

ผลการศึกษา

1. ประชากรที่ทำการศึกษา

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยสามารถรวบรวมผู้ป่วย THPP และผู้ป่วย กลุ่มควบคุมได้แก่ผู้ที่เป็นไทรอยด์เป็นพิษ เพศชาย ที่ไม่มีอาการอ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมต่ำ 2 cohorts

- 1. Test cohort ประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วย 79 คน กลุ่มควบคุม 74 คน
- 2. Replication cohort ประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วย 28 คน กลุ่มควบคุม 48 คน

สาเหตุของโรคไทรอยด์เป็นพิษทุกคนเกิดจาก โรค Graves' disease ทั้งหมดเป็นเพศชาย และมีเชื้อสายไทยจีน ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง ลักษณะผู้เข้าร่วมวิจัยใน test และ replication cohort

Cohort	Underlying thyroid disease	No. samples	Age ^b	% Male
Test cohort¹				
Case	Graves' disease	79	40.7 ± 1.4	100%
Control ^a	Graves' disease	74	42.6 ± 1.7	100%
Replication cohort²				
Case	Graves' disease	28	40.2 ± 2.7	100%
Control ^a	Graves' disease	48	46.0 ± 2.4	100%

a The control groups were Thai, hyperthyroid patients without history of hypokalemia and weakness

b Mean ± standard error of mean

- 1. กลุ่ม test cohort ประกอบด้วยผู้ป่วยที่รวบรวมจาก รพ. รามาธิบดี, รพ. เทพธารินทร์, รพ. จุฬาลงกรณ์ และ รพ. ธรรมศาสตร์
- 2. กลุ่ม replication cohort ประกอบด้วยผู้ป่วยที่รวบรวมจาก รพ. รามาธิบดี, รพ. สงขลานครินทร์, รพ. สรรพสิทธิประสงค์, รพ. ราชบุรี, และ รพ. มหาราชนครราชสีมา

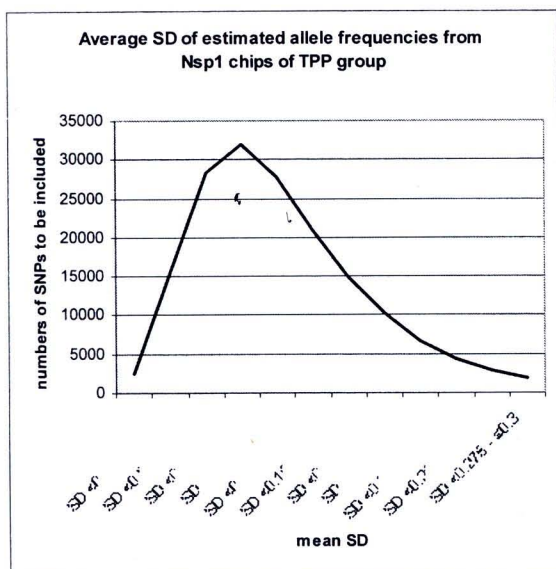
2. ผลการศึกษา GWAS pooled DNA analysis

จากการทำ GWAS pooled DNA analysis DNA ของผู้ป่วย THPP 50 คนและกลุ่มควบคุม 50 คน genotyping ลงบน Affymetrix GeneChip® mapping 500K arrays set 6 Chips (triplicate)

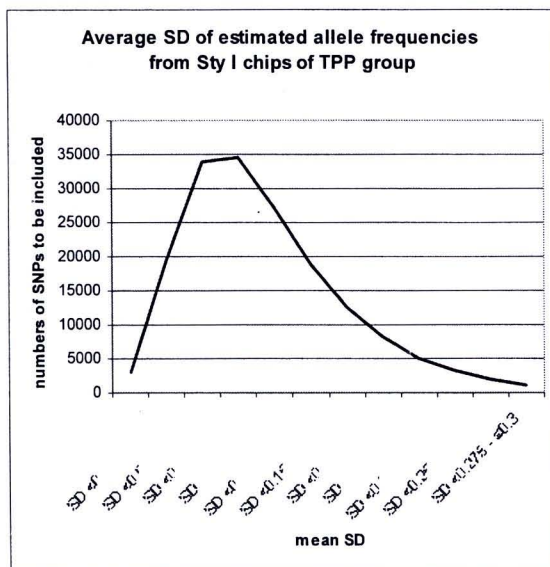
- จากผลการคำนวณค่า RAS และค่า SD สามารถนำมาสร้าง graph ได้ดังแผนภูมิที่ 2 และ 3 จะพบว่ามากกว่า 90% ค่า $SD < 0.20$ จึงตัดเอา $SD < 0.20$ ตามที่ตั้งไว้เดิมเป็นเกณฑ์ในการเลือก SNPs

