amplicons บนเจล ซึ่ง TaqI-positive PCR products จะทำให้เกิด 80 bp DNA fragments ในขณะที่ TasI-positive PCR products จะทำให้เกิด 62, 63 และ 98 DNA fragments ซึ่งปริมาณของแต่ละ fragments จะถูกวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>)

### 3.9.การวิเคราะห์ระดับ DNA methylation ของ LINE-1

ในการวิเคราะห์เมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 นั้น COBRALINE-1 amplicons จะแบ่งออกได้เป็น 4 bands บน gel electrophoresis ตามรูปแบบของการเกิดเมธิเลชันของ CpG dinucleotides ทั้ง 2 ตำแหน่ง ดังนี้  $C^mC^u$  มีขนาด 160 bp,  $C^uC^u$  มีขนาด 98 bp, 1 methylated CpG ( $C^m$ ) มีขนาด 80 bp และ 1 unmethylated CpG ( $C^u$ ) มีขนาด 62 และ 63 bp ดังภาพที่ 15



#### ภาพที่ 15 รูปแบบของการเกิด LINE-1 methylation

โดย LINE-1 amplicons มีความเป็นไปได้ทั้งหมด 4 แบบ ได้แก่ hypermethylated loci ( $C^mC^m$ ), hypomethylated loci ( $C^uC^u$ ), และ 2 partially methylated loci ( $C^uC^m$  และ  $C^mC^u$ ) โดยในแต่ละแบบ TaqI restriction enzyme มีความจำเพาะกับ methylated DNA ส่วน TasI restriction enzyme มีความจำเพาะกับ unmethylated DNA โดย LINE-1 PCR products จะมีขนาดต่างกัน ได้แก่ 160 bp, 98 bp, 80 bp, 63 และ 62 bp

ในส่วนของการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันจะดำเนินการตามหลักการของ Nakarin Kitkumthorn และคณะที่ได้ทำการศึกษาไว้ในปี ค.ศ. 2012 (Kitkumthorn, Keelawat, Rattanatanyong, & Mutirangura, 2012) โดยในแต่ละรูปแบบของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 จะดำเนินการคำนวณ ดังต่อไปนี้ (66)

อันดับแรกความเข้ม (intensity) ของแต่ละ band จะถูกหารด้วยความยาว (bp) ของ double-stranded DNA

$$\%160/160 = A$$

$$\%98/98 = B$$

$$\%80/80 = C$$

$$\%(62+63)/62 = D$$

จากนั้นคำนวณร้อยละของระดับเมธิเลชันรวมได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละของ } C^m = 100 \times (C+A) / (C+A+A+B+D)$$

ขั้นต่อไปจะเป็นการคำนวณร้อยละของรูปแบบเมธิเลชันแต่ละแบบ โดยมีการคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละของ } C^m C^u = 100 \times (A) / (((C-D+B)/2) + A + D)$$

$$\text{ร้อยละของ } C^u C^m = 100 \times (D-B) / (((C-D+B)/2) + A + D)$$

$$\text{ร้อยละของ } C^u C^u = 100 \times (B) / (((C-D+B)/2) + A + D)$$

$$\text{ร้อยละของ } C^m C^m = 100 \times ((C-D+B)/2) / (((C-D+B)/2) + D + A)$$

### 3.10. การวิเคราะห์การแสดงออกของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นโรคออทิซึม สเปกตรัมและคนปกติด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR

#### 3.10.1. การทำปฏิกิริยา DNase และ qRT-PCR กับอาร์เอ็นเอตัวอย่าง

เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Reverse Transcription PCR (RT-PCR) ก่อนที่จะนำไปทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative PCR ต่อไป โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ชุด kit ได้แก่ RQ1 RNase-Free DNase และดำเนินการตามหลักการของบริษัท Promega

ขั้นแรกเป็นการเตรียมปฏิกิริยา DNase digestion โดยจะเตรียม RNA ใน DEPC-DW ปริมาตร 1-8  $\mu\text{L}$  ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินการดังนี้

3.10.1.1. ทำการผสม RQ1 RNase-free DNase 10X Reaction Buffer ปริมาตร 1  $\mu\text{L}$  และ RNA ตัวอย่าง ปริมาณ 1 U/ $\mu\text{g}$  แล้วเติม DEPC-DW ไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 10  $\mu\text{L}$

3.10.1.2. ทำการ incubation ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.10.1.3. เติม RQ1 DNase Stop Solution ปริมาตร 1  $\mu\text{L}$  ลงไป เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยา

3.10.1.4. ทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNase โดยการ incubation ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เป็นอันเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยา DNase กับ RNA ตัวอย่าง

### 3.10.2. ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis)

ขั้นต่อไปเป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis) ซึ่งจะดำเนินการโดยใช้ชุด kit ได้แก่ AccuPower® RT PreMix และดำเนินการตามหลักการของบริษัท Bioneer โดยขั้นต่อไปมีดังต่อไปนี้

3.10.2.1. Dnase-treated RNA ปริมาณ 1  $\mu\text{g}$  ถูกนำมาผสมกับ primer (oligo dT18) ปริมาณ 0.5  $\mu\text{g}$  ใน sterile tube

3.10.2.2. ทำการ incubation ส่วนผสมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนผสมออกมาวางบนน้ำแข็งทันที

3.10.2.3. ทำการย้ายส่วนผสมที่ incubate แล้ว ไปใส่ใน AccuPower® RT PreMix tube

3.10.2.4. เติม DEPC-DW ลงไปในส่วนผสมนั้นจนถึงปริมาตรสุดท้ายที่ 20  $\mu\text{L}$

3.10.2.5. ทำการละลาย lyophilized blue pellet โดยการ vortex และปั่นตก (spin down)

3.10.2.6. การสังเคราะห์ cDNA จะเริ่มโดยการ incubation ส่วนผสมที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.10.2.7. ทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RTase โดย incubation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.10.2.8. ย้าย cDNA ตัวอย่าง ที่สังเคราะห์ได้ลงใน 1.5 mL sterile tube จากนั้นทำการเจือจาง cDNA ตัวอย่างด้วยการเติม DEPC-DW ลงไป ปริมาตร 30  $\mu\text{L}$

3.10.2.9. เสร็จสิ้นกระบวนการ RT-PCR โดย cDNA ตัวอย่างจะถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์การ แสดงออกของยีนด้วยวิธี Quantitative PCR (qPCR) หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศา เซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

3.10.3. การวิเคราะห์การแสดงออกของ LINE-1 ใน LCLs ของผู้ที่เป็นโรคอหิวาต์ชิมสเปกตรัมและคน ปกติด้วย quantitative PCR

การทำปฏิกิริยา qPCR เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ LINE-1 จะดำเนินการโดยใช้ AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix ที่มี SYBR Green dye เป็นตัว detect กับ ROX dye เป็น passive dye และดำเนินการตามหลักการของบริษัท Bioneer และใช้ cDNA ปริมาตร 1 µL หรือประมาณ 20 ng เป็น template สำหรับปฏิกิริยา real-time PCR โดยจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) เป็น endogenous control ซึ่งมี annealing temperature 60 องศาเซลเซียส และมี primer sequences เป็นดังนี้

**Forward primers** 5'-ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA-3'

**Reverse primers** 5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'

ซึ่งการทำปฏิกิริยา qPCR มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.10.3.1. เตรียม mastermix ใน sterile tube โดยการเติม AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix ปริมาตร 6.25 µL ลงไป ซึ่งประกอบด้วย SYBR Green I Dye, Hotstart DNA polymerase (1 U), dNTP Mixture (each 250 µM), Optimized buffer components (Tris-HCl, 60 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) และ Stabilizer

3.10.3.2. จากนั้นเติม specific primers (100 pmol/µL) ต่อยีนนั้น ๆ ที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 0.5 µL ลงไปในส่วนผสม mastermix โดย specific primers ของ LINE-1 เป็นดังต่อไปนี้

**Forward primers** 5'-GCGCAAGGGGTCAGGGAGTTC-3'

**Reverse primers** 5'-GTAGGACCCTCCGAGCCAGGTGTGGG-3'

3.10.3.3. เติม 20X Rox Dye ปริมาตร 0.25 µL ลงไปในหลอดปฏิกิริยา เพื่อที่จะใช้เป็น passive reference dye ของปฏิกิริยา qPCR แบบ Real-time

3.10.3.4. เติม DEPC-DW ลงไปจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 µL จากนั้นทำการผสมโดย vortex และปั่นตก

- 3.10.3.5. หลังจากเตรียม mastermix เรียบร้อยแล้ว ปิเปตต์ qPCR mastermix และ cDNA ตัวอย่างลงใน qPCR tube strips โดยการศึกษาที่ใช้ DEPC-DW เป็น negative control จากนั้นทำการปิดปากหลอดทุกหลอดด้วยฟิล์มใสให้แน่น (optical adhesive film) แล้วนำไป vortex และปั่นตกอีกรอบ
- 3.10.3.6. นำ qPCR tube strips ที่ปั่นตกจนแน่ใจแล้วว่าไม่มีส่วนผสมเกาะติดอยู่ที่ข้างๆ หลอด ไปใส่ในเครื่อง Real-time PCR (Exicycler™ 96, Bioneer)
- 3.10.3.7. จากนั้นกำหนดสถานะในการทำ qPCR ของยีนที่ทำการศึกษา  
LINE-1 qPCR กำหนดปฏิกิริยาไว้จำนวน 40 รอบ ที่สภาวะดังต่อไปนี้  
**Pre-denaturation step:** อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที  
**Denaturation step:** อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที  
**Annealing step:** อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที  
**Extension step:** อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

หมายเหตุ อุณหภูมิ Melting ที่ 60-97 องศาเซลเซียส โดยวัดทุก ๆ 1 องศาเซลเซียส

ในส่วนของการ normalized expression level ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย qPCR จะถูกนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้หลักการ Delta-Delta-Ct (ddCt) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่า threshold cycle (Ct) ของยีนเป้าหมายกับ reference gene หรือ endogenous control (GAPDH)

### 3.11. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน C1orf27 และ ARMC8 ใน LCLs ของผู้ที่เป็นโรค ออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติด้วย quantitative PCR

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน C1orf27 และ ARMC8 จะดำเนินการด้วยวิธีและหลักการเดียวกันกับการทำปฏิกิริยา qPCR ของ LINE-1 แต่จะดำเนินการโดยใช้ specific primers สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

#### 3.11.1. ปฏิกิริยา qPCR ของ C1orf27

- 3.11.1.1. Specific primers ของ C1orf27 ได้แก่

**Forward primers** 5'-CAAGCTTCATTGGACAACACA-3'

**Reverse primers** 5'-AGATACCCGCAGCAAGGAC-3'



3.11.1.2. สภาวะในการทำปฏิกิริยา qPCR ของ C1orf27 กำหนดที่ 40 รอบ

**Pre-denaturation step:** อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Denaturation step:** อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

**Annealing step:** อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

**Extension step:** อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

หมายเหตุ อุณหภูมิ Melting ที่ 60-97 องศาเซลเซียส โดยวัดทุก ๆ 1 องศาเซลเซียส

3.11.2. ปฏิกิริยา qPCR ของ ARMC8

3.11.2.1. Specific primers ของ ARMC8 ได้แก่

**Forward primers** 5'-CCTCATTGCCATGCTTGCTG-3'

**Reverse primers** 5'-CGGAGTTCGTGAGCATGTTTT-3'

3.11.2.2. สภาวะในการทำปฏิกิริยา qPCR ของ ARMC8 กำหนดที่ 45 รอบ

**Pre-denaturation step:** อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**Denaturation step:** อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

**Annealing step:** อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที

**Extension step:** อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

หมายเหตุ อุณหภูมิ Melting ที่ 60-97 องศาเซลเซียส โดยวัดทุก ๆ 1 องศาเซลเซียส

### 3.12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติจะดำเนินการโดยใช้ Student's t-test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับเมธิเลชันและระดับการแสดงออกของยีนใน LCLs ระหว่างผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติ การวิเคราะห์ทางสถิติของ gene expression profiles ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx จะวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนด้วย Student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ p-value (two-tailed) < 0.05 ในลำดับถัดมาการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติ กับกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่จะทำการวิเคราะห์ด้วย chi-square test

ในส่วนของการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและเครือข่ายการควบคุมยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) โปรแกรมจะทำนายโดยใช้สถิติ คือ Fisher's Exact Test ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้การวิเคราะห์ Receiver-Operating Characteristic (ROC) curve analysis เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการใช้ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในการเป็นเครื่องมือวินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัม จะทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics



## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

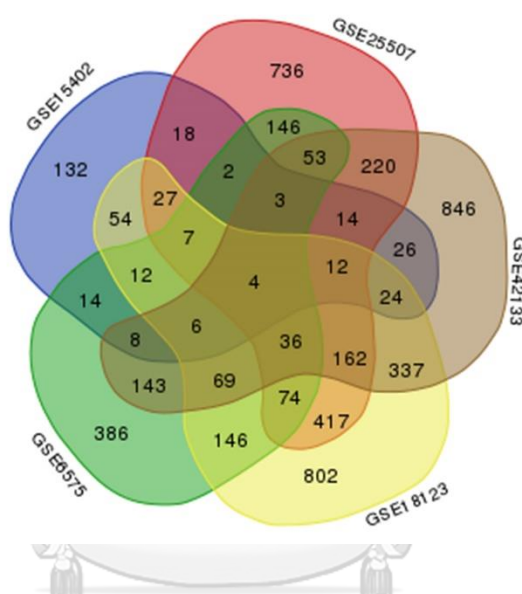
#### 4.1. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ที่เป็นโรคออลิซึมสเปกตรัมโดยใช้โปรแกรม Connection Up and Down Regulation Expression Analysis of Microarrays extension (CU-DREAMx)

ผลการวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx ของรูปแบบการแสดงออกของยีนจากการศึกษาต่าง ๆ ที่คัดเลือกมานั้นแสดงให้เห็นว่า กลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวมีความสัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ chi-square test,  $p\text{-value} < 0.05$  ดังใน ตารางที่ 2 (ตัวหนา) จากนั้นจึงทำการคัดเลือกรายชื่อยีน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ LINE-1 ในโรคออลิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) โดยนำรายชื่อยีนที่มี reproducibility คือมีการพบความผิดปกติซ้ำมากกว่า 3 การศึกษาขึ้นไป ซึ่งมีทั้งหมด 501 ยีนมาทำการวิเคราะห์ดัง ภาพที่ 16 และ ตารางภาคผนวกที่ 1ก

Type of LINE-1 insertion	Comparison	GEO Datasets	Up-regulated gene expression		Down-regulated gene expression	
			P-value	Number of genes	P-value	Number of genes
Exonic type	ASD vs Control	GSE15402	0.922	17	0.301	18
		GSE18123	<b>2.33E-08</b>	104	<b>0.019</b>	18
		GSE25507	0.196	39	<b>0.009</b>	39
		GSE42133	0.212	50	<b>4.53E-05</b>	54
		GSE6575	0.159	45	0.565	3
Exonized type	ASD vs Control	GSE15402	0.357	3	0.389	6
		GSE18123	<b>0.021</b>	29	0.914	9
		GSE25507	0.197	10	<b>2.87E-04</b>	18
		GSE42133	0.661	15	0.938	10
		GSE6575	0.450	14	<b>0.005</b>	3
Intronic type	ASD vs Control	GSE15402	0.572	385	<b>0.006</b>	358
		GSE18123	<b>4.76E-126</b>	2,157	0.902	699
		GSE25507	0.075	1,051	<b>1.03E-53</b>	906
		GSE42133	<b>6.58E-10</b>	1,137	<b>3.77E-05</b>	838
		GSE6575	<b>3.39E-24</b>	1,094	0.145	59
Promoter type	ASD vs Control	GSE15402	0.241	2	0.960	5
		GSE18123	0.760	27	0.356	9
		GSE25507	0.484	16	0.628	9
		GSE42133	0.687	20	0.766	15
		GSE6575	0.352	18	0.352	0
All types of insertion	ASD vs Control	GSE15402	0.439	394	<b>0.007</b>	363
		GSE18123	<b>1.17E-126</b>	2,189	0.750	708
		GSE25507	<b>0.042</b>	1,065	<b>8.67E-52</b>	913
		GSE42133	<b>3.74E-10</b>	1,159	<b>6.97E-05</b>	850
		GSE6575	<b>7.43E-24</b>	1,109	0.196	59

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออตทิซึ่มสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญ จากทั้ง 5 GEO DataSets ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx

รายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ในทุก ๆ รูปแบบ (Exonic type, Exonized type, Intronic type, Promoter type และ all insertion types) จาก TranspoGene database ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกับรูปแบบการแสดงออกของยีนจากแต่ละการศึกษาที่คัดเลือกมาจาก GEO DataSet database ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ผลที่ได้คือกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ ซึ่งมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 16 Venn diagram แสดงจำนวนยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติที่มีการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไป

รายชื่อยีนในแต่ละการศึกษาที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ถูกนำมาทำการ overlapping เพื่อหารายชื่อยีนที่มีร่วมกัน โดยพบว่ามียีนจำนวน 501 ยีน ที่มีการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไป

#### 4.2. ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวจากผู้ที่เป็นโรคออทิซึ่มสเปกตรัมด้วย SAM

ผลการวิเคราะห์ด้วย SAM ในขั้นตอนนี้เป็นการวิเคราะห์โดยใช้รูปแบบการแสดงออกของเซลล์ LCLs ของผู้ป่วยออทิซึ่มสเปกตรัมกลุ่ม L เพื่อค้นหากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง และนำผลการวิเคราะห์นี้ไปเทียบกับรายชื่อยีนที่ได้จาก CU-DREAMx ของผู้ป่วยกลุ่ม L เพื่อค้นหารายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีระดับการแสดงออก

ผิดปกติที่ระดับความน่าเชื่อถือสูง ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วย SAM ของผู้ป่วยกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความผิดปกติทางการใช้ภาษา แสดงเป็นรายชื่อยีนที่ผิดปกติในตารางภาคผนวกที่ 5ก และ 6ก ตามลำดับ ต่อมาผลการเปรียบเทียบรายชื่อยีนที่ได้จาก SAM กับรายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ และมีระดับการแสดงออกผิดปกติที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx แสดงในตารางที่ 3 หลังจากนั้นผู้ทำวิจัยได้ทำการคัดเลือกรายชื่อยีนมา 2 ยีนได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 เพื่อทำการวิเคราะห์และยืนยันผลการแสดงออกของยีนที่ได้จาก microarray data ด้วยเทคนิค qRT-PCR

LINE-1 insertion types	Group	Number of genes	List genes
Exonic Type with Down regulation	ASD subgroup L	2	C1orf27, FCGR2B
	ASD subgroup L (age-matched)	0	-
Intronic Type with Down regulation	ASD subgroup L	10	OSBP, FCGR2B, STRBP, IDS, C1orf27, JAK1, ZNF124, ARMC8, USP8, LRRC40
	ASD subgroup L (age-matched)	3	IDS, ARMC8, HDHD1A
All Types with Down regulation	ASD subgroup L	10	OSBP, FCGR2B, STRBP, IDS, C1orf27, JAK1, ZNF124, ARMC8, USP8, LRRC40
	ASD subgroup L (age-matched)	3	IDS, ARMC8, HDHD1A

ตารางที่ 3 ผลวิเคราะห์รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ที่มีระดับความน่าเชื่อถือสูง (high confidence level, SAM)

รายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ถูกนำมาเปรียบเทียบกับรายชื่อยีนที่มีร่วมกับรายชื่อยีนที่ได้จากกว่าวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MeV (SAM statistics) เพื่อเพิ่มระดับความน่าเชื่อถือของยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L

#### 4.3.ผลการวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและเครือข่ายการควบคุมยีนของยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม โดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

การวิเคราะห์โดยโปรแกรม IPA ด้วยสถิติแบบ Fisher's Exact test ( $p < 0.05$ ) เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ ความสำคัญต่อการเกิดโรค และเครือข่ายการควบคุมยีนของยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมและมีการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไปจำนวน 501 ยีน จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx โดยมีผลดัง ตารางที่ 4, ตารางภาคผนวกที่ 2ก และตารางภาคผนวกที่ 3ก ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า networks ที่มีความเกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ (1) Embryonic Development, Organismal Development, Endocrine System Development and Function, (2) Nervous System Development and Function, Neurological Disease, Organ Morphology และ (3) Cell Death and Survival, Nervous System Development and Function, Endocrine System Disorders ดัง ตารางที่ 5 ซึ่งใน ภาพที่ 17 ได้แสดงภาพเครือข่ายการควบคุมยีนของ network ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับ Embryonic Development, Organismal Development, Endocrine System Development and Function

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Number of Molecules
Cognitive impairment	3.01E-08	91
Gangliosidosis	7.23E-08	7
Mental retardation	1.06E-07	78
Disorder of basal ganglia	3.88E-07	136
Polyneuropathy	8.17E-07	35
Familial mental retardation	1.06E-06	57
Neuromuscular disease	1.33E-06	155
Autosomal dominant mental retardation	2.59E-06	20
Peripheral neuropathy	4.00E-06	41
Neuritogenesis	5.79E-06	24
Hereditary neuropathy	6.35E-06	46
Tay-Sachs disease	7.95E-06	5
Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Number of Molecules
Huntington's Disease Signaling	3.98E-14	63
Axonal Guidance Signaling	6.31E-14	94
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	3.02E-09	33
Growth Hormone Signaling	1.62E-08	26
Neuregulin Signaling	1.35E-05	22
Semaphorin Signaling in Neurons	1.66E-05	16
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	1.91E-05	30
Dendritic Cell Maturation	1.07E-04	34
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	7.08E-04	15
Netrin Signaling	7.94E-04	11
Androgen Signaling	1.58E-03	21
Estrogen Receptor Signaling	4.79E-03	22
nNOS Signaling in Neurons	0.028	9
DNA Methylation and Transcriptional Repression Signaling	0.036	5

**ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ biological functions และ canonical pathways ที่มีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม**

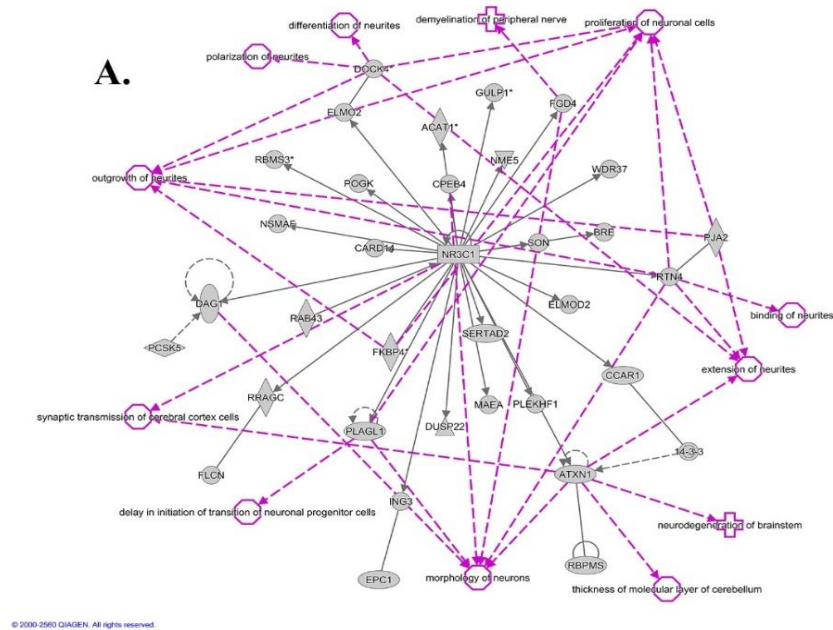
ตารางแสดงรายการของ biological functions และ canonical pathways ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ของ 501 ยีน เมื่อถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IPA ด้วย ด้วยสถิติแบบ Fisher's Exact test (p-value < 0.05)



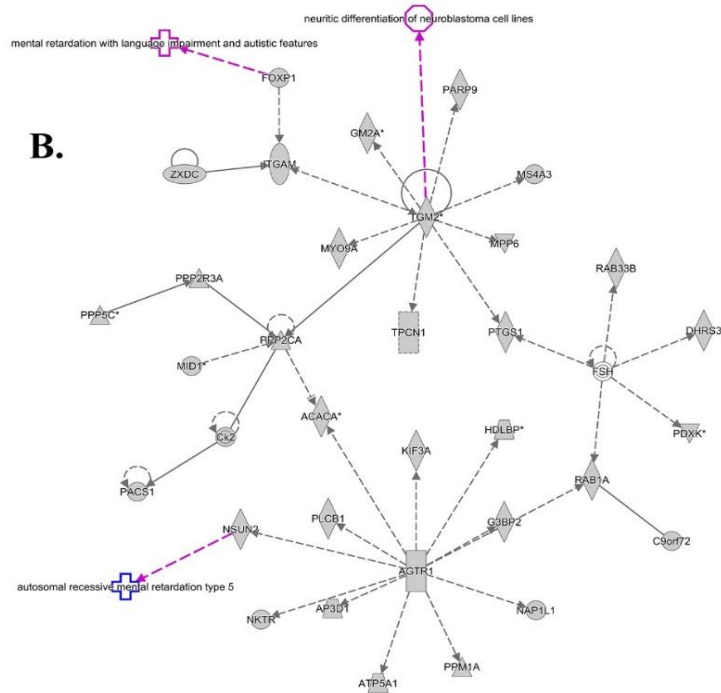
Diseases and Functions	Molecules	Molecules in Network
Embryonic Development, Organismal Development, Endocrine System Development and Function	34	14-3-3, ACAT1, ATXN1, BRE, CARD14, CCAR1, CPEB4, DAG1, DOCK4, DUSP22, ELMO2, ELMOD2, EPC1, FGD4, FKBP4, FLCN, GULP1, ING3, MAEA, NME5, NR3C1, NSMAF, PCSK5, PJA2, PLAGL1, PLEKHF1, POGK, RAB43, RBMS3, RBPMS, RRAGC, RTN4, SERTAD2, SON, WDR37
Nervous System Development and Function, Neurological Disease, Organ Morphology	33	ACACA, AGTR1, AP3D1, ATP5A1, C9orf72, Ck2, DHRS3, FOXP1, FSH, G3BP2, GM2A, HDLBP, ITGAM, KIF3A, MID1, MPP6, MS4A3, MYO9A, NAP1L1, NKTR, NSUN2, PACS1, PARP9, PDXK, PLCB1, PPM1A, PPP2CA, PPP2R3A, PPP5C, PTGS1, RAB1A, RAB33B, TGM2, TPCN1, ZXDC
Cell Death and Survival, Nervous System Development and Function, Endocrine System Disorders	29	ABCB1, ADCYAP1R1, APBA2, APP, ASAH1, ATP6V0D1, CHD9, CLEC2B, CREBBP, CTSC, DAB2, Fcgr2, FCRL5, FGL1, GAB2, HAVCR2, Iga, IgG, IL12 (complex), LDL, LGALS3, MBP, mediator, NADK, NCOA1, NIPBL, NSD2, PRNP, ROCK2, RTN3, SLC9A6, SLMAP, STK24, TLE1, ZMPSTE24

**ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์เครือข่ายการควบคุมยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและสมองของกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมด้วยโปรแกรม IPA**

ผลการวิเคราะห์เครือข่ายการควบคุมยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและสมองของกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งมีการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไป จำนวน 501 ยีน ด้วยโปรแกรม IPA พบว่ามี 34 โมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเครือข่าย Embryonic Development, Organismal Development, Endocrine System Development and Function มี 33 โมเลกุล ที่มีความสัมพันธ์กับเครือข่าย Nervous System Development and Function, Neurological Disease, Organ Morphology และพบว่ามี 29 โมเลกุล ที่มีความสัมพันธ์กับเครือข่าย Cell Death and Survival, Nervous System Development and Function, Endocrine System Disorders



© 2000-2560 QIAGEN. All rights reserved.



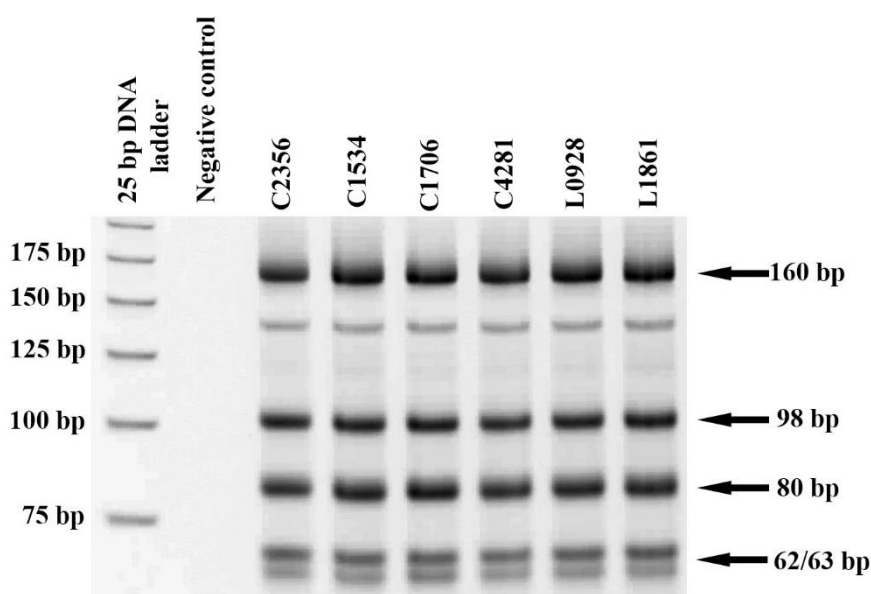
© 2000-2560 QIAGEN. All rights reserved.

ภาพที่ 17 ภาพเครือข่ายการควบคุมยีน (networks) ที่มีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาทจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA

(A.) Embryonic Development, Organismal Development, Endocrine System Development and Function และ (B.) Nervous system development and function, neurological disease and organ morphology โดยที่ gene symbols (พื้นหลังสีเทา) เป็นรายชื่อยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับเครือข่ายการควบคุมยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาท (พื้นหลังสีขาว กรอบและลูกศรสีชมพูและน้ำเงิน)

#### 4.4. ผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1

ดีเอ็นเอที่สกัดออกมาจาก LCLs ของออทิสซึมสเปกตรัมและกลุ่มคนปกติจะถูกนำมาทำการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ที่บริเวณ LINE-1 promoter โดยใช้เทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) และ products ที่ได้จาก LINE-1 COBRA จะถูกนำมาทำ gel electrophoresis บน non-denaturing 8% polyacrylamide gel และวัดความเข้มของ LINE-1 COBRA products ด้วยโปรแกรม GelAnalyzer 2010a โดย TaqI-positive PCR products จะมีขนาด 80 bp ในขณะที่ TasI-positive PCR products มีขนาด 62, 63 และ 98 bp ดัง ภาพที่ 18



ภาพที่ 18 COBRA LINE-1 amplicons บน non-denaturing 8% polyacrylamide gel

โดยหลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ TasI และ TaqI แล้ว จะทำการเติม Nucleic Acid Gel Loading Dye, Bromophenol Blue (6X) ลงใน COBRA LINE-1 products แล้วทำการรันเจล electrophoresis บน 8% non-denaturing polyacrylamide gel และใช้ 25 bp DNA Ladder เป็น marker จากนั้นจะกำหนดสภาวะที่ 110V, 400mA เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการย้อม gel ด้วย 10 mg/mL Ethidium Bromide โดย TaqI-positive PCR products จะมีขนาด 80 bp ในขณะที่ TasI-positive PCR products มีขนาด 62, 63 และ 98 bp

ผลจากการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 และค่านัยสำคัญ (p-value, t-test) แสดงดัง ตารางที่ 6 โดยพบว่าระดับเมธิเลชันทั้งหมดของ LINE-1 ( $C^m$ ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใน LCLs ของผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัม (n=36) เทียบกับกลุ่มคนปกติ (n=20) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ไปถึงแต่ละรูปแบบของการเมธิเลชันของ LINE-1 ซึ่งได้แก่ partial methylation ( $C^u C^m$  และ  $C^m C^u$ ),

hypomethylation ( $C^u C^u$ ) และ hypermethylation ( $C^m C^m$ ) พบว่า มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ hypermethylation ( $C^m C^m$ ) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.012 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบอื่น ๆ

Percentage of LINE-1 methylation pattern (Mean±SD)					
Group	% $C^m$	% $C^m C^u$	% $C^u C^m$	% $C^u C^u$	% $C^m C^m$
Control (N=20)	34.84±2.00	26.12±2.70	26.45±8.14	38.88±4.51	8.56±3.81
ASD group (N=36)	36.23±4.15	26.38±3.29	22.27±8.70	39.44±5.31	11.91±5.86
p-value (t-test)	0.096	0.752	0.080	0.677	<b>0.012</b>

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ตัวอย่างเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ

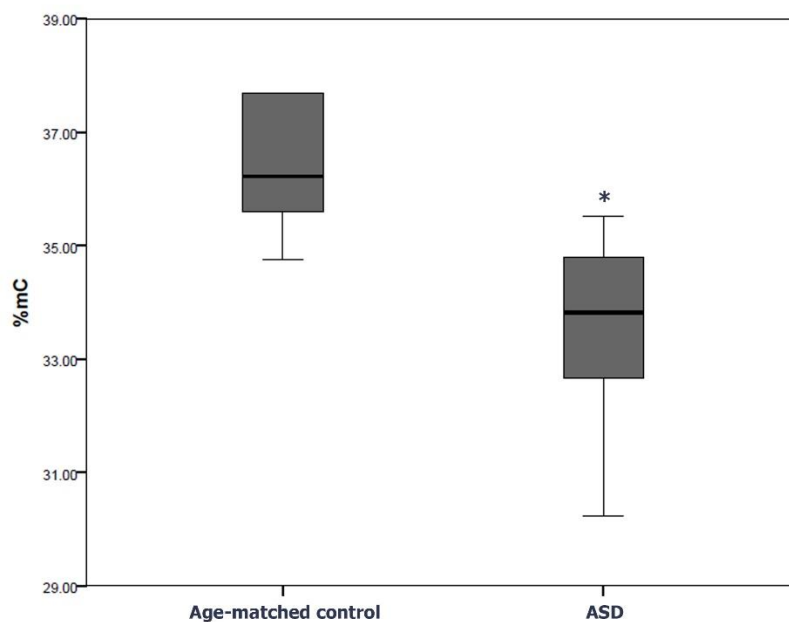
ตารางแสดงร้อยละของระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 และระดับเมธิเลชันในแต่ละรูปแบบของ LINE-1 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ พร้อมกับค่านัยสำคัญ p-value (t-test) ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับเมธิเลชันในรูปแบบ hypermethylation ( $C^m C^m$ ) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.012

เนื่องจากออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านลักษณะทางคลินิกและระดับความแรงของโรค คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมตัวอย่างที่ได้รับการจัดจำแนกกลุ่มจากคะแนน ADI-R โดย Hu และคณะในปี ค.ศ. 2009 (Hu et al., 2009) ซึ่งได้จำแนก LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมออกเป็นกลุ่มดังนี้ กลุ่ม Language impairment autism (L; N=6) กลุ่ม Mild autism (M; N=10) และกลุ่ม Autistic Savant (S; N=20) โดยจะทำการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากันกับกลุ่มผู้ป่วย (age-matched control group) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า ระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ( $C^m$ ) มีการลดลงใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.013 (ตัวหนา) เมื่อเทียบกับกลุ่ม age-matched control และในส่วนของ การวิเคราะห์รูปแบบเมธิเลชันของ LINE-1 ใน LCLs แต่ละกลุ่มย่อยของออทิซึมสเปกตรัม พบว่า ออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S หรือกลุ่มที่มีทักษะและความสามารถทางสติปัญญา มีการเพิ่มขึ้นของ hypermethylation ( $C^m C^m$ ) อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.038 (ตัวหนา) เมื่อเทียบกับกลุ่ม age-matched control ดัง ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 19

Group	Age in years (Mean±SD)	Percentage of LINE-1 methylation pattern (Mean±SD)				
		%C <sup>m</sup>	%C <sup>m</sup> C <sup>u</sup>	%C <sup>u</sup> C <sup>m</sup>	%C <sup>u</sup> C <sup>u</sup>	%C <sup>m</sup> C <sup>m</sup>
Control (N=6)	13.50 ± 2.48	36.37±1.16	26.26±2.30	26.02±10.76	37.49±4.14	10.23±5.20
Subgroup L (N=6)	13.00 ± 1.97	33.48±1.92	25.22±1.91	24.77±8.77	41.53±4.45	8.48±4.97
p-value		<b>0.013</b>	0.416	0.829	0.135	0.566
Control (N=10)	11.50 ± 3.77	35.00±2.28	27.19±3.03	23.33±9.10	39.74±5.32	9.73±4.22
Subgroup M (N=10)	11.50 ± 3.73	36.60±4.66	27.06±2.40	17.71±8.53	41.02±5.08	14.21±6.47
p-value		0.347	0.916	0.171	0.590	0.086
Control (N=20)	14.00 ± 6.97	34.84±2.00	26.12±2.70	26.45±8.14	38.88±4.51	8.56±3.81
Subgroup S (N=20)	13.00 ± 5.41	36.88±4.19	26.38±3.95	23.81±8.32	38.03±5.45	11.79±5.51
p-value		0.060	0.808	0.317	0.593	<b>0.038</b>

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์รูปแบบการเมธิเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยอติซิมสเปกตรัมตัวอย่างแต่ละกลุ่มย่อยเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ร้อยละของแต่ละรูปแบบการเมธิเลชันของ LINE-1 ใน LCLs ของอติซิมสเปกตรัมตัวอย่าง เมื่อถูกจำแนกกลุ่มด้วยคะแนน ADI-R โดย Hu และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 (Hu et al., 2009) เทียบกับกลุ่ม age-matched control ที่ระดับนัยสำคัญ (t-test) 0.05 ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 (C<sup>m</sup>) ใน LCLs ของอติซิมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่ระดับนัยสำคัญ 0.013 และระดับ hypermethylation (C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>) ของ LINE-1 ใน LCLs ของอติซิมสเปกตรัมกลุ่ม S ที่ระดับนัยสำคัญ 0.038



ภาพที่ 19 ผลการวิเคราะห์การกระจายข้อมูลของระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics

ภาพแผนภูมิ Box Plot แสดงให้เห็นถึง ผลของระดับเมธิเลชัน (%mC) ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ( $33.48 \pm 1.92$ ) ที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่ม age-matched control ( $36.37 \pm 1.16$ ) โดยที่  $* < 0.05$

จากการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันที่ LINE-1 promoter ใน LCLs อาจสรุปได้ว่า ระดับการเมธิเลชันของ LINE-1 มีการเปลี่ยนแปลงไปในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมแต่ละคน เมื่อเทียบกับคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรคที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน และรูปแบบของการเกิดเมธิเลชันในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมมีลักษณะที่จำเพาะสำหรับบางกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มที่มีปัญหาความบกพร่องทางการใช้ภาษา (language impairment) และกลุ่มที่มีทักษะและความสามารถทางสติปัญญา (savant skills)

#### 4.5.ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1

เมื่อเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ต่อไปจะดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) เพื่อตรวจสอบว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญใน LCLs ของออทิซึม

สเปกตรัมนั้น ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในออทิซึมสเปกตรัมอย่างไร

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ใน LCLs ระหว่างผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมด (n=36) เทียบกับกลุ่มคนปกติ (n=20) พบว่าระดับการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวม ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับคนปกติ ในลำดับต่อมาจึงได้ทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ใน LCLs แต่ละกลุ่มย่อยของออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ กลุ่ม L (n=6) กลุ่ม M (n=10) และกลุ่ม S (n=20) เทียบกับกลุ่ม age-matched control ของแต่ละกลุ่มย่อย (age-matched control L=6, age-matched control M =10 และ age-matched control S=20) ซึ่งผลที่ได้พบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่ม language impairment มีการแสดงออกของ LINE-1 ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม age-matched control โดยมี fold change=0.148, Log<sub>2</sub> Fold Change=-2.760 ที่นัยสำคัญทางสถิติ (t-test) 0.049 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M หรือ mild autism และกลุ่ม S หรือกลุ่ม savant skills มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม age-matched control แต่อย่างไรก็ตามไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงใน ตารางที่ 8

Group	Fold Change	Log <sub>2</sub> Fold Change	P-value (t-test)
ASD group vs. Control	1.041	0.058	0.929
Subgroup L vs. Age-matched control	<b>0.148</b>	<b>-2.760</b>	<b>0.049</b>
Subgroup M vs. Age-matched control	2.120	1.084	0.334
Subgroup S vs. Age-matched control	1.338	0.420	0.532

ตารางที่ 8 ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับกลุ่มคนปกติด้วยเทคนิค qRT-PCR

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ด้วยเทคนิค qRT-PCR ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมทั้งหมดเทียบกับกลุ่มคนปกติ ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มย่อยเทียบกับกลุ่ม age-matched control

#### 4.6. ผลการวิเคราะห์หารายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน 56 LCLs ของ GSE15402 โดยใช้โปรแกรม CU-DREAMx

นอกจากโปรแกรม CU-DREAMx จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน 5 การศึกษาวิจัยข้างต้นแล้ว โปรแกรม CU-DREAMx ยังถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหารายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน 56 LCLs ของ GSE15402 ที่จำแนกกลุ่มโดย Hu และคณะ (Hu et al., 2009) ซึ่งเป็น LCLs ทั้งหมดที่ใช้ทดลองวิจัยในการศึกษานี้ ซึ่งผลได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 9 ทั้งนี้ได้ใช้ผลการวิเคราะห์ในการคัดเลือกยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมออกมา 2 ยีน เพื่อนำมาดำเนินการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกและยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนจาก microarray data ด้วยเทคนิค qRT-PCR