แผนภูมิที่ 2

แสดงการกระจายจำนวน SNPs ตามค่า SD ของ RAS ในกลุ่ม THPP



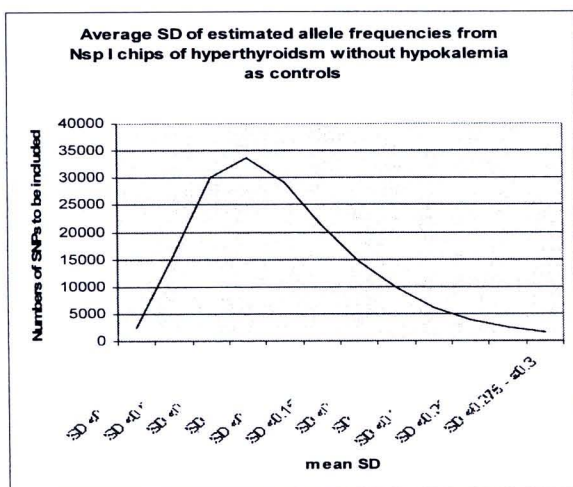
Nsp I Chip



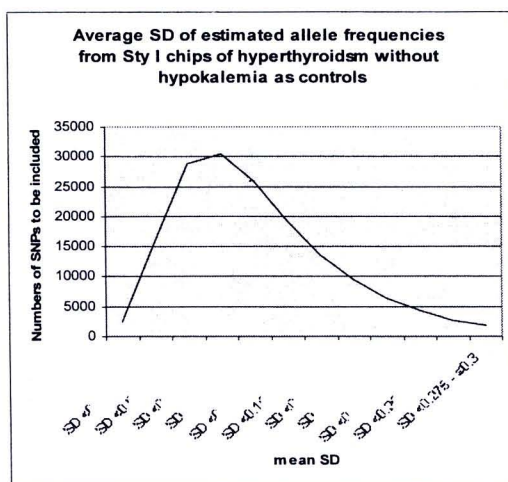
Sty I Chip

แผนภูมิที่ 3

แสดงการกระจายจำนวน SNPs ตามค่า SD ของ RAS ในกลุ่มควบคุม



Nsp I Chip



Sty I Chip

จากการทำ Pooled DNA genotyping ด้วย 500K affymetrix gene chip พบว่ามี genetic variants ที่มีค่า estimated allele frequencies พบว่าจำนวน SNPs ที่สัมพันธ์กับการเกิด TPP มากน้อยแตกต่างกันไปตามการกำหนดค่า SD ของ allele frequencies ระหว่าง Chip และค่าความแตกต่างกันของ estimated allele frequencies ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวน SNPs ที่มีค่า estimated allele frequencies แตกต่างกันระหว่างกลุ่มตามเกณฑ์ค่า SD ที่แตกต่างกัน

SD	different of estimated allele frequencies	Numbers of SNPs in Nsp I Chip	Numbers of SNPs in Sty I Chip
0.15	0.15	765	825
	0.20	105	113
	0.25	21	17
	0.30	0	3
0.20	0.15	2555	2217
	0.20	461	386
	0.25	87	63
	0.30	7	15

ต่อไปนี้เป็นตารางแสดงรายชื่อ SNPs ที่มีค่า SD ของ estimated allele frequencies < 0.20 และค่าความแตกต่างของ estimated allele frequencies ระหว่าง 2 กลุ่ม $|RAS_{av}| > 0.25$ ดังตารางที่ 3 (NspI Chip) และ 4 (Styl Chip)

ตาราง 3 แสดงความแตกต่างของ Estimated SNP allele frequencies ที่ > 0.25 และค่า SD < 0.2

Chip	SNP	Related genes	Associated position	RAS case	RAS control	$ \Delta RAS $	Odds ratio
Nsp I	rs9298441	PXDNL	downstream	0.6625	0.2818	0.3807	0.1999
	rs264746	SDCCAG10	downstream	0.9507	0.5845	0.3662	0.0729
	rs17014821	ROBO2	upstream	0.5149	0.1796	0.3353	0.2063
	rs2552166	---	downstream	0.6856	0.3567	0.329	0.2542
	rs12918795	IRX3	upstream	0.4801	0.1617	0.3184	0.2088
	rs630403	SCN4B	upstream	0.4441	0.7546	0.3105	3.8485
	rs898802	FZD10	upstream	0.6295	0.9311	0.3016	7.9567
	rs4304940	---	upstream	0.6046	0.3064	0.2982	0.2889
	rs1392163	AGBL1	downstream	0.0611	0.3591	0.298	8.6124
	rs10203410	SKIP	intron	0.5015	0.2058	0.2957	0.2575
	rs1763891	FAM13C1	upstream	0.2441	0.5383	0.2942	3.6101
	rs11054931	DUSP16	intron	0.4027	0.1087	0.294	0.1809
	rs6573508	GPHB5	upstream	0.4549	0.7439	0.289	3.4801
	rs202675	FOLH1	intron	0.6369	0.3479	0.289	0.3041
	rs4903716	ADCK1	downstream	0.5984	0.3099	0.2885	0.3013
	rs4276077	LOC339745	upstream	0.5539	0.2667	0.2872	0.2929
	rs515133	MAP3K7IP2	intron	0.4545	0.168	0.2865	0.2424
	rs6554437	POLR2B	downstream	0.1164	0.4029	0.2865	5.122
	rs11134341	SEMA5A	downstream	0.5502	0.8367	0.2864	4.1868
	rs16863140	---	intron	0.4098	0.1243	0.2855	0.2044
	rs553034	MAB21L1	downstream	0.1838	0.4686	0.2848	3.9151
	rs5971466	---	downstream	0.6282	0.9124	0.2842	6.1616
	rs1368366	DPYSL3	intron	0.1729	0.4569	0.2839	4.0228
	rs11680017	MYO3B	intron	0.4142	0.6979	0.2837	3.2672
	rs12620708	HNMT	downstream	0.9093	0.6257	0.2836	0.1668
	rs3816479	LTBP1	intron	0.599	0.8812	0.2822	4.9637
	rs6592856	---	upstream	0.3064	0.0244	0.282	0.0567

Chip	SNP	Related genes	Associated position	RAS case	RAS control	$ \Delta RAS $	Odds ratio
Nsp I	rs7077062	BLNK	intron	0.5165	0.7985	0.282	3.7101
	rs8037848	MEIS2	intron	0.6945	0.4152	0.2793	0.3123
	rs9897248	TMEM92	downstream	0.443	0.7212	0.2782	3.2519
	rs771808	ZPLD1	upstream	0.5715	0.2938	0.2777	0.312
	rs9366065	---	intron	0.326	0.6031	0.2771	3.1419
	rs1327541	TXNDC8	intron	0.1533	0.4303	0.277	4.1709
	rs9357123	HLA-B	downstream	0.8832	0.6066	0.2766	0.2039
	rs7318580	---	intron	0.3538	0.629	0.2752	3.0967
	rs4131866	AGTR2	downstream	0.7725	0.498	0.2745	0.2921
	rs1481072	---	upstream	0.924	0.65	0.274	0.1528
	rs10477374	FBXO38	upstream	0.7047	0.431	0.2736	0.3175
	rs1121161	---	downstream	0.3434	0.6165	0.2731	3.0739
	rs4887017	ACSBG1	intron	0.3627	0.0902	0.2725	0.1743
	rs9905884	KCNJ2	downstream	0.7118	0.4398	0.2721	0.3178
	rs2426429	ZFP64	upstream	0.8363	0.5643	0.272	0.2535
	rs12227523	SYT1	intron	0.5351	0.2631	0.272	0.3102
	rs6563716	LHFP	intron	0.934	0.664	0.27	0.1397
	rs4695372	---	upstream	0.6379	0.9078	0.2699	5.5862
	rs11176466	CAND1	upstream	0.038	0.3067	0.2687	11.1921
	rs1610677	HLA-G	upstream	0.8911	0.6232	0.2679	0.2021
	rs252984	EFNA5	intron	0.5018	0.7687	0.2669	3.2989
	rs1660291	---	upstream	0.5912	0.325	0.2662	0.3329
	rs6974863	---	intron	0.6557	0.9215	0.2657	6.1595
	rs9530838	RBM26	downstream	0.6043	0.3387	0.2656	0.3354
	rs10494312	FCRL5	downstream	0.4647	0.1998	0.2648	0.2878
	rs11051514	MGC50559	upstream	0.4167	0.1524	0.2642	0.2518
	rs7809512	PTPN12	downstream	0.2998	0.036	0.2639	0.0871
	rs2148269	PRTFDC1	intron	0.4982	0.2346	0.2637	0.3086
	rs4489164	---	downstream	0.4166	0.6793	0.2627	2.9661
	rs1329333	KCTD12	downstream	0.0532	0.3158	0.2626	8.2105
	rs4561479	MON1B	upstream	0.519	0.781	0.262	3.3043

Chip	SNP	Related genes	Associated position	RAS case	RAS control	$ \Delta \text{RAS} $	Odds ratio
Nsp I	rs9322311	AKAP12	intron	0.5634	0.8249	0.2616	3.652
	rs556335	MAP3K7IP2	intron	0.4845	0.2233	0.2612	0.3059
	rs7525703	PRKAB2	upstream	0.4348	0.695	0.2602	2.9618
	rs7579026	---	downstream	0.0851	0.3442	0.2591	5.6405
	rs475454	SYT6	upstream	0.5564	0.8152	0.2588	3.5165
	rs4142474	TCBA1	intron	0.697	0.4382	0.2588	0.3391
	rs1484002	VRK1	downstream	0.0844	0.3426	0.2582	5.6517
	rs721548	OTUD7A	intron	0.1781	0.4359	0.2578	3.566
	rs6535725	DCLK2	intron	0.5079	0.2502	0.2577	0.3233
	rs10454926	C5orf38	downstream	0.699	0.9564	0.2574	9.4519
	rs13117506	SPRY1	downstream	0.1991	0.4556	0.2565	3.3666
	rs7591406	LASS6	intron	0.4525	0.1963	0.2561	0.2956
	rs1513749	FLJ45455	intron	0.7096	0.4536	0.256	0.3397
	rs2409714	---	intron	0.9319	0.6763	0.2556	0.1526
	rs9529837	DACH1	downstream	0.4255	0.681	0.2555	2.8823
	rs3819506	KCNQ1	intron	0.2568	0.5123	0.2555	3.0406
	rs778404	PPAP2B	downstream	0.7143	0.4595	0.2548	0.34
	rs7601571	---	upstream	0.0212	0.2757	0.2545	17.5782
	rs3827708	STX6	intron	0.7042	0.4498	0.2544	0.3434
	rs6765267	HTR3E	upstream	0.9749	0.7213	0.2536	0.0667
	rs778417	---	downstream	0.6052	0.3517	0.2535	0.3539
	rs17058064	GALNT17	intron	0.1861	0.4392	0.253	3.4239
	rs16963381	FAM59A	intron	0.37	0.6224	0.2523	2.8059
	rs17159914	FMO5	downstream	0.6676	0.4167	0.2509	0.3556
	rs10475790	---	downstream	0.3178	0.0673	0.2505	0.155
	rs12215940	---	upstream	0.5597	0.8102	0.2505	3.3582
	rs2695651	C15orf15	downstream	0.5256	0.2753	0.2503	0.3429
	rs7152160	---	upstream	0.4654	0.7157	0.2503	2.8913
	rs4491329	SLC6A15	downstream	0.1268	0.3769	0.25	4.164

ตารางที่ 4 แสดงความแตกต่างของ Estimated SNP allele frequency > 0.25 และ SD ของ Chip Sty I < 0.2