Type of LINE1 insertion	Group of comparison	Up-regulated expression		Down-regulated expression	
		P-value	Number of genes	P-value	Number of genes
Exonic	L vs control	0.497	15	<b>0.028</b>	26
	M vs control	0.852	17	0.825	15
	S vs control	0.261	15	0.305	11
	All vs control	0.438	9	0.087	4
Exonized	L vs control	0.850	6	0.522	4
	M vs control	<b>0.019</b>	10	0.742	5
	S vs control	0.837	3	0.301	4
	All vs control	0.161	6	0.665	2
Intronic	L vs control	0.750	415	<b>0.016</b>	434
	M vs control	<b>1.31E-06</b>	429	0.365	329
	S vs control	0.201	268	0.662	178
	All vs control	0.065	281	0.402	194
Promoter	L vs control	0.825	5	0.288	3
	M vs control	0.372	3	0.255	2
	S vs control	0.763	4	0.338	1
	All vs control	0.429	5	0.279	1



Type of LINE1 insertion	Group of comparison	Up-regulated expression		Down-regulated expression	
		P-value	Number of genes	P-value	Number of genes
All types	L vs control	0.897	419	0.012	442
	M vs control	1.28E-06	435	0.372	334
	S vs control	0.150	274	0.519	179
	All vs control	0.046	287	0.333	196

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ และกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน 56 LCLs ของ GSE15402 ที่ถูกจำแนกออกเป็นแต่ละกลุ่มย่อย ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx

กลุ่มยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ จาก TranspoGene database ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมจาก 56 LCLs ของ GSE15402 ที่ถูกจำแนกออกเป็นแต่ละกลุ่มย่อย ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนสองกลุ่มนี้ ซึ่งพบว่ากลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบ Exonic, Exonized, Intronic และ All insertion types มีความสัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L, M และผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มรวม

จากการวิเคราะห์ข้อมูล transcriptomics ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx ของ 56 LCLs จาก GSE15402 ที่ถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อย คณะผู้วิจัยพบว่ามีความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่ระดับนัยสำคัญ (chi-square test) 0.012, กลุ่ม M ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.001$  และผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมที่ระดับนัยสำคัญ 0.046 โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S และจากนั้นเมื่อทำการพิจารณาแยกประเภทของการแทรกตัวของ LINE-1 ออกเป็น 4 รูปแบบข้างต้น เพื่อศึกษาว่ากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม มีความสัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบใดบ้าง คณะผู้วิจัยพบว่า กลุ่มยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบ Exonic, Exonized และ Intronic มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L และ M โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบ Exonic และ Intronic กับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่ลดลงในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา ที่ระดับนัยสำคัญ (chi-square test) 0.028 และ 0.016 ตามลำดับ และพบความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ในรูปแบบ Exonized และ Intronic กับกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M หรือกลุ่มที่มีความรุนแรงระดับ

ปานกลาง (mild autism) ที่ระดับนัยสำคัญ (chi-square test) 0.019 และน้อยกว่า 0.001 ตามลำดับ

ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของรีโทรทรานสคริปชัน LINE-1 ก่อนหน้านี้ ที่แสดงให้เห็นว่าออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่ม L มีระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของรีโทรทรานสคริปชัน LINE-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการคัดเลือกยีนจำนวน 2 ยีนที่น่าจะมีรีโทรทรานสคริปชัน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่ได้จากโปรแกรม CU-DREAMx ที่ระดับความเชื่อมั่นสูง (SAM) จากการวิเคราะห์ 56 LCLs ของ GSE15402 ซึ่งทั้งสองยีนนี้ได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 ซึ่งจะถูกนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกและยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนด้วย qRT-PCR

#### 4.7. ผลการวิเคราะห์ระดับและยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกมาจากโปรแกรม CU-DREAMx (C1orf27 และ ARMC8)

ในขั้นนี้เทคนิค qRT-PCR ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกและยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนที่มีรีโทรทรานสคริปชัน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความผิดปกติทางการใช้ภาษา ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAMx และ SAM ซึ่งยีนที่คัดเลือกมาทำการศึกษาได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 จากผลการวิเคราะห์พบว่าทิศทางการแสดงออกของ C1orf27 และ ARMC8 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค qRT-PCR ก่อนข้างมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ microarray profiling คือมีทิศทางการแสดงออกที่มีแนวโน้มจะลดลงสอดคล้องกัน โดย C1orf27 มี  $\log_2$  Fold Change จากการศึกษามicroarray เท่ากับ -0.387 และมี  $\log_2$  Fold Change จากการวิเคราะห์ด้วย qRT-PCR เท่ากับ -1.039 ส่วน ARMC8 มี  $\log_2$  Fold Change จากการศึกษามicroarray เท่ากับ -0.471 และมี  $\log_2$  Fold Change จากการวิเคราะห์ด้วย qRT-PCR เท่ากับ -0.960 ดังแสดงใน ตารางที่ 10 แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้นั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

Significant genes	Log <sub>2</sub> Fold Change from microarray	Fold Change of qRT-PCR	Log <sub>2</sub> Fold Change of qRT-PCR	P-value (t-test) of qRT-PCR
C1orf27	-0.387	0.487	-1.039	0.470
ARMC8	-0.471	0.514	-0.960	0.610

ตารางที่ 10 ผลการยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีนที่ได้จากการวิเคราะห์ microarray ซึ่งได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 ด้วยเทคนิค qRT-PCR

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทิศทางการแสดงออกของยีน C1orf27 และ ARMC8 ซึ่งเป็นยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่คัดเลือกมาจากผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม CU-DREAMx และ SAM โดยพบว่าผลการศึกษาการแสดงออกที่ได้จาก microarray และ qRT-PCR มีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกัน แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

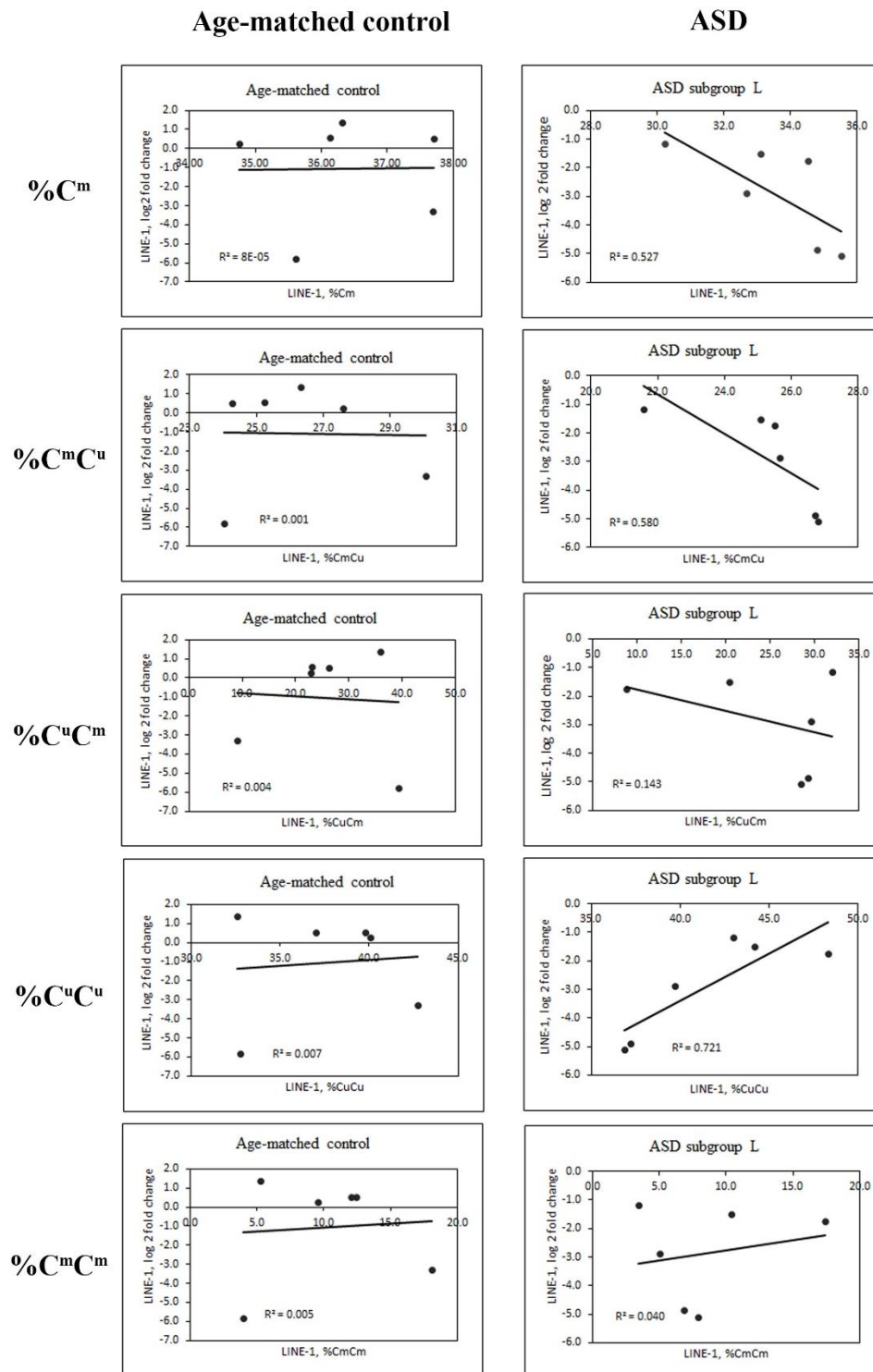
#### 4.8.ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างระดับเมธิเลชันและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ใน LCLs ของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มย่อยและกลุ่ม age-matched control

เพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการเกิดเมธิเลชันของ LINE-1 และ Log<sub>2</sub> fold change ของระดับการแสดงออกของ LINE-1 โดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่ม age-matched control และกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่ม L, M และ S ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า ระดับเมธิเลชันรวม (%C<sup>m</sup>) และระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา ที่ R<sup>2</sup>=0.527 แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในกลุ่ม age-matched control นอกจากนี้ในส่วนของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันในแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 คณะผู้วิจัยพบว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ C<sup>m</sup>C<sup>u</sup> มีความสัมพันธ์เชิงลบระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ที่ R<sup>2</sup>=0.580 และพบว่าระดับเมธิเลชันในรูปแบบ hypomethylation (C<sup>u</sup>C<sup>u</sup>) ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในกลุ่มออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ที่ R<sup>2</sup>=0.721 แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในกลุ่ม age-matched control ดังแสดงใน ภาพที่ 20 นอกจากนี้ยังพบว่าการเมธิเลชันของ LINE-1 ทั้งในรูปแบบโดยรวมและแยกแต่ละรูปแบบ ไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม

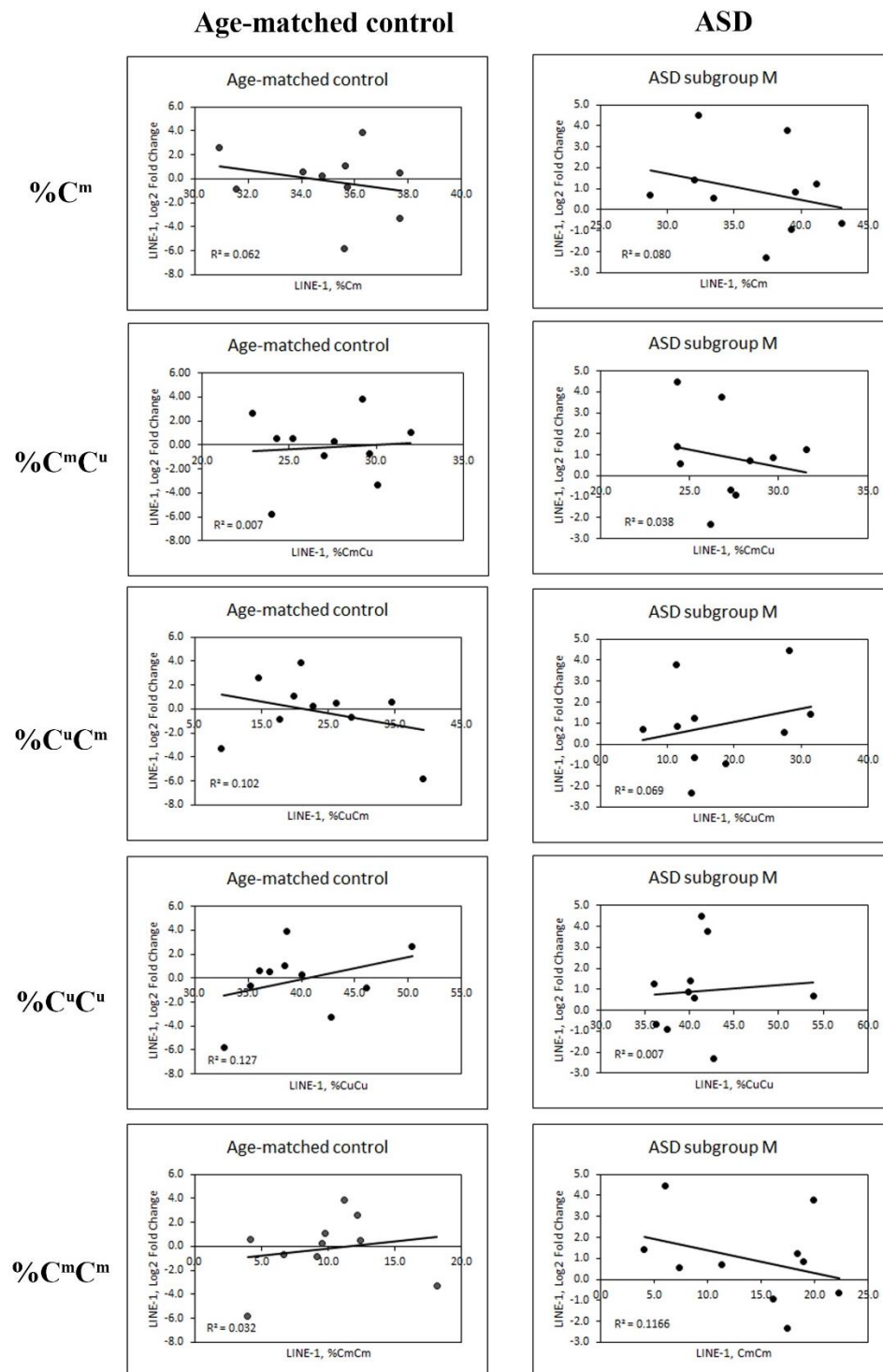
กลุ่ม M หรือ mild autism รวมทั้งในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่ม S หรือกลุ่ม savant skills ด้วย ดังแสดงใน ภาพที่ 21 และ 22 ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์นั้นแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงการเมธิเลชันของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิสซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีการบกพร่องทางการใช้ภาษานี้ มีผลต่อการแสดงออกหรือการ retrotransposition ของ LINE-1 ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่ม savant skills และ mild autism นั้น อาจจะมีกลไกอื่น ๆ ที่นอกเหนือไปจากกลไกการเมธิเลชันในการควบคุมการแสดงออกของ LINE-1

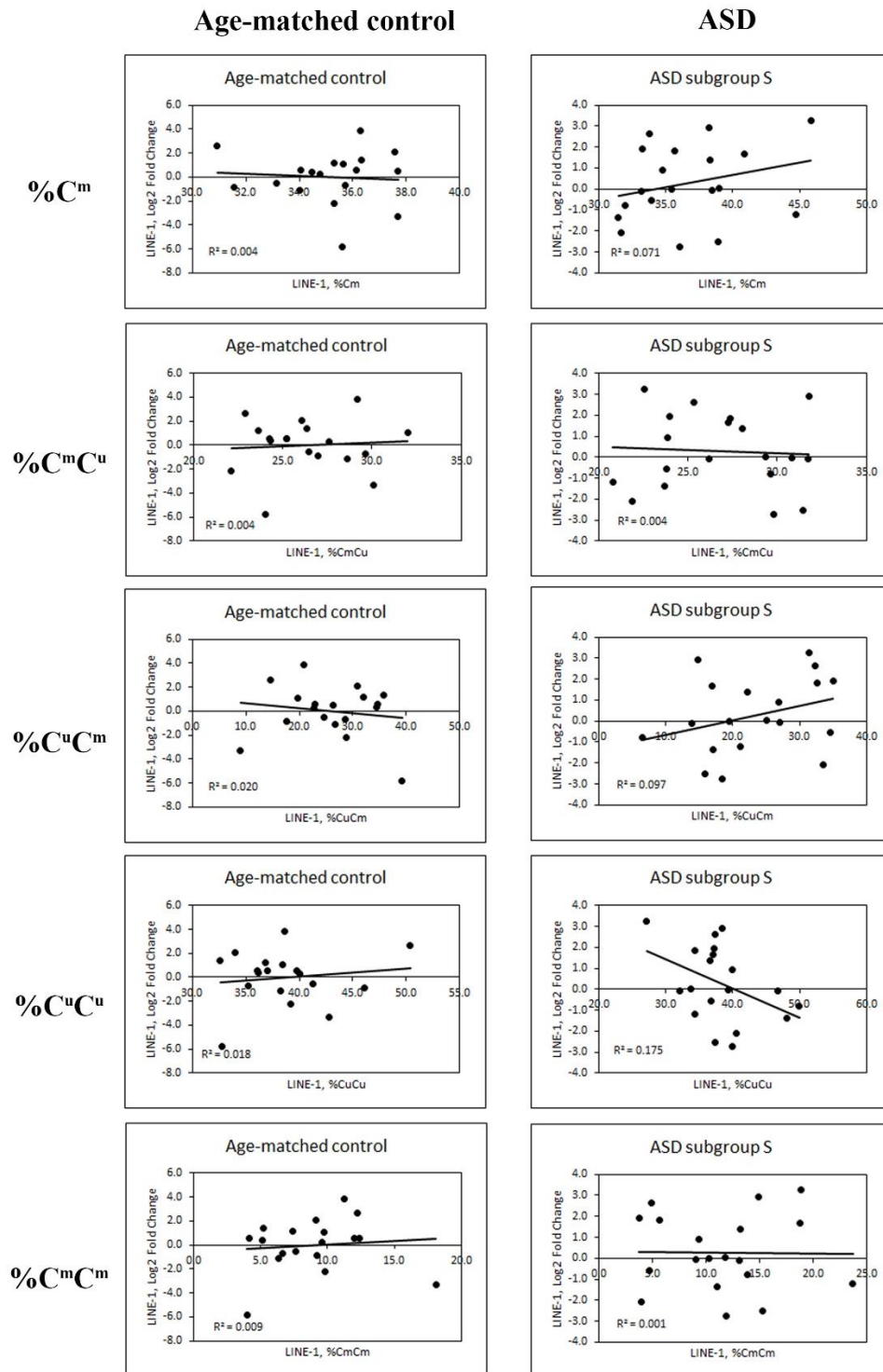




ภาพที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่ม language impairment โดยแกน X แสดงถึง ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และแกน Y แสดงถึง Log<sub>2</sub> fold change ของระดับการแสดงออกของ LINE-1



ภาพที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม M หรือ mild autism โดยแกน X แสดงถึง ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และแกน Y แสดงถึง  $\text{Log}_2$  fold change ของระดับการแสดงออกของ LINE-1