Chip	SNP	Related genes	Associated position	RAS case	RAS control	$ \Delta \text{RAS} $	Odds ratio
Sty I	rs10742817	AGBL2	intron	0.14	0.39	0.25	3.87899
	rs6603060	ARHGEF18	intron	0.2	0.46	0.25	3.24752
	rs8073793	CACNG5	downstream	0.69	0.94	0.25	7.38594
	rs9620553	ADRBK2	downstream	0.28	0.54	0.25	2.92343
	rs1909023	TMEM74	downstream	0.6	0.85	0.25	3.91411
	rs12116790	AJAP1	upstream	0.12	0.38	0.25	4.23772
	rs7167029	ADAMTSL3	intron	0.37	0.63	0.25	2.87812
	rs1006039	ADCK1	upstream	0.69	0.94	0.25	7.3452
	rs9990522	CPEB2	upstream	0.56	0.81	0.25	3.36779
	rs2710214	ACTR3B	downstream	0.35	0.61	0.25	2.89167
	rs2192275	DPP6	upstream	0.67	0.93	0.25	6.31526
	rs1983230	RBPJ	upstream	0.71	0.97	0.25	14.3718
	rs17080201	GFPT2	intron	0.08	0.33	0.25	5.54936
	rs10507388	SLC7A1	upstream	0.58	0.83	0.25	3.67488
	rs7191857	IRX3	downstream	0.7	0.95	0.25	9.49292
	rs312692	KCNJ2	downstream	0.59	0.34	0.25	0.357406
	rs2464544	ZFX	intron	0.34	0.09	0.25	0.187867
	rs6068212	ZFP64	upstream	0.51	0.25	0.25	0.323911
	rs8087603	ALPK2	intron	0.98	0.73	0.25	0.037594
	rs9478448	---	downstream	0.8	0.55	0.25	0.295679
	rs235003	B4GALT5	downstream	0.7	0.44	0.25	0.33769
	rs3782250	NCOR2	intron	0.69	0.43	0.25	0.341656
	rs1265236	KU-MEL-3	upstream	0.51	0.25	0.25	0.323033
	rs9574218	---	downstream	0.69	0.44	0.25	0.351926
	rs1324530	SUPT3H	intron	0.63	0.9	0.26	5.30487
	rs17458078	TNFSF11	upstream	0.29	0.56	0.26	3.04556
	rs6039386	PLCB1	downstream	0.1	0.36	0.26	4.93835
	rs984559	KCNIP1	intron	0.91	0.65	0.26	0.165385
	rs7495334	---	upstream	0.89	0.63	0.26	0.194692
	rs10241082	WNT2	downstream	0.75	0.48	0.26	0.308797
	rs1144505	ZNF202	intron	0.7	0.43	0.26	0.333807
	rs16982724	PRDX4	upstream	0.36	0.64	0.27	3.10794

Chip	SNP	Related genes	Associated position	RAS case	RAS control	$ \Delta \text{RAS} $	Odds ratio
<i>Sty I</i>	rs7145495	CLEC14A	upstream	0.66	0.93	0.27	7.65416
	rs730705	DFNB31	upstream	0.23	0.51	0.27	3.41862
	rs11595013	SFMBT2	intron	0.41	0.69	0.27	3.18983
	rs1346298	---	upstream	0.53	0.81	0.27	3.83039
	rs2597376	KCNQ3	upstream	0.53	0.8	0.27	3.61741
	rs11040338	FOLH1	upstream	0.54	0.26	0.27	0.310372
	rs1906546	---	upstream	0.47	0.19	0.27	0.274113
	rs10521763	RP13-102H20.1	intron	0.84	0.56	0.27	0.249109
	rs5974389	---	upstream	0.61	0.34	0.27	0.327907
	rs9523906	GPC5	downstream	0.48	0.21	0.27	0.287983
	rs7824835	PXDNL	downstream	0.5	0.22	0.27	0.28631
	rs2070349	DSCR4	downstream	0.83	0.56	0.27	0.256757
	rs312727	KCNJ2	downstream	0.35	0.63	0.28	3.27233
	rs7043553	DAPK1	intron	0.91	0.63	0.28	0.151674
	rs5928379	DMD	upstream	0.34	0.63	0.29	3.32222
	rs17652307	---	upstream	0.9	0.6	0.29	0.167098
	rs4730612	PPP1R3A	upstream	0.48	0.78	0.3	3.90939
	rs2991308	RFX3	intron	0.07	0.38	0.3	7.67846
	rs478915	OR4A5	downstream	0.54	0.23	0.3	0.262957
	rs831845	MIER3	upstream	0.75	0.45	0.3	0.27209
	rs2185075	SMYD3	intron	0.4	0.1	0.3	0.170028
	rs2208986	---	upstream	0.57	0.26	0.3	0.27476
	rs712374	SLC25A21	intron	0.54	0.86	0.31	5.04625
	rs12431701	---	upstream	0.44	0.75	0.31	3.91551
	rs1063320	HLA-G	3'UTR	0.87	0.56	0.31	0.18548
	rs10249701	C7orf53	downstream	0.98	0.67	0.31	0.032232
	rs7158520	VRK1	downstream	0.72	0.39	0.32	0.249399
	rs1867804	KSR2	intron	0.69	0.36	0.32	0.254284
	rs6010592	FAM19A5	intron	0.74	0.41	0.32	0.244252
	rs7103374	OR6X1	upstream	0.53	0.2	0.32	0.228731

จากการพิจารณาทั้ง 2 Chip โดยตัดเกณฑ์ของSD< 0.20 และ|RASav| > 0.25พบว่า SNPs ของยีนDPP6มีความสัมพันธ์กับโรคTHPP ถึง 3 SNPs ดังตารางที่5 และค่าOdd ratios สูงยีนDPP6นี้เป็น subunit หนึ่งของPotassium channel ที่แสดงออกที่กล้ามเนื้อลายจึงได้เลือกยีนนี้มาทำการตรวจ individual genotyping เพื่อยืนยันผลของPooled-DNA ดังแสดงผลในตารางที่6

ตารางที่5แสดงค่าRASav ของSNPs ที่อยู่ใกล้ยีนDPP6 ระหว่างกลุ่มTPP และกลุ่มควบคุม (p =3.7x10⁻³.)

Genes	db SNPs	RASav case	RASav control	RAS	OR
DPP6	rs10267037	0.6765	0.9088	0.2323	4.7663
	rs2192275	0.68	0.9306	0.2506	6.3153
	rs749120	0.5046	0.7154	0.2108	2.4677

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบค่า estimated allele frequencies และ actual allele frequencies ของ SNP rs749120

	rs749120	G	T	χ^2			
Estimated	THPP	56 (56%)	44 (44%)	5.13			
	controls	39 (39%)	61 (61%)	P = 0.02			
		GG	GT	TT	Additive	Dominant GG+GT vs TT	Recessive GG vs GT+TT
Actual	THPP	26 (52%)	5 (10%)	19 (38%)	$\chi^2 = 3.61$	$\chi^2 = 3.61$	$\chi^2 = 3.61$
	controls	17 (34%)	5 (10%)	28 (56%)	P = 0.16	P = 0.16	P = 0.16

ผลการเลือกยีนที่สนใจจากGWAS-pooked DNA เพื่อการทำindividual genotyping

ผู้วิจัยได้ทำindividual genotyping ด้วย using multiplex-PCR-based method on the Invader assay (Third Wave Technologies, Madison, WI, USA)ในประชากรทั้งสิ้น156คนโดยเป็นกลุ่มผู้ป่วย THPP 81 คนและกลุ่มควบคุม75 คนจำนวน 116 SNPs ทั้งนี้ประกอบด้วย55 htSNPsของGABRA3, 9 htSNPs ของDPP6, 7 htSNPs ของGLRA1, 37 htSNPs ของCACNA1Sและ8 htSNPs ของSCN4Aดังแสดงชนิดของในตารางที่7

ตารางที่ 7 แสดงจำนวน Haplotype tagging SNPs ของยีนที่ต้องการทำ individual genotyping

Gene Symbol	Gene Name	Map location	No. of tagged SNPs
GABRA3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha3	Xq28	55
CACNA1S	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	1q32	37
SCN4A	Voltage-gated sodium channel subunit alpha Nav1.4	17q23.3	8
GLRA1	Glycine receptor, alpha1	5q32	7
DPP6	Dipeptidyl aminopeptidase-like protein6	7q36.2	9

อย่างไรก็ดีเราไม่พบความสัมพันธ์ของ htSNPs ของ กับโรค THPP ดังแสดงผลค่า p value จาก Fisher exact's test จากการเปรียบเทียบ allelic และ genotypic frequencies ในตารางที่ 8 ระหว่าง THPP และกลุ่มควบคุม



ตารางที่ 8 แสดงผลเปรียบเทียบค่า estimated และ actual allele frequencies ของ hSNPs ของ SCN4A, GLRA1, CACNA1S, และ DPP6

SNP_ID	Position	Gene	Allele	Case				Control				Risk allele	P-value	OR (95%CI)
				Genotype				Genotype						
				11	12	22	MAF	11	12	22	MAF			
rs2532111	59371153	SCN4A	A/G	10	39	15	0.461	12	33	11	0.491	G	4.82E-01	1.47 (0.58-3.73)
rs4968604	59387054	SCN4A	G/A	23	33	8	0.383	18	27	11	0.437	G	3.24E-01	1.71 (0.63-4.61)
rs4968679	59400473	SCN4A	C/T	11	41	12	0.492	9	26	21	0.393	C	2.54E-02	2.59 (1.14-5.95)
rs2302236	59402199	SCN4A	A/G	2	28	34	0.250	1	13	42	0.134	A	1.46E-02	2.65 (1.21-5.77)
rs2070720	59372505	SCN4A	T/C	11	37	16	0.461	14	33	9	0.455	C	2.44E-01	1.74 (0.70-4.33)
rs2058194	59374080	SCN4A	T/C	9	39	16	0.445	10	34	12	0.482	C	6.05E-01	1.33 (0.50-3.55)
rs3785568	59377523	SCN4A	T/C	57	6	1	0.062	45	11	0	0.098	T	2.08E-01	1.99 (0.71-5.55)
rs2302237	59402439	SCN4A	C/T	33	28	3	0.266	30	22	4	0.268	C	7.04E-01	1.56 (0.33-7.31)
rs12566395	199278360	CACNA1S	G/T	53	11	0	0.086	43	11	2	0.134	G	2.16E-01	N/A
rs10494827	199280570	CACNA1S	G/C	24	36	4	0.344	21	29	6	0.366	G	5.12E-01	1.80 (0.48-6.74)
rs12407188	199282747	CACNA1S	G/C	49	15	0	0.117	46	10	0	0.089	C	5.05E-01	1.41 (0.58-3.45)
rs12065493	199285957	CACNA1S	C/T	38	26	0	0.203	34	19	3	0.223	C	9.87E-02	N/A
rs12032370	199291572	CACNA1S	C/T	50	12	2	0.125	45	9	2	0.116	T	8.24E-01	1.15 (0.47-2.78)
rs4915474	199293678	CACNA1S	C/T	5	37	20	0.379	7	29	20	0.384	T	5.46E-01	1.63 (0.49-5.46)
rs7556265	199295836	CACNA1S	T/C	5	6	0	0.047	50	6	0	0.054	T	1.00E+00	1.16 (0.35-3.83)
rs2297904	199297291	CACNA1S	G/A	26	29	9	0.367	26	25	5	0.312	A	4.11E-01	1.67 (0.52-5.31)