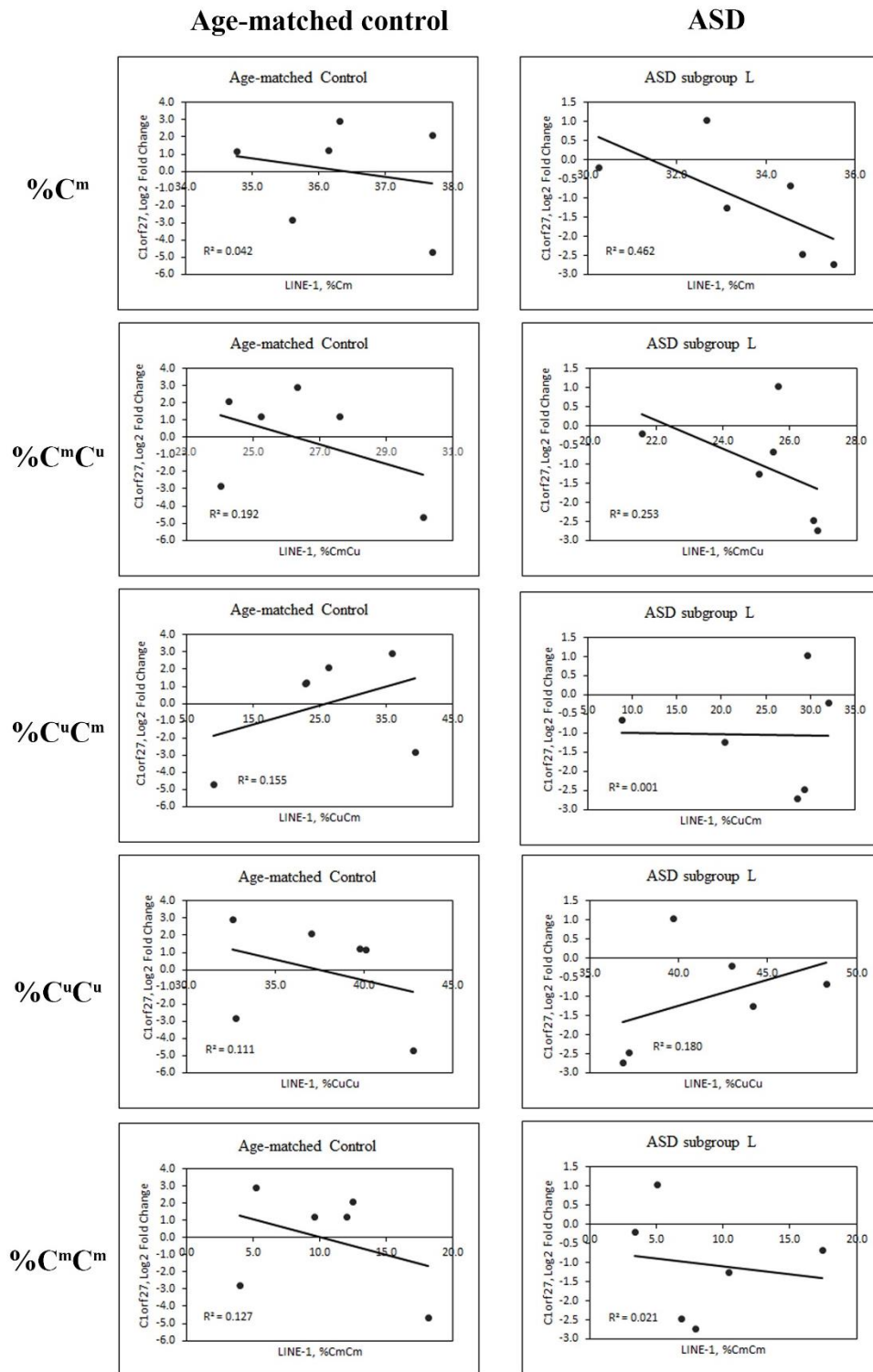
ภาพที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิลเลชันแต่ละรูปแบบและระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม S หรือ savant skills โดยแกน X แสดงถึง ระดับเมธิลเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และแกน Y แสดงถึง Log<sub>2</sub> fold change ของระดับการแสดงออกของ LINE-1

#### 4.9.ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างระดับเมธิเลชันและระดับการแสดงออกของยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติ (C1orf27 และ ARMC8)

เพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และระดับการแสดงออกของยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในอูเทอริสเปกตรัมกลุ่ม L ที่ได้คัดเลือกมาจากการศึกษา microarray ซึ่งได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการเกิดเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบต่าง ๆ และ  $\text{Log}_2$  fold change ของระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าว โดยทำการศึกษาในกลุ่มอูเทอริสเปกตรัมกลุ่ม L เทียบกับกลุ่ม age-matched control ที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน

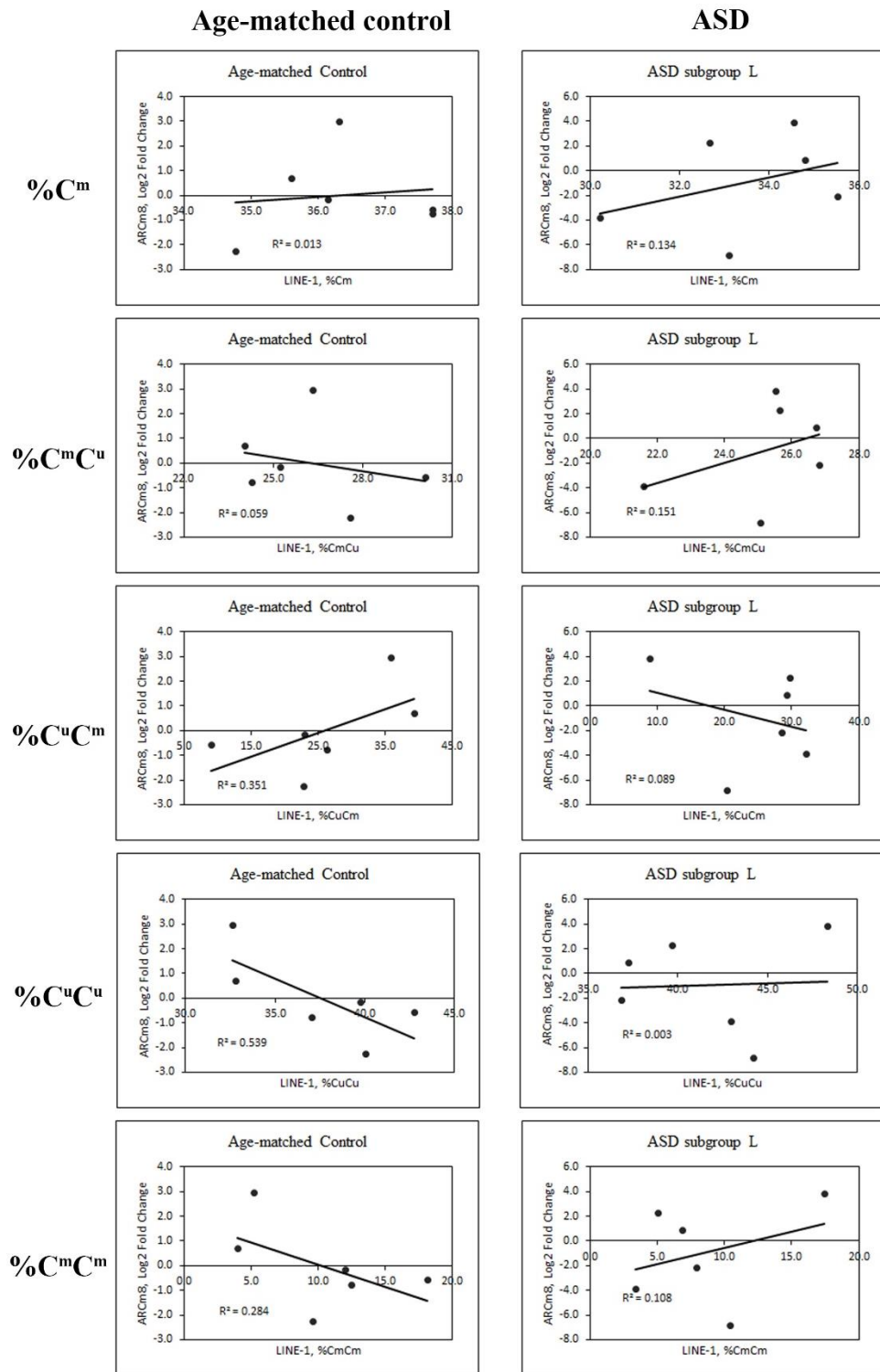
โดยจากผลการวิเคราะห์พบว่า ระดับเมธิเลชันรวม ( $\%C^m$ ) ของ LINE-1 ค่อนข้างมีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน C1orf27 ในกลุ่มอูเทอริสเปกตรัมกลุ่ม L ในเชิงลบที่  $R^2=0.462$  โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในกลุ่ม age-matched control และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันในรูปแบบอื่น ๆ ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 กับระดับการแสดงออกของยีน C1orf27 ดังแสดงใน **ภาพที่ 23** และในส่วนของการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน ARMC8 นั้นพบว่าระดับ hypomethylation ( $\%C^u$ ) ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการแสดงออกของยีน ARMC8 ที่  $R^2=0.539$  ในกลุ่ม age-matched control เท่านั้น โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในผู้ป่วยอูเทอริสเปกตรัมกลุ่ม L รวมถึงไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันในรูปแบบอื่น ๆ ของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 กับระดับการแสดงออกของยีน ARMC8 ดังแสดงใน **ภาพที่ 24** ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์นี้แสดงให้เห็นว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีความผิดปกติในผู้ป่วยอูเทอริสเปกตรัมและมี LINE-1 แทรกตัวอยู่





ภาพที่ 23 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน C1orf27

โดยแกน X แสดงถึง ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และแกน Y แสดงถึง Log<sub>2</sub> fold change ของระดับการแสดงออกของ C1orf27

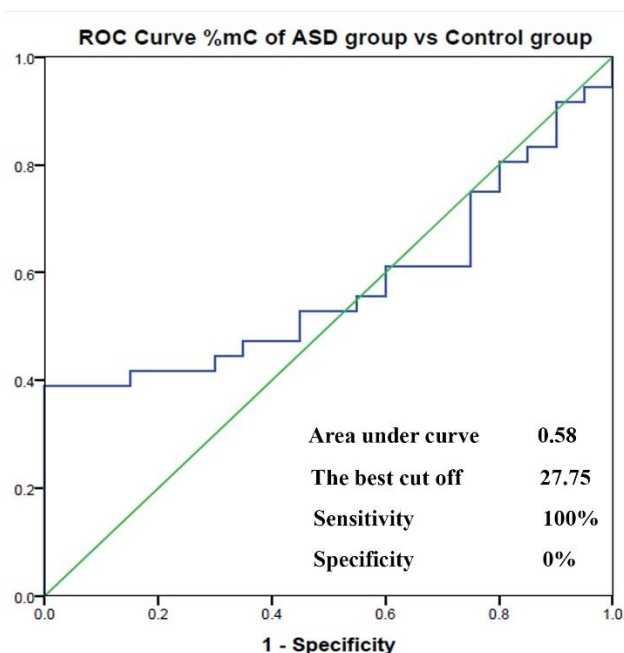


ภาพที่ 24 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันแต่ละรูปแบบของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และระดับการแสดงออกของรีโทรทรานสโพซอน ARMC8

โดยแกน X แสดงถึง ระดับเมธิเลชันของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 และแกน Y แสดงถึง Log<sub>2</sub> fold change ของระดับการแสดงออกของ ARMC8

#### 4.10. ผลการวิเคราะห์ Receiver-Operating Characteristic (ROC) curve

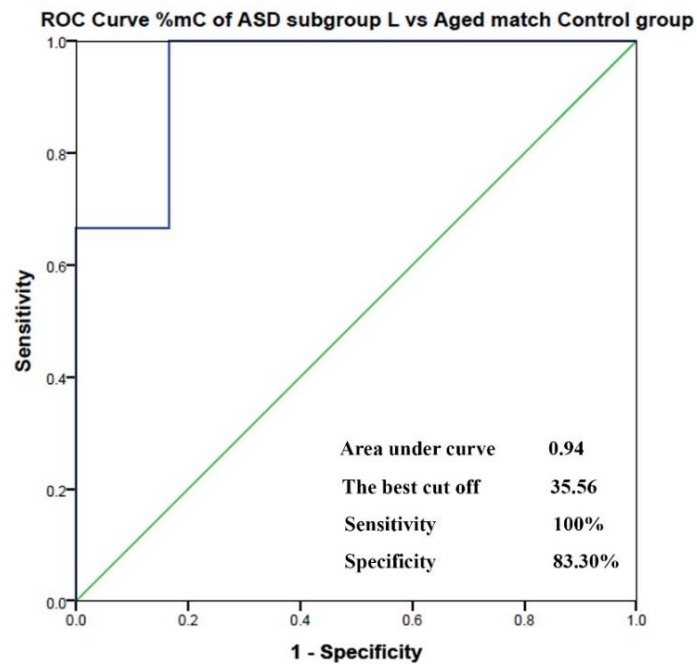
การวิเคราะห์ ROC curve ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics เพื่อประเมินความสามารถในการเป็นเครื่องมือวินิจฉัยของระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในการจำแนกระหว่างผู้ที่ เป็นโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมออกจากคนปกติ โดยเครื่องมือการวินิจฉัยที่และมีประสิทธิภาพนั้น ควรจะมี sensitivity และ specificity ที่ค่อนข้างสูง โดยที่ sensitivity คือ ความไวในการจำแนกผู้ป่วยว่าเป็น โรค และ specificity คือ ความจำเพาะ โดยผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นอหิวาต์ซิมสเปกตรัม นั้นมี โอกาสที่จะเป็นโรครจริง ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผล ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 (%C<sup>m</sup>) ของกลุ่มผู้ป่วยอหิวาต์-ซิมสเปกตรัม โดยรวมและกลุ่มคนปกติ กับผล ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 (%C<sup>m</sup>) ของผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มมีความบกพร่องทางการใช้ภาษาและกลุ่ม age-matched control ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าในจุด cut-off ที่ทำให้เครื่องมือการวินิจฉัยมี sensitivity ในการจำแนกผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมออกจากคนปกติมากที่สุด หรือที่ sensitivity 100% นั้น เครื่องมือการวินิจฉัยนี้ก็กลับมีความจำเพาะต่อโรคหรือ specificity 0% ดังแสดงใน **ภาพที่ 25** ซึ่ง หมายความว่าหากใช้ระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 (%C<sup>m</sup>) เป็นเครื่องมือ จำแนกผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมโดยรวมออกจากกลุ่มคนปกติ ผลการจำแนกจะทำให้มีอัตราส่วนของผู้ ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมสูง แต่ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคอหิวาต์ซิม สเปกตรัมนั้น แทบไม่มีโอกาสที่จะเป็นโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมจริงเลย ซึ่งเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงจุด cut-off มาเป็นจุดที่มีค่า specificity สูงขึ้น ค่า sensitivity ก็กลับต่ำลงมาก ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทร-ทรานสโพซอน LINE-1 (%C<sup>m</sup>) มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอและไม่ เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยจำแนกผู้ป่วยอหิวาต์ซิมสเปกตรัมโดยออกจากคนปกติ



ภาพที่ 25 ผลการวิเคราะห์ ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ของกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมและกลุ่มคนปกติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics

ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ของกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมและกลุ่มคนปกติ โดยมี area under the curve (AUC): 0.58, 95% confidence interval: 0.43-0.72 และ the best cut off value ที่ 27.75 ซึ่งมี sensitivity มากถึง 100% แต่กลับมี specificity เพียง 0%

แต่เมื่อทำการประเมินประสิทธิภาพของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 (%C<sup>m</sup>) ในการจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาออกจากกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน คณะผู้วิจัยพบว่าที่จุด cut-off ที่ 35.56 สามารถทำให้ระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 (%C<sup>m</sup>) มีประสิทธิภาพในการจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ออกจากกลุ่มควบคุมที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากันได้ดีที่สุด โดยทำให้เกิด sensitivity 100% และ specificity 83.30% ดังแสดงใน ภาพที่ 26 ซึ่งอาจสรุปได้ว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 (%C<sup>m</sup>) มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีความสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L ซึ่งมีความผิดปกติทางการใช้ภาษาและกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากันได้ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษานี้วิเคราะห์ด้วยจำนวน samples ที่น้อย ผลที่ได้จึงเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งการจะนำระดับเมธิเลชันของ LINE-1 มาเป็นเครื่องมือจำแนกผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมนี้ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต



ภาพที่ 26 ผลการวิเคราะห์ ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาและกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากันด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics

ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ ROC curve ของระดับเมธิเลชันโดยรวมของรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 ของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L เทียบกับกลุ่ม age-matched control โดยมี area under the curve (AUC): 0.94, 95% confidence interval: 0.81-1.00 และ the best cut off value ที่ 35.56 ซึ่งมี sensitivity 100% และ specificity 83.30%

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

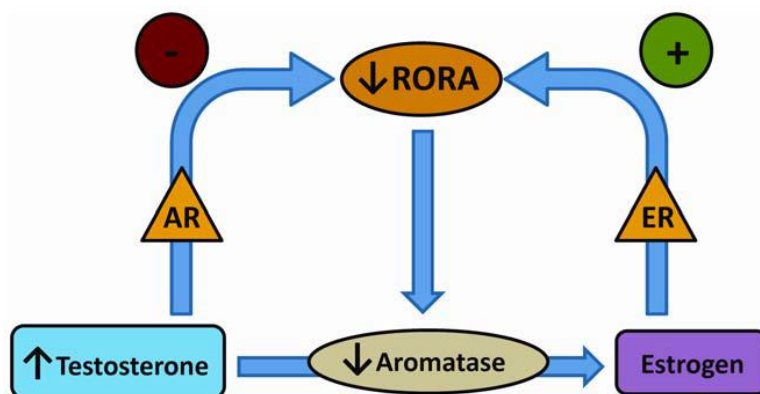
DNA methylation เป็นกลไกสำคัญใน epigenetic modifications ซึ่งใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนต่าง ๆ รวมไปถึง LINE-1 อีกทั้งยังมีความสำคัญกับกระบวนการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง การเกิด DNA methylation นั้น นอกจากจะสามารถถูกควบคุมจากกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์แล้ว ยังอาจถูกควบคุมหรือเหนี่ยวนำจากปัจจัยภายนอกทางสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อายุ การดำเนินชีวิต อาหาร และการได้รับสารเคมี เป็นต้น ยกตัวอย่างจากกรณีการได้รับสารเคมีมีการศึกษาผลกระทบจากการได้รับสารตะกั่วต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ genomic DNA methylation โดยทำการวิเคราะห์ระดับของสารตะกั่วในกระดูกของมารดาในระยะก่อนคลอดบุตรเปรียบเทียบกับระดับ DNA methylation ของ LINE-1 ในเลือดจากสายสะดือ ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pyrosequencing ซึ่งพบว่าระดับของสารตะกั่วในกระดูกของแม่มีความสัมพันธ์เชิงลบ หรือแปรผกผันกับระดับ genomic DNA methylation ของ LINE-1 ในเลือดจากสายสะดือ (Pilsner et al., 2009) ดังนั้นความผิดปกติหรือการเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation ในจีโนมอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกและการ retrotransposition ของ LINE-1 ทำให้ไปแทรกตัวในบริเวณต่าง ๆ ของจีโนม ซึ่งอาจรวมไปถึงในบริเวณที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง และอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาทและสมองได้ เช่น โรคจิตเภท (schizophrenia) (Coufal et al., 2009) และโรค Rett syndrome (Muotri et al., 2010) โดยหลักฐานที่สนับสนุนว่าการเกิดความผิดปกติของการ retrotransposition ของ LINE-1 อาจมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของระบบประสาทและสมองได้ คือ การค้นพบว่าระดับการ retrotransposition ของ LINE-1 ที่มีมากขึ้นใน neural progenitor cells, neurons และ glial cells ในระหว่างที่มีการพัฒนาหรือสร้างเซลล์ประสาท อาจทำให้เกิด DNA double-strand breaks ซึ่งจะส่งผลต่อเสถียรภาพของจีโนม (genome instability) และทำให้เกิด DNA damage เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ Open Reading Frame 2 (ORF2) ซึ่ง encodes ส่วนของ endonuclease proteins ที่สำคัญต่อการเข้าแทรกตัวในจีโนมของ LINE-1 โดยทำหน้าที่ในการตัดสาย DNA ของ host เพื่อทำการเข้าแทรกตัว และยังสามารถส่งผลต่อการเกิด copy number variations (CNVs) ของเซลล์ประสาทได้อีกด้วย (Aporntewan & Mutirangura, 2011; Hu et al., 2009; Kitkumthorn et al., 2012)

ในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้พบรายชื่อยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมจากหลายการศึกษา ซึ่งยีนเหล่านั้นมีบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและเครือข่ายควบคุมยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของ embryo และโรคออทิซึมสเปกตรัม รวมไปถึงมีความเกี่ยวข้องกับโรคที่เคยมีรายงานว่าพบเกิดขึ้นร่วมกับโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วย ในด้านการวิเคราะห์เครือข่ายควบคุมยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัมที่น่าสนใจ เช่น estrogen receptor signaling, axonal guidance signaling และ androgen signaling เป็นต้น โดยในส่วนของ estrogen receptor signaling เอสโตรเจนเป็นหนึ่งในฮอร์โมนเพศที่มีบทบาทสำคัญไม่เพียงแต่ในระบบร่างกาย แต่ยังมีผลต่อระบบประสาทและสมองด้วย เอสโตรเจนทำงานผ่านทางตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors) โดย estrogen receptors ตัวที่สำคัญ ได้แก่ estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) และ estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) (Mueller & Korach, 2001) ตัว ER $\alpha$  มีผลต่อระบบการขนส่งสารสื่อประสาท (neurotransmitter) และเป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติของระบบประสาท (neuropsychiatric disorders) ได้ด้วย (Herrington et al., 2002) ในส่วนของ ER $\beta$  เป็น estrogen receptor ที่พบเป็นส่วนใหญ่และเป็นตัวหลักในสมอง และยังพบว่ามียีนที่พบหน้าที่ในการเป็นสื่อกลางของ estrogen ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้ ซึ่งเป็นหนึ่งในภาวะที่บกพร่องของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม (Bodo & Rissman, 2006) นอกจากนี้ Amanda Crider และคณะ ได้ทำการศึกษากลไกการควบคุมของ ER $\beta$  ในสมองส่วน middle frontal gyrus (MFG) ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม แล้วพบว่าอาจจะมีการบกพร่องของ ER $\beta$  signaling network ในสมองส่วน middle frontal gyrus (MFG) ของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม (Crider, Thakkar, Ahmed, & Pillai, 2014) จากการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า estrogen receptor signaling นั้น มีความสำคัญต่อการดำรงระบบประสาทและสมองให้อยู่ในสภาวะปกติ หากเกิดความบกพร่องหรือเสียหายกับ estrogen receptor signaling ก็อาจจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทและสมองที่มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ ในส่วนของ axonal guidance signaling โดยปกติ axon-guidance proteins จะมีบทบาทความสำคัญในกระบวนการเจริญของ axon และการเชื่อมต่อเซลล์ประสาท (neuronal connections) ระหว่างที่มีการพัฒนาของสมอง ดังนั้นหากเกิดความผิดปกติขึ้นกับ axon-guidance proteins ระหว่างที่มีการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง ก็อาจจะชักนำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาท และอาจส่งผลให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทได้ (neurological disorders) (Van Battum, Brignani, & Pasterkamp, 2015) ตัวรับของ axon-guidance proteins หรือ axon-guidance receptors จะแสดงออกมาในขณะที่มีการเจริญของเซลล์ประสาท โดยการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า axon-guidance receptors บางตัว ได้แก่ roundabout guidance receptor 2 (ROBO2) และ plexin A4 (PLXNA4) มีระดับการแสดงออก

และระดับโปรตีนที่ลดลงในสมองของผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัม (Suda et al., 2011) และการสูญเสียการทำงานของ receptors เหล่านี้ ส่งผลต่อสารสื่อประสาทบางตัว นอกจากนี้การรบกวน axon-guidance receptors activation อาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ corpus callosum ซึ่งเป็นมัดของเส้นประสาทเชื่อมระหว่างสมองซีกซ้ายและซีกขวา มีหน้าที่เกี่ยวกับการคิดแก้ปัญหา และความคิดสร้างสรรค์ และยังส่งผลให้เกิดการล้มเหลวของ neuronal projection ซึ่งหากเกิดใน ระยะที่มีการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง ก็อาจก่อให้เกิดโรคทางระบบประสาทและสมองได้ (Bagri et al., 2002) นอกจากนี้ในส่วนของ androgen signaling ซึ่งแอนโดรเจน (androgen) เป็น กลุ่มของฮอร์โมนเพศชาย ซึ่งหนึ่งในฮอร์โมนเพศชายที่สำคัญ ได้แก่ testosterone โดยมีการศึกษา ของ Sarachana และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ซึ่งพบว่า testosterone มีความเกี่ยวข้องในการควบคุม การแสดงออกของ RORA ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญกับการพัฒนาสมองส่วน cerebellum และการ projection ของ neurons เป็นต้น อีกทั้งยังพบว่า RORA มีการ expression ที่ลดลงในสมองส่วน cerebellum ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับผลที่วิเคราะห์ได้จากสมองของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม โดยกลไกการควบคุมนี้เริ่มจากการที่ RORA เป็นยีนที่ควบคุม การ expression ของ aromatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการเปลี่ยน testosterone เป็น estrogen ซึ่ง testosterone จะควบคุมการ expression ของ RORA ในลักษณะ negative ผ่านทาง androgen receptor (AR) และ estrogen จะควบคุมการ expression ของ RORA ในลักษณะ positive ผ่าน ทาง estrogen receptor (ER) ดังภาพที่ 27 และจากการที่มีการลดลงของ RORA expression ใน สมองและเลือดของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม จะส่งผลให้เกิดการลดลงของ aromatase expression เช่นกัน ซึ่งเมื่อ aromatase น้อยลง ก็ส่งผลต่อการเปลี่ยน testosterone ไปเป็น estrogen โดยทำ ให้ testosterone สามารถเปลี่ยนไปเป็น estrogen ได้น้อยลง จึงเกิดการสะสมของ testosterone ที่มากขึ้น ซึ่ง testosterone ที่มากขึ้นนี้จะไปควบคุม RORA expression ในเชิง negative คือยิ่ง testosterone มากก็ยิ่งไปลด RORA expression ในขณะเดียวกัน estrogen ที่มีน้อยก็ไม่สามารถไป เพิ่ม RORA expression ให้เป็นปกติได้ ซึ่งเมื่อ RORA expression ผิดปกติไป ก็อาจส่งผลต่อการ พัฒนาของระบบประสาทและสมอง รวมไปถึงอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ neuron projections ซึ่งล้วนแต่เป็นความผิดปกติที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม (Sarachana, Xu, Wu, & Hu, 2011) เมื่อทำการเชื่อมโยงความผิดปกติจาก estrogen receptor signaling กับความผิดปกติของ androgen signaling จะพบว่า การเกิดความผิดปกติที่ ER ก็สามารถ ส่งผลต่อการควบคุม RORA expression ของ estrogen ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจากการอภิปราย จะ เห็นว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ biological functions และ biological pathways ของยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมใน การศึกษานี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาข้างต้น โดยยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกตินี้



อาจจะส่งผลต่อ gene regulatory networks ที่มีความเกี่ยวข้องกับยีนนั้น ๆ ทำให้หน้าที่ทางชีวภาพนั้นผิดปกติตามไปด้วย ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุหรือส่งผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในส่วนของกลไกการควบคุมยีนที่เกิดความผิดปกตินี้เพิ่มเติมต่อไป



ภาพที่ 27 กลไกการควบคุม RORA expression โดยฮอร์โมนเพศ

Testosterone เป็น androgen ชนิดหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุม RORA expression ผ่านทาง androgen receptor (AR) โดยเมื่อมี testosterone สูงขึ้น จะไปทำการยับยั้ง RORA expression ส่งผลให้ RORA expression น้อยลง และทำให้ aromatase expression น้อยลงตามไปด้วย ทำให้ aromatase ไม่เพียงพอในการเปลี่ยน testosterone ให้เป็น estrogen จึงเกิดการเพิ่มขึ้นสะสมของ testosterone นอกจากนี้ estrogen ที่มีน้อยก็ไม่สามารถไปเพิ่ม RORA expression ให้กลับสู่ภาวะปกติได้ (Sarachana et al., 2011)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chulalongkorn University

ในส่วนของการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันที่ LINE-1 promoter ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวม พบว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^mC^m$  มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ LINE-1 ในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมนี้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ผลของระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของ LINE-1 นี้ร่วมกันแสดงให้เห็นว่า แม้ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^mC^m$  จะเปลี่ยนแปลงไป แต่ก็ไม่ได้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ LINE-1 เลย จึงอาจสรุปได้ว่าการเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^mC^m$  นี้ อาจจะไม่มียผลต่อการควบคุมการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวม จากนั้นเมื่อคณะผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มย่อย ที่ได้รับการแบ่งกลุ่มด้วยคะแนน ADI-R พบว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 มีการ

เปลี่ยนแปลงไปในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมแต่คน เมื่อเทียบกับคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรคที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน และรูปแบบของการเกิดเมธิเลชันในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมมีลักษณะที่จำเพาะสำหรับบางกลุ่ม ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดการแสดงออกในรูปแบบที่จำเพาะกับแต่ละกลุ่ม และอาจทำให้สะท้อนออกมาทางพยาธิสภาพ ลักษณะอาการทางคลินิกหรือความรุนแรงที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะกลุ่มที่มีปัญหาความบกพร่องทางการใช้ภาษา (language impairment) และกลุ่มที่มีทักษะและความสามารถทางสติปัญญา (savant skills) ซึ่งพบว่ามีระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ที่เปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ LINE-1 คณะผู้วิจัยพบการแสดงออกของ LINE-1 ที่ผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญในผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับเมธิเลชันของ LINE-1 กับการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มย่อย เทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน โดยพบว่าระดับการแสดงออกของ LINE-1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L หรือกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษานั้น มีการแปรผกผันหรือมีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^m$  และ  $C^mC^u$  และแปรผันตรงหรือมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ  $C^u$  โดยจากการที่การแสดงออกของ LINE-1 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^m$  และ  $C^mC^u$  ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันและการแสดงออกของ LINE-1 ทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่านอกจากการเมธิเลชันของ LINE-1 แล้ว อาจมีกลไกอื่นที่มีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของ LINE-1 ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ด้วย ส่วนของการแสดงออกของ LINE-1 ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^u$  โดยที่  $C^u$  หรือ hypomethylation คือการที่เบสไซโตซีนที่อยู่บริเวณ CpG dinucleotides ที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่งนั้นไม่ถูกเติมหมู่เมธิลเลย ดังนั้นในกรณีที่การแสดงออกของ LINE-1 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ  $C^u$  จึงหมายความว่า เมื่อ LINE-1 promoter ไม่มีการเกิดดีเอ็นเอเมธิเลชัน การแสดงออกหรือการ expression ของ LINE-1 นั้นก็จะมียิ่งขึ้น เมื่อมีการ expression ของ LINE-1 มากขึ้น ก็อาจส่งผลให้เกิดการ retrotransposition ของ LINE-1 ที่มากขึ้นตามไปด้วย โดยการ retrotransposition ของ LINE-1 ที่มากขึ้นนี้ ก็อาจไปแทรกยังส่วนต่าง ๆ ของจีโนมมนุษย์ รวมทั้งยีนต่าง ๆ ที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง และอาจจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือพยาธิสภาพต่าง ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ ดังเช่นในการศึกษาของ Muotri และคณะในปี ค.ศ. 2010 ที่พบว่ามีการ retrotransposition ของ LINE-1 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ประสาทของสมองของหนูทดลองที่ขาดโปรตีน methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) และมีพฤติกรรมคล้ายออทิซึมสเปกตรัม มากกว่าในหนูปกติ ซึ่ง MeCP2 เป็นโปรตีนที่ควบคุมปฏิกิริยา methylation บนจีโนม (Muotri et al., 2010)

และที่น่าสนใจก็คือจากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของ LINE-1 กับระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ  $C^mC^u$  ซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงลบและ  $C^uC^u$  ซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงบวก ดังภาพที่ 19 ทำให้เกิดข้อสังเกตว่าการเกิดเมธิเลชันที่เบสไซโตซีนที่อยู่ในตำแหน่งแรกของ CpG dinucleotides ที่ทำการศึกษานั้น อาจมีความสำคัญบางอย่างต่อการควบคุมการแสดงออกของ LINE-1 ดังจะเห็นได้จากลักษณะความสัมพันธ์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเบสไซโตซีนที่ตำแหน่งดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงของการถูกเติมหมู่เมธิล ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ LINE-1 กับระดับเมธิเลชันของ LINE-1 แสดงให้เห็นว่าไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง และกลุ่มที่มีความสามารถทางสติปัญญา จึงอาจกล่าวได้ว่าระดับการเมธิเลชันของ LINE-1 นั้น อาจจะไม่ได้ออกมาควบคุมการแสดงออกหรือการ expression ของ LINE-1 ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มนี้

คณะผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกที่ผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งพบว่ายีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่นั้น มีการแสดงออกที่ผิดปกติไปในกลุ่มผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมที่มีความบกพร่องทางด้านการใช้ภาษาด้วยเช่นกัน ซึ่งในบรรดาอื่นเหล่านั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกยีน 2 ยีนได้แก่ C1orf27 และ ARMC8 มาทำการตรวจสอบและยืนยันทิศทางการแสดงออกของยีน เนื่องจากการศึกษาพบว่า ARMC8 มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immune system) ซึ่งมีการศึกษาพบว่าในเด็กที่มีอาการออทิซึมสเปกตรัมบางคนนั้น พบว่ามีภาวะแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าในเด็กปกติ เช่น หืดหอบ (Asthma) (M. H. Chen et al., 2017), แพ้อาหาร (food allergy) (Chaidez, Hansen, & Hertz-Picciotto, 2014) และ โรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ (rhinitis) (M. H. Chen et al., 2017) เป็นต้น นอกจากนี้ ARMC8 ยังเป็นยีนที่พบที่มีการ expression ที่ค่อนข้างสูงในสมอง โดยเฉพาะสมองส่วน cerebellum และ cerebral cortex (จากฐานข้อมูล THE HUMAN PROTEIN ATLAS, <https://www.proteinatlas.org>) (Uhlen et al., 2015) อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ ARMC8 ในสมองอาจจะยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าจากการที่ ARMC8 มีการ expression สูงใน cerebellum และ cerebral cortex ซึ่งเป็นบริเวณที่เคยมีรายงานว่าพบความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัม (Ha, Sohn, Kim, Sim, & Cheon, 2015; Hampson & Blatt, 2015) ดังนั้น ARMC8 อาจจะมีหน้าที่สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาทและสมอง ในส่วนของ C1orf27 ก็เช่นเดียวกัน โดยมีการศึกษาว่า C1orf27 เป็น trafficking protein ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ G- protein coupled receptors ของ olfactory receptors (Lehman, Lee, & Komives, 2005; Spehr & Munger, 2009) ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมนั้นมีการทำงานที่ปกติของ olfactory bulbs ทำให้ความสามารถในการรับกลิ่นและรสเปลี่ยนแปลงไปจากคนปกติ (Ashwin et al., 2014) ถึงแม้ว่าจะหน้าที่ของ C1orf27 ในสมองอาจจะยังไม่เป็นที่

ทราบแน่ชัด แต่ก็พบว่า C1orf27 มีการ expression สูงในสมอง โดยเฉพาะที่ cerebral cortex (จากฐานข้อมูล THE HUMAN PROTEIN ATLAS, <https://www.proteinatlas.org>) (Uhlen et al., 2015) ซึ่งเป็นส่วนที่เคยมีรายงานว่ามีความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมเช่นเดียวกัน (Ha et al., 2015) นอกจากนี้ทั้ง C1orf27 และ ARMC8 ยังเป็นยีนที่พบความผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมและอาจเป็นยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่ ซึ่งมีการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไปจากการวิเคราะห์ด้วย CU-DREAMx และ SAM ด้วย โดยจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ พบว่า ระดับการแสดงออกของ C1orf27 มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับการเมธิเลชันโดยรวม ( $C^m$ ) ของ LINE-1 ในผู้ที่ เป็นออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรคที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ ARMC8 กลับมีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับการเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ hypomethylation ( $C^u$ ) ในกลุ่มคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรค โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในผู้ที่ เป็นออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา จากการศึกษาความสัมพันธ์นี้อาจกล่าวได้ว่า ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมและมี LINE-1 แทรกตัวอยู่ โดยระดับเมธิเลชันโดยรวมมีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของ C1orf27 ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษา ในลักษณะที่การเพิ่มขึ้นของระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 นั้นจะส่งผลให้ C1orf27 มีการแสดงออกที่ลดลง และตรงกันข้ามเมื่อระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ลดลง ก็จะส่งผลให้ C1orf27 มีการแสดงออกที่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการวิเคราะห์วิเคราะห์ความสัมพันธ์นี้ ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 และผลการแสดงออกของ C1orf27 ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ที่พบว่าระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 มีการลดลงในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม และ C1orf27 ก็มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าใน C1orf27 นั้นนอกจากการเมธิเลชันของ LINE-1 แล้วอาจจะมีกลไกการควบคุมอื่นที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของ C1orf27 ร่วมด้วย และในส่วนของ ARMC8 ที่ระดับการแสดงออกมีความสัมพันธ์เชิงลบกับการเมธิเลชันของ LINE-1 ในรูปแบบ hypomethylation หรือ  $C^u$  ในกลุ่มคนปกติ แต่กลับไม่พบความสัมพันธ์นี้กลุ่มผู้ป่วย อาจสรุปได้ว่าในคนปกติ ARMC8 อาจถูกควบคุมด้วยกลไกเมธิเลชันของ LINE-1 แต่ในผู้ที่ เป็นออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษานั้น กลไกการควบคุมนี้อาจมีการบกพร่องไป ดังนั้นจากผลการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่า กลไกการเมธิเลชันของ LINE-1 มีความเกี่ยวข้องกับออทิซึมสเปกตรัม โดยที่ความเกี่ยวข้องนี้มีรูปแบบที่แตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มย่อยของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งอาจจะชักนำไปสู่การเกิดความผิดปกติของยีนที่ LINE-1 เข้าไปแทรกตัวที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาท ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าผลกระทบนั้นมักเป็นผลกระทบในทางลบต่อผู้ที่ เป็นออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตการคัดแยกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมเพื่อการตรวจ

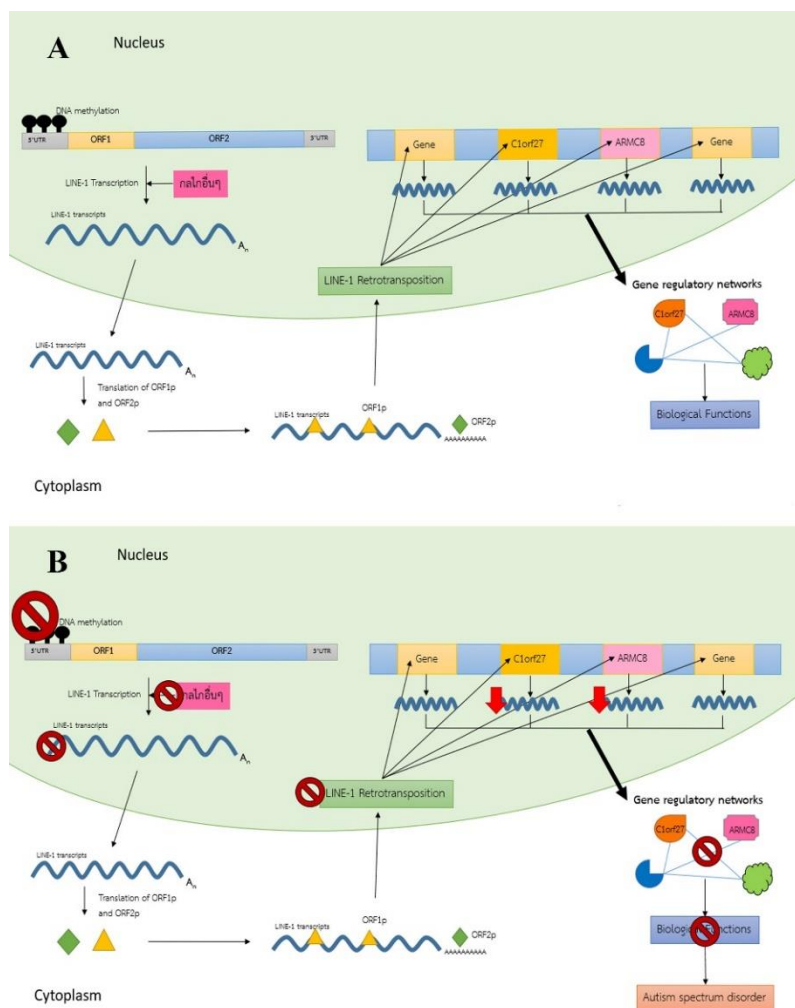
วิเคราะห์หรือการวิจัยจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลด heterogeneity เพื่อให้เราสามารถค้นพบกลไกที่จำเพาะเจาะจงต่อแต่ละกลุ่มย่อยของผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมได้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ( $C^m$ ) ในการเป็นเครื่องวินิจฉัยและจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมออกจากคนปกติด้วย ROC curve ซึ่งเมื่อทำการประเมินประสิทธิภาพของระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ( $C^m$ ) ในการเป็นเครื่องวินิจฉัยและจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยรวมออกจากกลุ่มคนปกติ คณะผู้วิจัยพบว่าระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ( $C^m$ ) ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มรวม แต่เมื่อทำการประเมินประสิทธิภาพของระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ( $C^m$ ) ในการเป็นเครื่องมือวินิจฉัยและจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความบกพร่องทางการใช้ภาษาออกจากกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากัน กลับพบว่าระดับเมธิเลชันของ LINE-1 ( $C^m$ ) มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีความสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมกลุ่มที่มีความผิดปกติทางการใช้ภาษาและกลุ่มคนปกติที่มีเพศและอายุเทียบเท่ากันได้ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการศึกษานี้วิเคราะห์ด้วยจำนวน samples ที่น้อย ผลที่ได้จึงเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งการจะนำระดับเมธิเลชันของ LINE-1 มาเป็นเครื่องมือจำแนกผู้ที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมนี้ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต ซึ่งจากผลการประเมินประสิทธิภาพของระดับเมธิเลชันโดยรวมของ LINE-1 ( $C^m$ ) ในการเป็นเครื่องวินิจฉัยและจำแนกผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมออกจากคนปกติข้างต้นนี้ ทำให้ยังสนับสนุนว่าโรคออทิซึมสเปกตรัม เป็นโรคที่มีความหลากหลายทางลักษณะทางคลินิกและความรุนแรงมาก ดังนั้นในการวินิจฉัยผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมโดยใช้ระดับเมธิเลชันของ LINE-1 สิ่งที่สำคัญคือ การแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มย่อยตามความรุนแรงหรือลักษณะทางคลินิก เพื่อที่จะให้ผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมที่มีความหลากหลายนี้ ได้รับการวินิจฉัยและการดูแลรักษาที่ถูกต้องและจำเพาะที่สุด เนื่องจากผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมแต่ละกลุ่มจะมีกลไกการควบคุมการเกิดเมธิเลชันและการแสดงออกของ LINE-1 ที่แตกต่างกันไปเฉพาะตัว