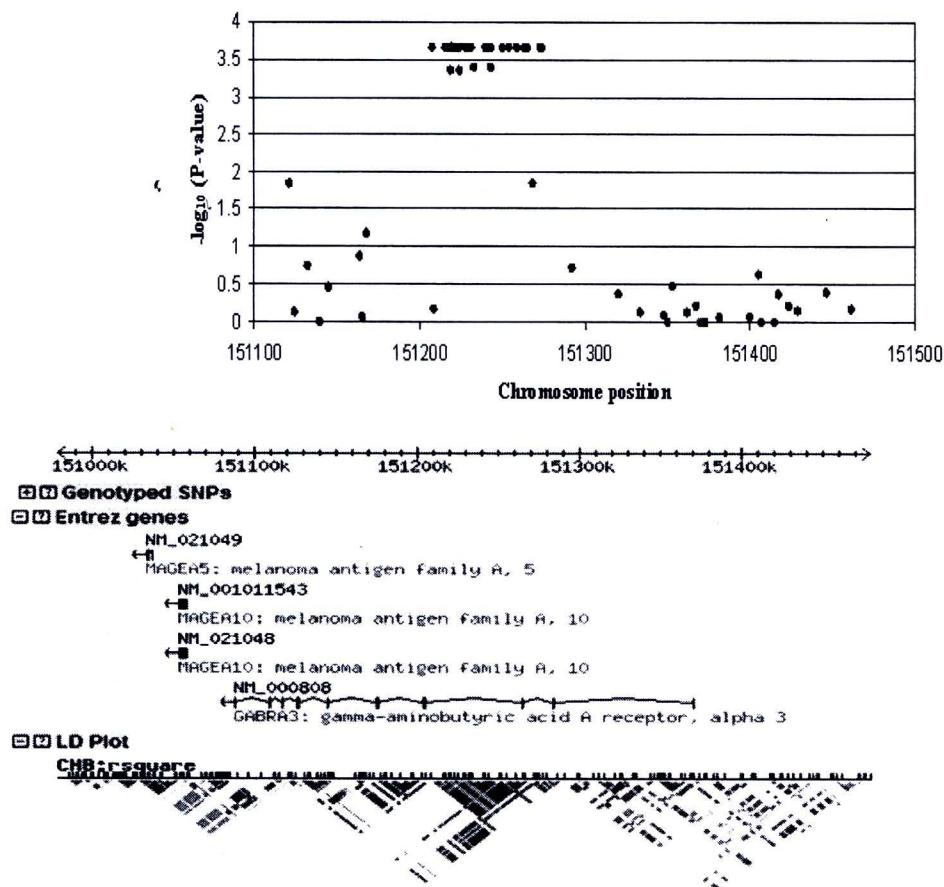
SNP_ID	Position	Gene	Allele	Case				Control				Risk allele	P-value	OD (95%CI)
				Genotype				Genotype						
				11	12	22	MAF	11	12	22	MAF			
rs3767505	199301159	CACNA1S	T/C	37	25	2	0.227	37	18	1	0.179	C	4.23E-01	1.42 (0.68-2.99)
rs3820421	199301271	CACNA1S	A/T	33	22	9	0.312	30	22	4	0.268	T	8.56E-01	1.08 (0.53-2.22)
rs2297899	199303030	CACNA1S	G/C	50	12	2	0.125	42	13	1	0.134	G	8.29E-01	1.19 (0.51-2.78)
rs16847636	199303930	CACNA1S	A/G	49	13	2	0.133	44	11	1	0.116	G	8.30E-01	1.15 (0.48-2.66)
rs3767507	199308891	CACNA1S	C/T	50	14	0	0.109	47	8	1	0.089	T	4.67E-01	N/A
rs3767509	199310926	CACNA1S	G/A	48	14	2	0.141	39	14	3	0.179	G	4.80E-01	1.31 (0.59-2.92)
rs2296385	199321361	CACNA1S	G/A	60	4	0	0.031	47	9	0	0.080	G	1.39E-01	2.87 (0.83-9.91)
rs2147798	199328441	CACNA1S	C/G	28	25	11	0.367	24	23	9	0.366	G	1.00E+00	0.96 (0.47-1.99)
rs17454870	199333634	CACNA1S	G/A	49	12	3	0.141	42	11	3	0.152	G	856E-01	1.15 (0.22-5.95)
rs6704355	199332907	CACNA1S	A/G	18	27	19	0.492	14	25	17	0.473	A	7.97E-01	1.17 (0.52-2.65)
rs16847726	199334548	CACNA1S	C/T	54	6	4	0.109	43	10	3	0.143	C	3.55E-01	1.63 (0.65-4.08)
rs1574408	199335410	CACNA1S	A/G	19	27	18	0.492	15	25	16	0.491	A	8.40E-01	1.15 (0.52-2.56)
rs1536129	199335814	CACNA1S	C/A	22	28	14	0.437	21	22	13	0.429	A	8.49E-01	1.15 (0.54-2.42)
rs16847737	199337023	CACNA1S	G/C	44	19	1	0.164	49	7	0	0.063	C	1.58E-02	3.18 (1.23-8.25)
rs1251765	199340314	CACNA1S	C/T	19	35	10	0.430	14	30	12	0.482	C	4.38E-01	1.47 (0.58-3.73)
rs998135	199342419	CACNA1S	T/C	3	25	36	0.242	4	22	30	0.268	C	6.59E-01	1.56 (0.33-7.31)
rs1325313	199342790	CACNA1S	C/T	5	17	42	0.211	2	22	32	0.232	T	3.54E-01	1.44 (0.68-3.00)

SNP_ID	Position	Gene	Allele	Case						Control				Risk allele	P-value	OD (95%CI)
				Genotype			MAF	Genotype			MAF					
				11	12	22		11	12	22						
rs12132807	199343137	CACNA1S	T/C	51	13	0	0.102	43	13	0	0.116	T	8.25E-01	1.18 (0.50-2.83)		
rs1325310	199345858	CACNA1S	C/T	11	27	24	0.395	9	9	18	0.420	T	5.64E-01	1.34 (0.62-2.85)		
rs1546416	199276179	CACNA1S	A/G	38	26	0	0.203	34	19	3	0.223	A	9.87E-02	N/A		
rs380625	199282919	CACNA1S	G/A	58	6	0	0.047	48	8	0	0.071	G	5.70E-01	1.61 (0.52-4.97)		
rs2297903	199297930	CACNA1S	A/C	2	31	31	0.273	1	21	34	0.205	A	2.02E-01	1.63 (0.80-3.40)		
rs16847613	199300343	CACNA1S	G/A	43	18	3	0.187	36	18	2	0.196	G	8.47E-01	1.14 (0.53-2.42)		
rs2297901	199302230	CACNA1S	G/T	34	21	9	0.305	29	23	4	0.277	T	2.55E-01	2.13 (0.62-7.33)		
rs3753960	199325707	CACNA1S	A/G	29	25	10	0.352	21	25	10	0.401	A	4.59E-01	1.38 (0.66-2.87)		
rs10449267	199338413	CACNA1S	A/G	6	33	25	0.352	4	29	23	0.330	A	7.49E-01	1.34 (0.36-5.03)		
rs10920115	199338507	CACNA1S	T/G	9	30	25	0.375	7	25	24	0.348	T	6.88E-01	1.17 (0.56-2.43)		
rs12135240	199340178	CACNA1S	T/C	47	14	3	0.156	45	9	2	0.116	C	3.96E-01	1.50 (0.63-3.50)		
rs2365293	199341868	CACNA1S	T/C	5	40	19	0.391	6	30	20	0.375	T	5.59E-01	1.32 (0.61-2.83)		
rs2297901	199302230	CACNA1S	G/T	34	21	9	0.305	29	23	4	0.277	T	2.55E-01	2.13 (0.62-7.33)		
rs3753960	199325707	CACNA1S	A/G	29	25	10	0.352	21	25	10	0.401	A	4.59E-01	1.38 (0.66-2.87)		
rs10449267	199338413	CACNA1S	A/G	6	33	25	0.352	4	29	23	0.330	A	7.49E-01	1.34 (0.36-5.03)		
rs10920115	199338507	CACNA1S	T/G	9	30	25	0.375	7	25	24	0.348	T	6.88E-01	1.17 (0.56-2.43)		
rs12135240	199340178	CACNA1S	T/C	47	14	3	0.156	45	9	2	0.116	C	3.96E-01	1.50 (0.63-3.50)		
rs2365293	199341868	CACNA1S	T/C	5	40	19	0.391	6	30	20	0.375	T	5.59E-01	1.32 (0.61-2.83)		

SNP_ID	Position	Gene	Allele	Case				Control				Risk allele	P-value	OD (95%CI)
				Genotype				Genotype						
				11	12	22	MAF	11	12	22	MAF			
rs6892117	151245178	GLRA1	A/G	27	28	9	0.359	22	28	5	0.345	G	5.70E-01	1.60 (0.51-5.21)
rs1549622	151246242	GLRA1	T/C	28	29	7	0.336	21	26	9	0.393	T	4.20E-01	1.56 (0.54-4.50)
rs890832	151250523	GLRA1	G/A	0	14	50	0.109	1	5	50	0.062	G	1.41E-01	2.33 (0.83-6.56)
rs1465555	151269891	GLRA1	T/C	5	29	30	0.305	9	25	22	0.384	C	2.21E-01	2.26 (0.71-7.20)
rs7709656	151270918	GLRA1	G/A	49	13	2	0.133	50	5	1	0.062	A	8.54E-02	2.58 (0.91-7.11)
rs2071221	151284499	GLRA1	G/A	14	33	17	0.477	14	25	17	0.473	G	6.88E-01	1.21 (0.54-2.67)
rs186217	151306772	GLRA1	G/T	25	33	6	0.352	18	27	11	0.437	G	1.23E-01	2.36 (0.81-6.88)
rs12667032	154037514	DPP6	G/A	49	9	3	0.123	46	8	1	0.091	A	5.26E-01	2.79 (0.28-27.67)
rs937009	154032471	DPP6	T/C	10	23	31	0.336	3	25	28	0.277	T	8.41E-02	3.27 (0.85-12.55)
rs1488927	154033602	DPP6	C/G	10	23	30	0.341	3	21	32	0.241	C	8.19E-02	3.33 (0.87-12.80)
rs1488926	154033792	DPP6	C/T	10	23	31	0.336	3	25	28	0.277	C	8.41E-02	3.27 (0.85-12.55)
rs6960383	154012209	DPP6	G/A	4	19	41	0.211	1	9	46	0.098	G	2.08E-02	2.55 (1.10-6.06)
rs10267037	154020828	DPP6	G/A	8	23	33	0.305	2	17	37	0.187	G	5.16E-02	3.86 (0.78-18.99)
rs6975262	154034857	DPP6	A/C	10	23	31	0.336	3	25	28	0.277	A	8.41E-02	3.27 (0.85-12.55)
rs1080445	154035665	DPP6	G/A	52	11	1	0.102	43	13	0	0.116	G	6.54E-01	1.31 (0.54-3.17)
rs749120	154038740	DPP6	G/T	11	28	25	0.391	3	27	26	0.295	G	5.07E-02	3.67 (0.97-13.89)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ มีความแตกต่างกันของ allelic และ genotypic frequencies 25 จาก 55 htSNPs ที่ใกล้เคียงตำแหน่ง intron3 ของ GABRA3 เปรียบเทียบระหว่าง THPP และกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยมีค่า p value ที่ต่ำที่สุดคือ 2.3×10^{-4} มีค่า odds ratio 7.87 (95%CI; 2.23-27.76). พบว่าทั้ง 25 SNPs อยู่ใน LD block เดียวกันและตั้งอยู่ระหว่าง Intron 2 และ 3 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 4 เปรียบเทียบค่า $-\log p$ value ที่ตำแหน่งต่างๆของ htSNPs ใกล้ยีน GABRA3