ในส่วนของเทคนิคการวิเคราะห์ คณะผู้วิจัยใช้ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) ในการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันของ LINE-1 ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นออทิซึมสเปกตรัมและคนปกติที่ไม่ได้เป็นโรค ซึ่ง COBRA มีข้อดีหลายประการ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันในบริเวณที่จำเพาะ โดยใช้ปริมาณ genomic DNA เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคมี accuracy และ specificity สูง เนื่องจาก COBRA มีการทำงานที่ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเพียงเบสไซโตซีนที่อยู่ในบริเวณ CpG ทำให้มีการตรวจวัดระดับเมธิเลชันเพียงแค่นำตำแหน่งที่มีการตัดจำเพาะเท่านั้น อย่างไรก็ตาม COBRA ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น จากการที่เทคนิคนี้มีการวัดระดับเมธิเลชันที่จำกัดแต่เพียงบริเวณ CpG ที่จำเพาะต่อ restriction enzymes ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ระดับเมธิเลชันของ

ทุกบริเวณที่มี CpG แต่ไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ที่ใช้ได้ เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษาของเรายังมีข้อจำกัดอีกบางประการซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ ประการแรกคือความแตกต่างของจำนวนเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของผู้ที่เป็นอหิวาต์ซิมสเปกตรัมแต่ละกลุ่ม ซึ่งอาจทำให้ในการวิเคราะห์แบบ pooled samples ผลการวิเคราะห์ที่ได้อาจมีแนวโน้มไปในแนวทางของกลุ่มที่มีจำนวนตัวอย่างมากกว่าได้ ประการที่สองคือ การวิจัยของเราใช้สิ่งตัวอย่างเป็นเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวซึ่งผลการวิจัยที่ได้อาจมีความแตกต่างไปจากงานวิจัยที่เลือดหรือเนื้อเยื่อสมองเป็นสิ่งตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีหลักฐานที่ยืนยันว่ารระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันในเลือดมีความสอดคล้องกับระดับดีเอ็นเอเมธิเลชันในสมอง (Masliah et al., 2013)

สำหรับภาพรวมของกลไกที่เกิดขึ้นจากการศึกษาวิจัยนี้จะแสดงไว้ใน **ภาพที่ 28** ซึ่งจากการศึกษาวิจัยทั้งหมดข้างต้น อาจกล่าวได้ว่างานวิจัยนี้อาจเหมาะสำหรับการศึกษานำร่องหรือเป็นหลักฐานทางการศึกษาสำหรับการวิจัยที่มีวัตถุประสงค์ต้องการศึกษาเกี่ยวกับความสำคัญของกลไกทางเอพิเจเนติกส์ เช่น กลไกการเกิดดีเอ็นเอเมธิเลชันต่อการเกิดโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม รวมไปถึงโรคอื่น ๆ ในมนุษย์ และการศึกษาวิจัยนี้ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการออกแบบงานวิจัยอื่นต่อไปในอนาคต โดยอาจปรับเปลี่ยนชนิดและจำนวนของสิ่งตัวอย่างเพื่อความเหมาะสมต่องานวิจัยนั้น ๆ นอกจากนี้การศึกษาของเรายังอาจมีประโยชน์ในการนำไปทำการศึกษาวิจัยต่อยอด เพื่อค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับอหิวาต์ซิมสเปกตรัม และอาจนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนเพื่อการรักษาและป้องกันการเกิดอหิวาต์ซิมสเปกตรัมในอนาคตได้อีกด้วย



### ภาพที่ 28 ภาพรวมของกลไกที่เกิดขึ้นจากการศึกษาวิจัยนี้

ภาพ (A) ในภาวะปกติ กลไก DNA methylation ร่วมกับกลไกอื่นๆทำหน้าที่ควบคุมการ transcription ของ LINE-1 ซึ่งเมื่อ LINE-1 ถูก transcribes ออกมาแล้ว จะสามารถไปแทรกตัวยังส่วนต่างๆของ human genome ได้ด้วยกระบวนการ retrotransposition ซึ่งส่วนต่าง ๆ ของ human genome นั้น อาจจะรวมไปถึงยีน C1orf27 และ ARMC8 และทำให้ส่งผลต่อกระบวนการ transcription ของยีนต่าง ๆ ที่ LINE-1 เข้าไปแทรกตัว และยีนต่างๆเหล่านั้น อาจจะถูก translation ออกมาเป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กันเป็นเครือข่าย ทำหน้าที่ควบคุม biological ต่างๆ ที่อาจเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ภาพ (B) ส่วนในเด็กออทิซึมสเปกตรัมนั้น อาจจะมีความผิดปกติของกลไกการเติมหมู่ methyl บนสาย DNA ร่วมกับความผิดปกติของกลไกการควบคุมอื่น ๆ ซึ่งทำให้ระดับของการ transcription ลดลง เมื่อเทียบกับเด็กทั่วไป และอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการ retrotransposition

ทำให้ยีนต่าง ๆ รวมไปถึง C1orf27 และ ARMC8 มีการ expression ที่ลดลง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อ gene regulatory networks ที่ 2 โปรตีนนี้มีความเกี่ยวข้องด้วย ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของหน้าที่ทางชีวภาพต่าง ๆ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุหรือส่งผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมได้

## รายการอ้างอิง

- Ahmad, S. I. (2012). *Neurodegenerative Diseases*. Springer.
- Alisch, R. S., Garcia-Perez, J. L., Muotri, A. R., Gage, F. H., & Moran, J. V. (2006). Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev*, 20(2), 210-224. doi:10.1101/gad.1380406
- 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
- Aporntewan, C., & Mutirangura, A. (2011). Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays (CU-DREAM): a physiogenomic discovery tool *Asian Biomedicine* (Vol. 5, pp. 257).
- Arendt, T., Holzer, M., & Gartner, U. (1998). Neuronal expression of cycline dependent kinase inhibitors of the INK4 family in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 105(8-9), 949-960. doi:10.1007/s007020050104
- Ashwin, C., Chapman, E., Howells, J., Rhydderch, D., Walker, I., & Baron-Cohen, S. (2014). Enhanced olfactory sensitivity in autism spectrum conditions. *Mol Autism*, 5, 53. doi:10.1186/2040-2392-5-53
- Athanikar, J. N., Badge, R. M., & Moran, J. V. (2004). A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res*, 32(13), 3846-3855. doi:10.1093/nar/gkh698
- Bagri, A., Marín, O., Plump, A. S., Mak, J., Pleasure, S. J., Rubenstein, J. L. R., & Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit Proteins Prevent Midline Crossing and Determine the Dorsoventral Position of Major Axonal Pathways in the Mammalian Forebrain. *Neuron*, 33(2), 233-248. doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00561-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00561-5)
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*, 25(1), 63-77.



- Barton, M., & Volkmar, F. (1998). How commonly are known medical conditions associated with autism? *J Autism Dev Disord*, 28(4), 273-278.
- Beck, C. R., Collier, P., Macfarlane, C., Malig, M., Kidd, J. M., Eichler, E. E., . . . Moran, J. V. (2010). LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell*, 141(7), 1159-1170. doi:10.1016/j.cell.2010.05.021
- Beck, C. R., Garcia-Perez, J. L., Badge, R. M., & Moran, J. V. (2011). LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 12, 187-215. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141802
- Ben-Porath, I., & Cedar, H. (2001). Epigenetic crosstalk. *Mol Cell*, 8(5), 933-935.
- Bienvenu, T., Carrie, A., de Roux, N., Vinet, M. C., Jonveaux, P., Couvert, P., . . . Chelly, J. (2000). MECP2 mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 9(9), 1377-1384.
- Bodo, C., & Rissman, E. F. (2006). New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology. *Front Neuroendocrinol*, 27(2), 217-232. doi:10.1016/j.yfrne.2006.02.004
- Bolton, P., Macdonald, H., Pickles, A., Rios, P., Goode, S., Crowson, M., . . . Rutter, M. (1994). A case-control family history study of autism. *J Child Psychol Psychiatry*, 35(5), 877-900.
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, 10(5), 295-304. doi:10.1038/nrg2540
- Chaidez, V., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord*, 44(5), 1117-1127. doi:10.1007/s10803-013-1973-x
- Chen, J. M., Ferec, C., & Cooper, D. N. (2007). Mechanism of Alu integration into the human genome. *Genomic Med*, 1(1-2), 9-17. doi:10.1007/s11568-007-9002-9
- Chen, M. H., Su, T. P., Chen, Y. S., Hsu, J. W., Huang, K. L., Chang, W. H., . . . Bai, Y. M. (2017). Comorbidity of Allergic and Autoimmune Diseases Among Patients With ADHD. *J Atten Disord*, 21(3), 219-227. doi:10.1177/1087054712474686
- Chow, J. C., Yen, Z., Ziesche, S. M., & Brown, C. J. (2005). Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 6, 69-92. doi:10.1146/annurev.genom.6.080604.162350

- Christensen, D. L., Bilder, D. A., Zahorodny, W., Pettygrove, S., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., . . . Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among 4-Year-Old Children in the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. *J Dev Behav Pediatr*, 37(1), 1-8. doi:10.1097/DBP.0000000000000235
- Cost, G. J., Feng, Q., Jacquier, A., & Boeke, J. D. (2002). Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *Embo j*, 21(21), 5899-5910.
- Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T., . . . Gage, F. H. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*, 460(7259), 1127-1131. doi:10.1038/nature08248
- 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
- Dahl, C., Gronbaek, K., & Guldberg, P. (2011). Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta*, 412(11-12), 831-836. doi:10.1016/j.cca.2011.02.013
- Doucet, A. J., Hulme, A. E., Sahinovic, E., Kulpa, D. A., Moldovan, J. B., Kopera, H. C., . . . Gilbert, N. (2010). Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genet*, 6(10). doi:10.1371/journal.pgen.1001150
- Ergun, S., Buschmann, C., Heukeshoven, J., Dammann, K., Schnieders, F., Lauke, H., . . . Schumann, G. G. (2004). Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem*, 279(26), 27753-27763. doi:10.1074/jbc.M312985200
- Erwin, J. A., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2014). Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat Rev Neurosci*, 15(8), 497-506. doi:10.1038/nrn3730
- Erwin, J. A., Paquola, A. C., Singer, T., Gallina, I., Novotny, M., Quayle, C., . . . Gage, F. H. (2016). L1-associated genomic regions are deleted in somatic cells of the healthy human brain. *Nat Neurosci*, 19(12), 1583-1591. doi:10.1038/nn.4388

- Farrell, P. J. (1995). Epstein-Barr virus immortalizing genes. *Trends Microbiol*, 3(3), 105-109.
- Fatemi, S. H., Stary, J. M., Halt, A. R., & Realmuto, G. R. (2001). Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *J Autism Dev Disord*, 31(6), 529-535.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., . . . Fan, G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*, 13(4), 423-430. doi:10.1038/nn.2514
- Feng, Q., Moran, J. V., Kazazian, H. H., Jr., & Boeke, J. D. (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, 87(5), 905-916.
- Ferguson-Smith, A. C. (2011). Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet*, 12(8), 565-575. doi:10.1038/nrg3032
- Fombonne, E. (2005). Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry*, 66 Suppl 10, 3-8.
- Garcia-Perez, J. L., Morell, M., Scheys, J. O., Kulpa, D. A., Morell, S., Carter, C. C., . . . Moran, J. V. (2010). Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature*, 466(7307), 769-773. doi:10.1038/nature09209
- Gibbs, V., Aldridge, F., Chandler, F., Witzlsperger, E., & Smith, K. (2012). Brief report: an exploratory study comparing diagnostic outcomes for autism spectrum disorders under DSM-IV-TR with the proposed DSM-5 revision. *J Autism Dev Disord*, 42(8), 1750-1756. doi:10.1007/s10803-012-1560-6
- Glessner, J. T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C. E., Wood, S., . . . Hakonarson, H. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*, 459(7246), 569-573. doi:10.1038/nature07953
- Gmitrowicz, A., & Kucharska, A. (1994). [Developmental disorders in the fourth edition of the American classification: diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV -- optional book)]. *Psychiatr Pol*, 28(5), 509-521.
- Goin-Kochel, R. P., Porter, A. E., Peters, S. U., Shinawi, M., Sahoo, T., & Beaudet, A. L. (2009). The MTHFR 677C-->T polymorphism and behaviors in children with

- autism: exploratory genotype-phenotype correlations. *Autism Res*, 2(2), 98-108. doi:10.1002/aur.70
- Gold, D. A., Gent, P. M., & Hamilton, B. A. (2007). ROR alpha in genetic control of cerebellum development: 50 staggering years. *Brain Res*, 1140, 19-25. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.080
- Goschnick, M. W., & Jackson, D. E. (2007). Tetraspanins-structural and signalling scaffolds that regulate platelet function. *Mini Rev Med Chem*, 7(12), 1248-1254.
- 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
- Ha, S., Sohn, I. J., Kim, N., Sim, H. J., & Cheon, K. A. (2015). Characteristics of Brains in Autism Spectrum Disorder: Structure, Function and Connectivity across the Lifespan. *Exp Neurobiol*, 24(4), 273-284. doi:10.5607/en.2015.24.4.273
- Hampson, D. R., & Blatt, G. J. (2015). Autism spectrum disorders and neuropathology of the cerebellum. *Front Neurosci*, 9, 420. doi:10.3389/fnins.2015.00420
- Han, J. S., & Boeke, J. D. (2005). LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *Bioessays*, 27(8), 775-784. doi:10.1002/bies.20257
- Herrington, D. M., Howard, T. D., Hawkins, G. A., Reboussin, D. M., Xu, J., Zheng, S. L., . . . Blecker, E. R. (2002). Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med*, 346(13), 967-974. doi:10.1056/NEJMoa012952
- Hertz-Picciotto, I., & Delwiche, L. (2009). The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology*, 20(1), 84-90. doi:10.1097/EDE.0b013e3181902d15
- Holmes, S. E., Singer, M. F., & Swergold, G. D. (1992). Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *J Biol Chem*, 267(28), 19765-19768.
- 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

- Hutnick, L. K., Golshani, P., Namihira, M., Xue, Z., Matynia, A., Yang, X. W., . . . Fan, G. (2009). DNA hypomethylation restricted to the murine forebrain induces cortical degeneration and impairs postnatal neuronal maturation. *Hum Mol Genet*, 18(15), 2875-2888. doi:10.1093/hmg/ddp222
- Januszyk, K., Li, P. W., Villareal, V., Branciforte, D., Wu, H., Xie, Y., . . . Clubb, R. T. (2007). Identification and solution structure of a highly conserved C-terminal domain within ORF1p required for retrotransposition of long interspersed nuclear element-1. *J Biol Chem*, 282(34), 24893-24904. doi:10.1074/jbc.M702023200
- Jiao, Y., Chen, R., Ke, X., Cheng, L., Chu, K., Lu, Z., & Herskovits, E. H. (2012). Single nucleotide polymorphisms predict symptom severity of autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*, 42(6), 971-983. doi:10.1007/s10803-011-1327-5
- Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 1(4), 287-299. doi:10.1038/nrd772
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., . . . Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19(2), 187-191. doi:10.1038/561
- Jurka, J. (1997). Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1872-1877.
- Kazazian, H. H., Jr., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A. F., Phillips, D. G., & Antonarakis, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, 332(6160), 164-166. doi:10.1038/332164a0
- Khazina, E., & Weichenrieder, O. (2009). Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(3), 731-736. doi:10.1073/pnas.0809964106
- Kitkumthorn, N., Keelawat, S., Rattanatanyong, P., & Mutirangura, A. (2012). LINE-1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(9), 4469-4475.
- 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
- Koufaris, C., & Sismani, C. (2015). Modulation of the genome and epigenome of individuals susceptible to autism by environmental risk factors. *Int J Mol Sci*, 16(4), 8699-8718. doi:10.3390/ijms16048699
- Kovatsi, L., Georgiou, E., Ioannou, A., Haitoglou, C., Tzimagiorgis, G., Tsoukali, H., & Kouidou, S. (2010). p16 promoter methylation in Pb<sup>2+</sup>-exposed individuals. *Clin Toxicol (Phila)*, 48(2), 124-128. doi:10.3109/15563650903567091
- Kulpa, D. A., & Moran, J. V. (2006). Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat Struct Mol Biol*, 13(7), 655-660. doi:10.1038/nsmb1107
- Kumar, R. A., KaraMohamed, S., Sudi, J., Conrad, D. F., Brune, C., Badner, J. A., . . . Christian, S. L. (2008). Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet*, 17(4), 628-638. doi:10.1093/hmg/ddm376
- Ladd-Acosta, C., Hansen, K. D., Briem, E., Fallin, M. D., Kaufmann, W. E., & Feinberg, A. P. (2014). Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Mol Psychiatry*, 19(8), 862-871. doi:10.1038/mp.2013.114
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 30(4), 363-364. doi:10.1038/ng865
- Lander, E. S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470(7333), 187-197. doi:10.1038/nature09792
- Lehman, C. W., Lee, J. D., & Komives, C. F. (2005). Ubiquitously expressed GPCR membrane-trafficking orthologs. *Genomics*, 85(3), 386-391. doi:10.1016/j.ygeno.2004.11.009
- 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

- Liu, J., Nyholt, D. R., Magnussen, P., Parano, E., Pavone, P., Geschwind, D., . . . Autism Genetic Resource Exchange, C. (2001). A genomewide screen for autism susceptibility loci. *Am J Hum Genet*, 69(2), 327-340.
- Liyanage, V. R., Jarmasz, J. S., Murugesan, N., Del Bigio, M. R., Rastegar, M., & Davie, J. R. (2014). DNA modifications: function and applications in normal and disease States. *Biology (Basel)*, 3(4), 670-723. doi:10.3390/biology3040670
- Maksakova, I. A., Mager, D. L., & Reiss, D. (2008). Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cell Mol Life Sci*, 65(21), 3329-3347. doi:10.1007/s00018-008-8494-3
- 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
- Milo, R., & Phillips, R. (2016). *Cell biology by the numbers*. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Minakami, R., Kurose, K., Etoh, K., Furuhata, Y., Hattori, M., & Sakaki, Y. (1992). Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element. *Nucleic Acids Res*, 20(12), 3139-3145.
- Mohyuddin, A., Ayub, Q., Siddiqi, S., Carvalho-Silva, D. R., Mazhar, K., Rehman, S., . . . Mehdi, S. Q. (2004). Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta*, 1670(1), 81-83.
- Mueller, S. O., & Korach, K. S. (2001). Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr Opin Pharmacol*, 1(6), 613-619.
- Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C., Deng, W., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*, 435(7044), 903-910. doi:10.1038/nature03663
- Muotri, A. R., & Gage, F. H. (2006). Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*, 441(7097), 1087-1093. doi:10.1038/nature04959

- Muotri, A. R., Marchetto, M. C., Coufal, N. G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., & Gage, F. H. (2010). L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*, 468(7322), 443-446. doi:10.1038/nature09544
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386-389. doi:10.1038/30764
- Ndlovu, M. N., Denis, H., & Fuks, F. (2011). Exposing the DNA methylome iceberg. *Trends Biochem Sci*, 36(7), 381-387. doi:10.1016/j.tibs.2011.03.002
- 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
- Pilsner, J. R., Hu, H., Ettinger, A., Sanchez, B. N., Wright, R. O., Cantonwine, D., . . . Hernandez-Avila, M. (2009). Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. *Environ Health Perspect*, 117(9), 1466-1471. doi:10.1289/ehp.0800497
- Poolsuppatit, S. (2005). Holistic Care for Thai Autism. *Journal of Mental Health of Thailand*, 13. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Pradhan, S., & Esteve, P. O. (2003). Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol*, 109(1), 6-16.
- 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
- Richardson, S. R., Morell, S., & Faulkner, G. J. (2014). L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. *Annu Rev Genet*, 48, 1-27. doi:10.1146/annurev-genet-120213-092412
- Rosenblatt, D. S. (2001). Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med*, 24(1), 56-59.



- Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2012). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 17(3), 290-314. doi:10.1038/mp.2010.136
- Saeed, A. I., Bhagabati, N. K., Braisted, J. C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E. A., . . . Quackenbush, J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol*, 411, 134-193. doi:10.1016/S0076-6879(06)11009-5
- 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
- Scriver CR, B. A., Sly WS, Valle D. . (2002). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., eds., 8th ed., McGraw-Hill, New-York, 2001, 7012 p., \$550.00). *Biochemistry (Moscow)*, 67(5), 611-612. doi:10.1023/A:1017418800320
- Selhub, J. (2002). Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging*, 6(1), 39-42.
- Speek, M. (2001). Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol*, 21(6), 1973-1985. doi:10.1128/MCB.21.6.1973-1985.2001
- Spehr, M., & Munger, S. D. (2009). Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *J Neurochem*, 109(6), 1570-1583. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06085.x
- Suda, S., Iwata, K., Shimmura, C., Kameno, Y., Anitha, A., Thanseem, I., . . . Mori, N. (2011). Decreased expression of axon-guidance receptors in the anterior cingulate cortex in autism. *Mol Autism*, 2(1), 14. doi:10.1186/2040-2392-2-14
- Swergold, G. D. (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol*, 10(12), 6718-6729.
- Thomas, C. A., Paquola, A. C., & Muotri, A. R. (2012). LINE-1 retrotransposition in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 555-573. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155822

- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., . . . Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419. doi:10.1126/science.1260419
- Van Battum, E. Y., Brignani, S., & Pasterkamp, R. J. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol*, 14(5), 532-546. doi:10.1016/S1474-4422(14)70257-1
- Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., Arking, D. E., Miller, D. T., Fossdal, R., . . . Daly, M. J. (2008). Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. *New England Journal of Medicine*, 358(7), 667-675. doi:10.1056/NEJMoa075974
- Wong, C. C., Meaburn, E. L., Ronald, A., Price, T. S., Jeffries, A. R., Schalkwyk, L. C., . . . Mill, J. (2014). Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol Psychiatry*, 19(4), 495-503. doi:10.1038/mp.2013.41
- Xu, X., Li, C., Gao, X., Xia, K., Guo, H., Li, Y., . . . Hu, R. (2017). Excessive UBE3A dosage impairs retinoic acid signaling and synaptic plasticity in autism spectrum disorders. *Cell Res*. doi:10.1038/cr.2017.132
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 757-768. doi:10.1038/nrc1452

**ภาคผนวก ก**  
**ข้อมูลจากการทดลอง**

1. ผลการวิเคราะห์หารายชื่อยีนที่มีรีโทรทรานสโพซอน LINE-1 แทรกตัวอยู่ และมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในออทิซึมสเปกตรัม ที่มีการพบซ้ำในสามหรือมากกว่าสามการศึกษา ด้วยโปรแกรม Venn diagram

Intersected studies	Number of genes	List genes
GSE25507 GSE42133 GSE6575	53	KNDC1, RUNX3, CAMTA1, APBA2, RNF7, TERF2, CRTAP, SCTR, ATP5A1, NR4A1, CACNG6, C9orf3, RNF170, LYPLA1, DDX27, PARVA, COL6A2, MAPRE3, MTUS1, GTF2F1, ATP6V1H, ARL3, AKR1C3, MLC1, DCP1A, HSPA1L, DLGAP4, RHOBTB2, IL27RA, BMP8A, NSD1, PEX26, TOX, SBF1, CD99L2, FEZ1, SP2, ICA1, MAPK8IP3, PPP2R3A, MATK, LGR6, NRP2, DHX30, TMEM44, FBLN1, ZNF444, DHRS3, SLC7A8, FMNL3, PDE11A, TTN, BRPF3
GSE15402 GSE25507 GSE42133	14	NCF4, MAPK10, FGF12, HN1, SNX7, PPP2R5E, SERPINC1, UBE2G1, GNAL, IMMP2L, COPS2, EPB41L2, PAX3, SGOL2
GSE15402 GSE18123 GSE42133	24	RBM17, RAPGEF6, PCNP, KLHL5, MYB, ATRX, SECISBP2, HIAT1, POLK, C1orf27, MKNK1, USP4, KIT, PGGT1B, WWP1, PTPRC, PDE4B, PTPLB, TP53BP2, SPTLC1, WDR1, GRIN2D, HKDC1, VPS13C
GSE18123 GSE25507 GSE42133	162	GALNT3, EP300, OSBPL8, TAOK3, RAD23B, WHSC1L1, LYZL4, PPM1A, BCL2, UPF3A, SUV420H1, NFYA, RBPMS, SVIL, ARHGAP25, MAP2K4, TSEN54, MCF2L, EIF4E, SH3BP2, WDFY3, CEP63, TNPO1, LPIN2, PLEKHB2, ZNF544, UBE2H, USP33, SYNE1, RAB22A, RHOQ, POLR2A, ITCH, CHRM3, ADNP, RFFL, TLK2, PDK3, BRD3, AAK1, ARID1A, ITGAL, SENP5, TUBGCP3, MAP3K5, STAG2, ATP11A, MYNN, ZNF540, SAMD8, MAML3, STX7, CDC42, COL4A3BP, PLAA, ZCCHC14, XPR1, PKN2, ARHGEF11, PIK3R4, KIAA0247, UBL3, UBE4B, C6orf195, PTPRO, DPP8, ANKRD12, PHF20L1, RAB11A, ACSL6, RNF125, CDC42SE2, TIMP2, WWP2, FBXL18, MAP4K4, WNK1, MTMR3, ADCY9, TMF1, ARHGAP27, PAK2, PELI2, MSH3, RAB3IP, APPBP2, TMEM33, BBS1, WDR20, CNOT6, OPA1, YPEL5, CREBBP, ITGA6, LIMS1, YES1, PARP8, BBX, CDC14B,

Intersected studies	Number of genes	List genes
		PPP3CB, GTF2H1, FLCN, MUT, AKAP12, ESCO1, PHF2, RSBN1, MPP5, SSR1, ZNF143, N4BP1, WDR48, FBXO38, UBE3A, PLEKHA5, GLB1, LACTB, TCOF1, RNF135, CEP70, TRIM23, GK, PTPN11, CMIP, DICER1, CASP8, SPTAN1, NR3C1, RAB27B, LUC7L, SH3KBP1, FCER1A, ADAM10, LAT2, GALNT7, KIAA2026, TAF4, DDX46, ILF3, ELOVL4, ETF1, DGKG, SP100, CBL, ZNF451, NIN, SRPK2, SPG21, RASSF2, JARID2, SCAMP1, ARID4A, DYRK1A, PPFIA1, TMEM30A, LAPTM5, LGALS8, THAP6, RPS6KA3, VPS13B, DCLRE1C, SPOCD1
GSE18123 GSE25507 GSE6575	74	CD44, CRNKL1, SLC8A1, GRK5, HSPD1, SEC14L1, SPTBN1, QKI, CPVL, FBXL20, CDS2, KIR2DL1, ANKH, CAPN2, SEP2, TNFSF8, RAP2A, SLC4A4, SAFB, MAP4, LPP, PAFAH1B1, DOCK8, LARS, RBM19, PIK3C2A, ANKRD11, CLMN, AATF, FASLG, KLF7, PCM1, CHD4, NFATC2, ACVR1B, RNF130, DERL1, KCNJ5, PHTF2, MIB1, NPC1, ZAK, ATRN, FGFR1, SIGLEC9, PTK2, BCAP29, MOCS1, UBR1, GFPT1, MAPK1, CPSF6, MARK2, DPP9, LCP2, EMILIN2, TAF15, PVR, RNF141, RPGRI1, CARD11, JAG1, SH3TC1, NSUN3, GOPC, PPP1R12B, PLCB1, MLLT6, STX12, APLP2, AKAP13, CCND2, NPL, HIPK1
GSE15402 GSE42133 GSE6575	8	PPP2CA, PPP2R5C, KIF13B, FCGBP, MFAP3L, CREM, COG2, PKNOX1
GSE15402 GSE18123 GSE6575	12	LMO7, GNAI1, NSUN4, TMED5, GTF3C4, PDIA3, ARL6IP6, HERC1, CCNJ, NSUN2, GLUD1, XPNPEP1
GSE15402 GSE18123 GSE25507	27	IDS, TNKS2, USP38, USP15, CHD7, STAT5B, NCOA1, TBRG1, XPO7, RFWD2, ARMC8, PCNX, SLC35A3, TRIM33, ACSL3, NKTR, EPS15, NET1, RALGPS2, SP3, ENTPD1, PHF3, ITSN2, REV3L, PCGF5, ATF6, BACH1
GSE15402 GSE25507 GSE6575	2	CD160, ITGA9
GSE15402 GSE25507 GSE42133 GSE6575	3	TRAF6, UBE2A, WDR60

Intersected studies	Number of genes	List genes
GSE18123 GSE25507 GSE42133 GSE6575	36	TM9SF4, RDH11, CREB1, TRPM3, AZIN1, DDHD1, FBXL3, HIBADH, SLC13A3, STX6, PTGER3, AP1G1, PTPRE, PLAGL1, ASPH, ZBTB16, BMPR2, DDX6, IL6ST, NFATC2IP, ST3GAL3, KPNA6, PCGF3, CDC14A, ALCAM, TNFRSF10C, PRKCH, WDR37, EXOC7, HAVCR2, LEPROT, VPS13D, HMGA2, DAB2, ZMYND11, SMARCA2
GSE18123 GSE42133 GSE6575	69	ELMO2, RTN1, LUZP1, PRDM2, TNFRSF9, NAALADL1, CD6, GLG1, EPHA4, AHNAK, ATP6V1C1, TFEC, MBD2, DUSP10, SAMHD1, MPP6, GPAM, NONO, AKAP8, GNB1, COPA, XRCC6, ABCB1, SLC43A3, PPHLN1, DBT, WDR4, LRPPRC, ATM, ARRB1, DIAPH1, KHDRBS1, RASA3, CNOT6L, NDUFS1, DHR57, FYN, LRBA, PDCD6IP, NFATC3, LRIG1, ZNF223, METAP1, SRRM1, CACNA2D2, PDE7A, SNRK, INO80, IQGAP2, CDYL, RAC1, NOM1, YY1, RBBP4, TPM4, KREMEN1, H6PD, TRRAP, AP3D1, PTPRA, USP48, EWSR1, SART3, RAB27A, NNT, NUMA1, PTGS1, CASK, PRKCA
GSE15402 GSE18123 GSE42133 GSE6575	6	PTPN2, STK24, API5, PRPF4B, KLF12, ZNF644
GSE15402 GSE18123 GSE25507 GSE42133 GSE6575	4	ING3, MBP, RUFY2, CSNK1A1
GSE15402 GSE18123 GSE25507 GSE6575	7	CHD9, MBNL2, TRIO, ITGAM, SYNCRIP, ZNF652, CNNM4

2. ตารางแสดงรายการของ canonical pathways ที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบประสาทและสมองจากการวิเคราะห์ 501 ยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมและการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไปด้วยโปรแกรม IPA

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Number of Genes	Genes
Huntington's Disease Signaling	3.98E-14	63	NCOR2, HSPA1L, FGFR1, PIK3C2A, PLCB2, POLR2A, HDAC8, PRKCQ, DNAJC5, GNG7, GNB1, PIK3CB, PIK3CD, ITPR1, PRKCH, HDAC11, EGFR, PIK3R4, ZDHHC17, IGF1, IGF1R, CLTA, CREB5, GNB5, CLTB, TGM2, FGFR2, SH3GL3, AKT3, GNB4, CREB1, GOSR1, IRS1, PIK3R1, DCTN1, TAF4, VTI1A, PIK3CA, VAMP3, TCERG1, PTPN11, SIN3A, CREBBP, NCOR1, MAPK8, PRKCI, HDAC4, CASP4, CAPN2, PLCB1, ATM, EP300, SP1, GRIN2B, PIK3CG, HSPA4, PDPK1, PRKCA, MAP2K4, MAPK1, GNG2, DNM3, CASP8
Axonal Guidance Signaling	6.31E-14	94	C9orf3, FGFR1, CDC42, NFATC2, PIK3C2A, PLCB2, PRKCQ, GNG7, TUBB1, GNB1, PRKAG2, MAP2K1, ROCK2, DPYSL5, PIK3CB, SEMA4A, BMP8A, PIK3CD, ERBB2, UNC5B, ADAM12, PRKCH, HERC2, MME, RAF1, PIK3R4, ADAM19, PTK2, IGF1, RTN4, SEMA4B, ABL1, PLXND1, PLXNA1, EPHA1, PPP3R1, GNB5, NRP1, RAP1B, PDIA3, EPHA8, SEMA4D, GNAI1, FGFR2, GSK3B, ARHGEF11, PDGFD, AKT3, ACTR2, GNB4, TUBA8, GNAO1, NRP2, ARHGEF12, PLXNC1, SEMA6D, IRS1, ADAM10, PIK3R1, SEMA4F, GNAI2, FYN, PIK3CA, PTPN11, ITGB1, ROCK1, PRKCI, NTRK2, FZD3, EPHA10, PLCB1, PAK2, ITSN1, NTN1, ATM, WNT5B, PPP3CB, NFATC1, ADAM20, ACTR3, EPHA4, RASSF5, PIK3CG, NFATC3, PRKCA, BMP1, MAP2K2, MKNK1, MAPK1, PLCL2, GNG2, EIF4E, RAC1, WNT9A

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Number of Genes	Genes
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	3.02E-09	33	CAMK2B, FGFR2, FGFR1, CREB1, PIK3C2A, PLCB2, PRKCQ, IRS1, PRKAG2, PIK3R1, PIK3CB, KCNH2, KCNQ2, PIK3CD, PIK3CA, PTPN11, GRIN2D, ITPR1, PRKCI, NTRK2, PRKCH, PLCB1, TACR1, ATM, PIK3R4, CAMK1D, GRIN2B, PIK3CG, PRKCA, MAPK1, PDIA3, PLCL2, KCNQ3
Growth Hormone Signaling	1.62E-08	26	FGFR2, FGFR1, PIK3C2A, PRKCQ, IRS1, PIK3R1, PIK3CB, STAT3, PIK3CD, PIK3CA, STAT1, PTPN11, PRKCI, PRKCH, RPS6KB1, JAK2, ATM, RPS6KA3, PIK3R4, IGF1, PIK3CG, IGF1R, PDPK1, PRKCA, MAPK1, STAT5B
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.69E-08	30	FGFR2, GSK3B, FGFR1, AKT3, PIK3C2A, IRS1, MAP2K1, PIK3R1, PIK3CB, APC, STAT3, PIK3CD, PIK3CA, PTPN11, CREBBP, FZD3, MAP3K7, TCF3, JAK2, CTNNB1, LEF1, ATM, RAF1, PIK3R4, JAK1, IL6ST, PIK3CG, BMPR2, MAP2K2, MAPK1
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.00E-07	31	FGFR2, GSK3B, FGFR1, AKT3, PIK3C2A, IRS1, MAP2K1, PIK3R1, PIK3CB, APC, BMP8A, STAT3, PIK3CD, PIK3CA, PTPN11, GATA4, FZD3, JAK2, CTNNB1, ATM, RAF1, PIK3R4, WNT5B, JAK1, IL6ST, PIK3CG, BMPR2, BMP1, MAP2K2, MAPK1, WNT9A
Neuregulin Signaling	1.35E-05	22	EGFR, PTEN, AKT3, RAF1, PRKCQ, NRG1, MAP2K1, PIK3R1, MATK, PDPK1, PRKCA, PTPN11, ITGB1, MAP2K2, ERBB2, MAPK1, PRKCI, PRKCH, STAT5B, ERBB3, RPS6KB1, PSEN1
Semaphorin Signaling in Neurons	1.66E-05	16	SEMA4D, PAK2, ARHGEF12, RHOQ, ROCK2, PTK2, DPYSL5, PLXNA1, FYN, ITGB1, NRP1, MAPK1, RHOT1, ROCK1, RAC1, FNBP1

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Number of Genes	Genes
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	1.91E-05	30	FGFR2, GSK3B, FGFR1, PDGFD, AKT3, PIK3C2A, IRS1, PIK3R1, PIK3CB, APC, BMP8A, PIK3CD, PIK3CA, PTPN11, NTRK2, FZD3, TCF3, CTNNB1, SMAD2, LEF1, ATM, PIK3R4, WNT5B, PIK3CG, BMPR2, TGFBR2, PDPK1, BMP1, ACVR1, WNT9A
Dendritic Cell Maturation	1.07E-04	34	FGFR2, FGFR1, AKT3, CREB1, PIK3C2A, PLCB2, TNFRSF1A, IRS1, PIK3R1, PIK3CB, IFNAR1, IL1RN, PIK3CD, PIK3CA, STAT1, PTPN11, IGHG1, CREBBP, MAPK8, TLR2, CD86, TRAF6, PLCB1, JAK2, CD58, ATM, PIK3R4, EP300, PIK3CG, CREB5, MAP2K4, MAPK1, PDIA3, PLCL2
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	7.08E-04	15	GSK3B, CCND2, HDAC8, ATM, NRG1, CUL1, MAX, E2F3, ABL1, ATR, SIN3A, MDM2, HDAC11, CDK6, HDAC4
Netrin Signaling	7.94E-04	11	NFATC3, RYR3, NFATC2, PPP3R1, NTN1, PRKG1, UNC5B, PPP3CB, PRKAG2, NFATC1, RAC1
Androgen Signaling	1.58E-03	21	GNAI1, GNB4, NCOA1, POLR2A, GNAO1, PRKCQ, GNG7, EP300, GNB1, PRKAG2, HSPA4, GNAI2, PRKCA, GTF2F1, GNB5, MAPK1, CREBBP, PRKCI, GNG2, PRKCH, GTF2H1
Estrogen Receptor Signaling	4.79E-03	22	NCOR2, TAF15, CTBP1, NCOA1, POLR2A, RAF1, EP300, MAP2K1, SPEN, TAF4, THRAP3, CCNC, GTF2F1, NR3C1, MAP2K2, MAPK1, CREBBP, NCOR1, TAF11, TAF1, TRRAP, GTF2H1
DNA Double-Strand Break Repair by Non-Homologous End Joining	7.59E-03	5	XRCC6, ATM, XRCC5, XRCC4, DCLRE1C



Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Number of Genes	Genes
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	0.016	10	ABL1, YWHAG, ATM, EP300, ATR, CUL1, MDM2, YWHAZ, YWHAB, TOP2B
nNOS Signaling in Neurons	0.028	9	PRKCA, PPP3R1, PRKCO, GRIN2D, PPP3CB, PRKCI, PRKCH, GRIN2B, CAPN2
DNA Methylation and Transcriptional Repression Signaling	0.036	5	CHD4, SIN3A, SAP130, RBBP4, MBD2
DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination	0.038	4	ABL1, RAD52, ATM, ATRX

3. ตารางแสดงรายการของบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบประสาทและสมองจากการวิเคราะห์ 501 ยีนที่มี LINE-1 แทรกตัวอยู่และมีการแสดงออกที่ผิดปกติในออทิซึมสเปกตรัมและการพบซ้ำใน 3 การศึกษาขึ้นไปด้วยโปรแกรม IPA

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Number of Genes	Genes
Cell death of embryonic cell lines	2.48E-12	67	AAK1, ABCC1, API5, APP, BAG4, BCL2, BCL2L11, BECN1, BID, BIRC2, BRAF, CARD14, CASP4, CASP8, CASR, CD44, CDC42, CFLAR, CNNM4, CTNNB1, DAP3, DDX17, ELOVL4, FAS, FASLG, FYN, GRIN2B, HK1, IFNAR1, IGF1, IGF1R, IL17RD, IRS1, ITCH, ITGB1, LYN, MAP2K4, MAP3K5, MAP3K8, MAPK8, MIB1, NFE2L2, PAK2, PIAS1, PKN2, PLCB1, PPID, PPM1A, PPP3R1, PRNP, PSEN1, PSIP1, RAD21, RASSF5, SARM1, SDHC, STAT3, STK35, TCF3, TICAM2, TLR2, TNFRSF1A, TP53BP2, TP53INP1, TRPM7, UNC5B, ZMYND11
Apoptosis of embryonic cell lines	2.55E-09	48	API5, APP, BCL2, BCL2L11, BID, BIRC2, BRAF, CARD14, CASP4, CASP8, CASR, CD44, CFLAR, DAP3, DDX17, ELOVL4, FAS, FASLG, GRIN2B, IL17RD, IRS1, ITCH, ITGB1, LYN, MAP2K4, MAP3K5, MAP3K8, MAPK8, NFE2L2, PAK2, PIAS1, PKN2, PPID, PPM1A, PPP3R1, PSIP1, RAD21, RASSF5, SARM1, SDHC, STAT3, STK35, TCF3, TLR2, TNFRSF1A, TP53BP2, TP53INP1, ZMYND11
Cognitive impairment	3.01E-08	91	ACSL4, ADNP, ANKRD11, AP1S2, AP4E1, APOB, APP, ARID1A, ARID1B, ASCC3, ATP6V1A, ATP7A, ATRX, B3GALNT2, BCL2, BCORL1, BECN1, BRWD3, CA12, CAMTA1, CASK, CDC42, CEP63, CHD4, CHRM3, COL4A3BP, CRBN, CREBBP, CSNK2A1, CTNNB1, DAG1, DLD, DYRK1A, ELOVL4, ENTPD1, EP300, ERCC6, FGFR1, FGFR2, FKRP, FOXP1, FTSJ1, GLP1R, GNB1, GRIN2B, GRIN2D, HERC1, HERC2, HEXA,

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Number of Genes	Genes
			HMGCR, INPP4A, ITPR1, MED25, MID2, NONO, NR3C1, NRP2, NSUN2, OPA1, PACS1, POMT2, PRNP, RAB18, RERE, RNF125, ROCK2, RPS6KA3, SCN3A, SCN5A, SIN3A, SIRT1, SLC1A3, SLC35A3, SLC6A2, SLC9A6, SMARCE1, SON, ST3GAL3, SYNE1, TAF1, TBC1D20, TBL1XR1, TNIK, TRIO, UBE2A, UHMK1, WASHC4, YY1, ZBTB16, ZDHHC9, ZMYND11
Gangliosidosis	7.23E-08	7	APP, GLB1, GM2A, HEXA, HEXB, PSAP, UGCG
Mental retardation	1.06E-07	78	ACSL4, ADNP, ANKRD11, AP1S2, AP4E1, ARID1A, ARID1B, ASCC3, ATP6V1A, ATP7A, ATRX, B3GALNT2, BCORL1, BRWD3, CAMTA1, CASK, CDC42, CHD4, CHRM3, COL4A3BP, CRBN, CREBBP, CSNK2A1, CTNNB1, DAG1, DLD, DYRK1A, ELOVL4, ENTPD1, EP300, ERCC6, FGFR1, FGFR2, FKRP, FOXP1, FTSJ1, GNB1, GRIN2B, HERC1, HERC2, HEXA, INPP4A, ITPR1, MED25, MID2, NONO, NRP2, NSUN2, OPA1, PACS1, POMT2, RAB18, RERE, RNF125, RPS6KA3, SCN3A, SCN5A, SIN3A, SLC1A3, SLC35A3, SLC6A2, SLC9A6, SMARCE1, SON, ST3GAL3, SYNE1, TAF1, TBC1D20, TBL1XR1, TNIK, TRIO, UBE2A, UHMK1, WASHC4, YY1, ZBTB16, ZDHHC9, ZMYND11

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Number of Genes	Genes
Disorder of basal ganglia	3.88E-07	136	ABCB1, ABL1, ACAT1, ADAMTSL1, AHCYL1, ANKRD11, ANKRD2, ANXA2, AP1S2, APP, ATP6V1A, ATXN1, ATXN3, BCL11B, BCL2, BECN1, BIRC2, C19orf12, CA12, CAB39, CACNA1D, CAMK2B, CAMKK2, CASP8, CD160, CD44, CFLAR, CHRM3, CLU, COL4A3, CSE1L, CTNNB1, CYFIP2, DCTN1, DTNA, ELMO1, EPHA4, F11R, FAS, FBXW7, FLRT2, FOXP1, GALNT3, GNAO1, GNB5, GNG7, GPR107, GRIN2B, GRIN2D, GSK3B, HBP1, HMGCR, ICA1, IGF1, ITGAM, ITPR1, KCNH2, KCNQ2, KHDRBS1, KIF1B, KLF3, LDHB, MAOB, MAP2K4, MBNL2, MBP, MBTPS1, MYH7B, NDRG3, NMT2, NOTCH2, NPM1, NR4A1, NRG1, NTRK2, OSBPL8, OXR1, PARK7, PDE11A, PDE4B, PDE5A, PDE8B, PLA2G6, PLCB1, PPARGC1B, PPP1R2, PRDM2, PRNP, PSEN1, PTBP2, PTPN3, PTPRE, PVALB, RAB11A, RAB6A, RARB, RASGRP2, RERE, ROCK2, RREB1, RTN1, RTN4, RUNX3, RYR3, SAMHD1, SCARB2, SCN3A, SCN5A, SETDB1, SIN3A, SLC1A3, SLC20A2, SLC6A2, SLMAP, SSX2IP, ST8SIA4, TAF1, TCERG1, TGM2, THY1, TNFRSF1A, TNK2, TRAF6, TRIO, TRPM7, TUBA8, TUBB1, USP13, VPS13C, vs.NL1, WNK1, XPR1, XRCC6, YWHAZ, ZBTB16, ZNF7
GM2 gangliosidosis	7.58E-07	6	APP, GM2A, HEXA, HEXB, PSAP, UGCG
Polyneuropathy	8.17E-07	35	ALS2, AP4E1, AP4S1, ARHGEF10, C19orf12, CACNA1A, CACNA2D2, CLU, DCTN1, DDHD1, DHTKD1, DMXL2, ENTPD1, FGD4, GNB4, GSN, HK1, HSPD1, KIF1B, LITAF, MARS, MED25, MME, MTMR2, OPA1, PDK3, PLEKHG5, PSEN1, SBF1, SCN5A, SEPT9, SLC12A6, SLC6A2, SPAST, SPG21

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Number of Genes	Genes
Familial mental retardation	1.06E-06	57	ACSL4, ADNP, ANKRD11, AP1S2, AP4E1, ARID1A, ARID1B, ASCC3, ATP7A, ATRX, BRWD3, CAMTA1, CASK, CDC42, CHD4, COL4A3BP, CRBN, CSNK2A1, CTNNB1, DYRK1A, ELOVL4, ENTPD1, FGFR1, FGFR2, FTSJ1, GNB1, GRIN2B, HERC1, HERC2, HEXA, INPP4A, MED25, MID2, NONO, NSUN2, OPA1, PACS1, RNF125, RPS6KA3, SCN3A, SCN5A, SLC1A3, SLC35A3, SLC6A2, SLC9A6, SMARCE1, SON, ST3GAL3, TAF1, TBL1XR1, TNIK, TRIO, UBE2A, WASHC4, ZBTB16, ZDHHC9, ZMYND11
Neuromuscular disease	1.33E-06	155	ABCB1, ABL1, ACAT1, ADAM10, ADAMTSL1, AHCYL1, ALCAM, ALOX5, ANKRD11, ANKRD2, ANXA1, ANXA2, AP1S2, APP, ARRB1, ATP4B, ATP6V1A, ATXN1, ATXN3, BCL11B, BCL2, BECN1, BIRC2, CA12, CAB39, CACNA1D, CAMK2B, CAMKK2, CANX, CASP8, CD160, CD44, CFLAR, CHRM3, CLU, COL4A3, CSE1L, CSN3, CTNNB1, CTSS, CYFIP2, DCK, DHFR, DHX16, DTNA, ELMO1, EPHA4, F11R, FAS, FBXW7, FLRT2, FOXP1, GALNT3, GFPT1, GNAO1, GNB5, GNG7, GPR107, GRIN2B, GRIN2D, GSK3B, HAVCR2, HBP1, HMGCRC, ICA1, IFNAR1, IFNAR2, IGF1, IL7R, ITGAM, ITPR1, KCNH2, KCNQ2, KHDRBS1, KIF1B, KIT, KLF3, LDHB, MAOB, MAP2K4, MBNL2, MBP, MBTPS1, MUT, MYH7B, NDRG3, NMT2, NOTCH2, NPM1, NR3C1, NR4A1, NRCAM, NRG1, NTRK2, OSBPL8, OXR1, PARK7, PDE11A, PDE4B, PDE5A, PDIA3, PLA2G6, PLCB1, PPARGC1B, PPP1R2, PPP3CB, PRDM2, PRNP, PSEN1, PTGS1, PTPN3, PTPRC, PTPRE, PVALB, RAB11A, RAB6A, RARB, RASGRP2, RERE, ROCK2, RREB1, RRM2B, RTN1, RTN4, RUNX3, RYR3, SCARB2, SCN3A, SCN5A, SETDB1, SIN3A, SLC1A3, SLC6A2, SLMAP,

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Number of Genes	Genes
			SSX2IP, ST8SIA4, TCERG1, TGM2, THY1, TLR2, TNFRSF1A, TNFSF12, TNK2, TOP2B, TRAF6, TRIO, TRPM7, USP13, VPS13C, vs.NL1, WNK1, XRCC6, YWHAZ, ZBTB16, ZNF7
Autosomal dominant mental retardation	2.59E-06	20	ADNP, ANKRD11, ARID1A, ARID1B, CAMTA1, CHD4, COL4A3BP, CSNK2A1, CTNNB1, DYRK1A, FGFR1, GNB1, GRIN2B, PACS1, RNF125, SMARCE1, SON, TBL1XR1, TRIO, ZMYND11
Peripheral neuropathy	4.00E-06	41	ALS2, AP4E1, AP4S1, ARHGEF10, ASAH1, ATP7A, C19orf12, CACNA1A, CACNA2D2, DCTN1, DDHD1, DHTKD1, ENTPD1, FBXO38, FGD4, GJB3, GNB4, HK1, HSPD1, KCNH2, KIF1B, LITAF, MARS, MED25, MME, MTMR2, NR3C1, OPA1, PDK3, PLEKHG5, PSEN1, PTGS1, SBF1, SCN5A, SEPT9, SLC12A6, SLC6A2, SPAST, SPG21, SPTLC1, WNK1
Neuritogenesis	5.79E-06	24	ALS2, APP, ATRN, CAMK1D, CAMSAP1, CDC42, ERBB2, GSK3B, HGF, KIF13B, MARCO, MARK2, PARD3, PRKCI, PRNP, RAB11A, RAC1, RAP2A, SEMA4D, SLC9A6, SPAST, TNIK, TNK2, VAPA
Hereditary neuropathy	6.35E-06	46	ALS2, AP4E1, AP4S1, ARHGEF10, ASAH1, ATP7A, C19orf12, C9orf72, CHMP2B, CLU, DCTN1, DDHD1, DHTKD1, ENTPD1, FBXO38, FGD4, GJB3, GNB4, GSN, HK1, HSPD1, KIF1B, LITAF, MARS, MED25, MME, MTMR2, OPA1, PARK7, PDK3, PLA2G6, PLEKHG5, PSAP, PSEN1, SBF1, SEPT9, SLC12A6, SPAST, SPG21, SPTLC1, TBK1, TDP1, TRPM7, VPS13C, WFS1, WNK1
Tay-Sachs disease	7.95E-06	5	APP, GM2A, HEXA, PSAP, UGCG

4. ตารางแสดง Demographic Information ของเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยข้อมูลในตารางจะแสดง individual code, blood ID, ASD phenotype, Age, AGRE (ADI-R) diagnosis และ ethnicity ของแต่ละเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเคยผ่านการวิเคราะห์ทาง transcriptomics มาแล้วในปี ค.ศ. 2009 และได้รับการอนุเคราะห์มาจาก Dr. Valarie W. Hu (Hu et al., 2009)

Individual Code	Blood ID	ASD phenotype	Age	AGRE (ADI-R) diagnosis	Ethnicity
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
AU053504	HI1495	mild	10	Not quite autism (NOA)	Not Hispanic or Latino
AU056604	HI1234	mild	10	Autism	Not Hispanic or Latino
AU073804	HI2251	mild	13	Broad Spectrum	Not Hispanic or Latino
AU1196301	HI4870	mild	15	Autism	Not Hispanic or Latino
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

Individual Code	Blood ID	ASD phenotype	Age	AGRE (ADI-R) diagnosis	Ethnicity
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



Individual Code	Blood ID	ASD phenotype	Age	AGRE (ADI-R) diagnosis	Ethnicity
AU070808	HI1911	Savant + language	21	Autism	Not Hispanic or Latino
AU015003	HI0591	language	12	Autism	Not Hispanic or Latino
AU041904	HI0649	language	15	Autism	Not Hispanic or Latino
AU051504	HI0792	language	13	Autism	Not Hispanic or Latino
AU015903	HI0928	language	17	Autism	Not Hispanic or Latino
AU079103	HI1861	language	13	Autism	Unknown
AU062203	HI1943	language	12	Autism	Not Hispanic or Latino
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

Individual Code	Blood ID	ASD phenotype	Age	AGRE (ADI-R) diagnosis	Ethnicity
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

5. แสดงผลการวิเคราะห์  $\log_2$  fold change ของข้อมูล microarray ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SAM ของยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวของอหิวาต์ซิมสเปกตรัมกลุ่ม L เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการศึกษานี้

Gene symbol	GenBank	Genetitle	Average Control	Average L	Log2 Fold Change from microarray
ARMC8	R31524	armadillo repeat containing 8	0.01	0.48	-0.47
C10orf12	AA777765	chromosome 10 open reading frame 12	0.10	0.56	-0.46
C14orf100	H17648	chromosome 14 open reading frame 100	0.54	1.01	-0.47
C1orf27	N23283	chromosome 1 open reading frame 27	0.43	0.81	-0.39
C6orf98/ SYNE1	AA046724	chromosome 6 open reading frame 98///spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	-0.75	-0.39	-0.37
CISD1	AA431199	CDGSH iron sulfur domain 1	0.05	0.69	-0.64
ERGIC2	R64203	ERGIC and golgi 2	-0.04	0.48	-0.52
FCGR2B	AA465663	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-4.13	-3.25	-0.88
FCGR2B	R68106	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-3.33	-2.34	-0.99
IDS	H13205	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	-0.16	0.32	-0.48
IGFBP5	T52830	insulin-like growth factor binding protein 5	-2.25	-1.38	-0.87
ITCH	AA864919	itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	0.56	-0.04	0.60
ITGA4	AI149992	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	-0.98	-0.42	-0.56

Gene symbol	GenBank	Genetitle	Average Control	Average L	Log2 Fold Change from microarray
JAK1	AI492016	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	-0.18	0.38	-0.55
LRRC40	AA456020	leucine rich repeat containing 40	-0.03	0.38	-0.42
NSL1	R38208	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0.10	0.69	-0.60
OSBP	AI299902	oxysterol binding protein	-0.53	-0.21	-0.32
PRO2852/ UBAP1	T64881	hypothetical protein PRO2852///ubiquitin associated protein 1	-0.25	0.08	-0.33
SLC46A1	W45014	solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	0.43	-0.21	0.63
SMEK2	N48075	SMEK homolog 2, suppressor of mek1 ( <i>Dictyostelium</i> )	-0.57	-0.14	-0.42
STRBP	N53133	spermatid perinuclear RNA binding protein	1.05	1.39	-0.35
USP8	AA399952	ubiquitin specific peptidase 8	-0.15	0.37	-0.51
ZNF124	AA873762	zinc finger protein 124	-0.08	0.40	-0.49

6. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์  $\log_2$  fold change ของข้อมูล microarray ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SAM ของยีนที่มีระดับการแสดงออกที่ผิดปกติในเซลล์ไลน์เมดเลือดขาวของออทิซึมสเปกตรัมกลุ่ม L เมื่อเทียบกับกลุ่ม age-matched control ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์เมดเลือดขาวที่ใช้ในการศึกษานี้

Gene symbol	GenBank	Gene title	Average age-matched control	Average L	Log <sub>2</sub> Fold Change from microarray
AFF4	AI129731	AF4/FMR2 family, member 4	0.69	0.22	0.46
ARMC8	R31524	armadillo repeat containing 8	-0.16	0.56	-0.71
BRI3	AA670434	brain protein I3	0.18	-0.26	0.44
CRELD1	AI672251	cysteine-rich with EGF-like domains 1	0.88	0.32	0.56
CRTAP	AA486278	cartilage associated protein	1.56	1.08	0.48
CYBRD1	N75713	cytochrome b reductase 1	0.33	-0.65	0.97
CYP1B1	AA451886	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	0.24	-1.05	1.29
DDAH2	AA995086	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	-0.04	-0.31	0.27
DKK3/RIG	AA425947	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)//regulated in glioma	6.37	4.98	1.39
FUT10	AI147738	fucosyltransferase 10 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	0.44	-0.06	0.50
GATAD2B	AA884898	GATA zinc finger domain containing 2B	-0.53	-1.19	0.66
HDHD1A	R38639	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A	-0.48	0.00	-0.47
HIP1	AI150389	huntingtin interacting protein 1	0.59	-0.14	0.73
IDS	H13205	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	-0.45	0.39	-0.84
IRF2	AA393214	interferon regulatory factor 2	-1.21	-1.96	0.75

Gene symbol	GenBank	Gene title	Average age-matched control	Average L	Log <sub>2</sub> Fold Change from microarray
ITCH	AA864919	itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	0.86	-0.12	0.98
LOC100125871/ C12orf60	AI301111	hypothetical protein LOC100125871///chromosome 12 open reading frame 60	0.42	-0.44	0.86
LOC28480/ C20orf112	AA487023	hypothetical protein LOC284804///chromosome 20 open reading frame 112	0.87	0.40	0.47
LOC389831	N26163	hypothetical gene supported by AL713796	1.37	0.39	0.98
LOC390940	AA427947	similar to R28379_1	-0.39	-1.15	0.76
LOC647174	AA262235	nexin-related serine protease inhibitor	0.57	0.04	0.53
MECP2	AA670387	methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)	0.51	0.17	0.34
MRFAP1	AA488055	Mof4 family associated protein 1	0.01	-0.66	0.67
OPRK1	R31938	opioid receptor, kappa 1	2.64	0.99	1.66
PLP2	AA464627	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	0.66	0.38	0.28
PQLC2	AI149537	PQ loop repeat containing 2	-0.05	-0.39	0.34
RAB27A	AA927187	RAB27A, member RAS oncogene family	0.36	-0.78	1.13
RDX	AI263095	radixin	0.76	0.17	0.59
RPS6KA2	AA447507	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	0.41	-0.31	0.72
SLC23A2	AA461071	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	1.57	-0.96	2.53

Gene symbol	GenBank	Gene title	Average age-matched control	Average L	Log <sub>2</sub> Fold Change from microarray
SLC46A1	W45014	solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	0.37	-0.03	0.40
ST3GAL6	AA884052	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	3.56	1.67	1.90
ST3GAL6	H19227	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	3.63	1.33	2.30
TACSTD1	AI340883	tumor-associated calcium signal transducer 1	1.30	0.38	0.92
UBD	N49629	ubiquitin D	0.20	-0.46	0.66
WBSCR18	AA670394	Williams Beuren syndrome chromosome region 18	-0.28	-0.66	0.39
WWC3	AA071470	WWC family member 3	0.57	-0.40	0.98
WWC3	AI041748	WWC family member 3	0.12	-0.67	0.79
ZNF174	AA700196	zinc finger protein 174	0.48	-0.23	0.71
ZNF516	N91958	zinc finger protein 516	-0.26	-0.80	0.54

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมน้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### 1. การเตรียม 0.5M EDTA ปริมาตร 1 ลิตร

- 1.1. ทำการชั่ง EDTA.(Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, M.W. 372.24) ปริมาณ 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 stirrer
- 1.4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนเป็น 1000 mL หรือ 1 L
- 1.5. นำไป autoclave เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. การเตรียม 10X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

- 2.1. เตรียม Tris base (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, M.W. 121.14) ปริมาณ 108 g
- 2.2. เตรียม Boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, M.W. 61.83) ปริมาณ 55 g
- 2.3. เติมน้ำ Milli Q ลงไปประมาณ 900 mL
- 2.4. เติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ลงไป 40 mL
- 2.5. ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Milli Q จนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 mL หรือ 1 L
- 2.6. นำไป autoclave เป็นเวลา 20 นาที

#### 3. การเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

- 3.1. ทำการเตรียมจาก 10X TBE buffer โดยนำ 10X TBE buffer มาปริมาตร 100 mL
- 3.2. เติมน้ำ Milli Q ลงไป 900 mL จะทำให้ได้ 1X TBE buffer ปริมาตร 1 L

#### 4. การเตรียม 10% APS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- 4.1. เตรียม 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 ค

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

/	per
%	Percentage
X	Times
μ	Micro
ADDM	Autism and Developmental Disabilities Monitoring
ADI-R	Autism Diagnostic Interview-Revised
APS	Ammonium Persulfate
ARMC8	Armadillo Repeat Containing 8
ASD	Autism spectrum disorder
AUC	Area under the curve
C <sup>m</sup>	Methylated Cytosine
C <sup>u</sup>	Unmethylated Cytosine
C1orf27	Chromosome 1 open reading frame 27
CNVs	Copy Number Variants
COBRA	Combined bisulfite restriction analysis
CU-DREAMx	Connection Up and Down Regulation Analysis of Microarrays extension
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferases
DSM-5	The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition
DZ	Dizygotic
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER $\alpha$	Estrogen receptor alpha
ER $\beta$	Estrogen receptor beta
FDR	False Discovery Rate
g	Gram
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GEO	Gene Expression Omnibus

GSE	Gene Series
hg	Human genome
HGR	Human genome reference
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
LCLs	Lymphoblastoid cell lines
LINE-1	Long interspersed nuclear element 1
M	Molar
MECP2	Methyl-CpG binding Protein 2
mL	Millilitre
mM	Millimolar
MZ	Monozygotic
mRNA	Messenger RNA
NaOH	Sodium hydroxide
ng	Nanogram
NPCs	Neural progenitor cells
ORF1	Open reading frame 1
ORF2	Open reading frame 2
PDD	Pervasive developmental disorder
PLXNA4	Plexin A4
R <sup>2</sup>	R square
RCF	Relative Centrifugal Force
RNA	Ribonucleic acid
ROBO2	Roundabout guidance receptor 2
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAM	Significance analysis of microarrays
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
U	Unit
UTR	Untranslated region

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชญานิน ตั้งสุวรรณศรี เกิดเมื่อวันที่ 18 ตุลาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จาก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในระดับ ปริญญาโท ในปีการศึกษา 2557 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีคลินิกและอณูทาง การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากคณะสห เวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย และทุน ๙๐ ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