แผนภูมิที่ 4 แสดงค่า $-\log P$ value plots, genomic structure และ LD map ของ GABRA3



ตารางที่ 9 ตารางสรุปผลการทำ htSNPs genotyping ของ 55 SNPs ใกล้ GABRA3

No.	dbSNP ID	Position ^a	Alleles	Case				Control		Risk allele	P-value (Fisher's exact test)	OR (95% CI)
				Genotype		MAF	Genotype		MAF			
				1	2		1	2				
1	rs11796848	151167374	C/A	69	12	0.148	71	4	0.053	A	6.53E-02	3.09 (0.95-10.04)
2	rs5925155	151208574	G/A	67	14	0.173	63	10	0.133	A	6.58E-01	1.32 (0.55-3.17)
3	rs2194897	151163760	C/G	47	34	0.420	53	22	0.293	G	1.33E-01	1.74 (0.90-3.39)
4	rs6526084	151145136	A/G	57	23	0.288	59	16	0.213	G	3.55E-01	1.49 (0.71-3.10)
5	rs5970229	151139648	A/T	62	19	0.235	58	17	0.227	N/A	1.00E+00	N/A
6	rs6627549	151121380	A/G	74	7	0.086	56	17	0.227	A	1.47E-02	3.21 (1.25-8.27)
7	rs12688452	151268341	G/A	74	7	0.086	56	17	0.227	G	1.47E-02	3.21 (1.25-8.27)
8	rs5970264	151218561	C/G	60	20	0.250	70	3	0.041	G	4.49E-04	7.78 (2.20-27.46)
9	rs12007663	151165599	C/G	58	23	0.284	55	20	0.267	G	8.59E-01	1.09 (0.54-2.20)
10	rs6627550	151132182	A/G	67	14	0.173	55	20	0.267	A	1.78E-01	1.74 (0.81-3.76)
11	rs3947525	151124506	C/G	45	35	0.438	39	35	0.473	C	7.46E-01	1.15 (0.61-2.18)
12	rs750841^b	151216374	T/A	61	20	0.247	72	3	0.040	A	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
13	rs12688628^b	151216451	T/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
14	SNP1 ^b	151370420	C/A	47	34	0.420	42	31	0.425	N/A	1.00E+00	N/A
15	rs11094568^c	151207908	A/T	61	20	0.247	72	3	0.040	T	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
16	rs875478^c	151215734	T/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)

No.	dbSNP ID	Position ^a	Alleles	Case			Control			Risk allele	P-value (Fisher's exact test)	OR (95% CI)
				Genotype			Genotype					
				1	2	MAF	1	2	MAF			
17	rs5970265 ^c	151218653	A/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
18	rs5969888 ^c	151219413	G/A	61	20	0.247	72	3	0.040	A [~]	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
19	rs6627574 ^c	151221892	C/T	61	20	0.247	72	3	0.040	T	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
20	rs12396220 ^c	151224227	T/C	61	20	0.247	72	3	0.040	C	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
21	rs12013373 ^c	151224400	A/G	61	20	0.247	71	3	0.041	G	4.56E-04	7.76 (2.20-27.38)
22	rs5970267 ^c	151228525	G/A	61	20	0.247	72	3	0.040	A	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
23	rs5970268 ^c	151230888	G/A	61	20	0.247	72	3	0.040	A	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
24	rs11795573 ^c	151231829	A/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
25	rs5970269 ^c	151233399	G/A	61	19	0.238	72	3	0.040	A	4.02E-04	7.48 (2.11-26.47)
26	rs1565610 ^c	151240061	G/A	61	20	0.247	72	3	0.040	A	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
27	rs2201169 ^c	151240971	A/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
28	rs11094571 ^c	151243074	T/C	61	19	0.238	72	3	0.040	C	4.02E-04	7.48 (2.11-26.47)
29	rs1492293 ^c	151243408	A/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
30	rs6526099 ^c	151250448	A/T	61	20	0.247	72	3	0.040	T	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
31	rs6653477 ^c	151254381	A/C	61	20	0.247	72	3	0.040	C	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
32	rs6653443 ^c	151259417	A/C	61	20	0.247	72	3	0.040	C	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)
33	rs5970281 ^c	151263963	A/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)

No	dbSNP ID	Position ^a	Alleles	Case				Control				Risk allele	P-value (Fisher's exact test)	OR (95% CI)
				Genotype		MAF	Genotype		MAF					
				1	2		1	2						
34	rs5970283^c	151265291	C/T	61	20	0.247	72	3	0.040	T	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)		
35	rs2201171^c	151273232	G/T	61	20	0.247	72	3	0.040	T	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)		
36	rs6526102^c	151274256	A/G	61	20	0.247	72	3	0.040	G	2.23E-04	7.87 (2.23-27.76)		
37	rs389292	151292110	C/T	58	23	0.284	60	14	0.189	T	1.90E-01	1.70 (0.80-3.62)		
38	rs5970294	151320857	C/T	62	19	0.235	62	13	0.173	T	4.28E-01	1.46 (0.66-3.22)		
39	rs6526107	151333472	C/T	35	46	0.432	35	40	0.467	T	7.48E-01	1.15 (0.61-2.16)		
40	rs3902802	151347857	A/G	73	8	0.099	66	9	0.120	A	7.99E-01	1.24 (0.45-3.41)		
41	rs6526109	151350041	C/A	8	72	0.100	8	66	0.108	A	1.00E+00	1.09 (0.39-3.08)		
42	rs6526110	151353914	A/G	40	41	0.494	31	44	0.413	A	3.38E-01	1.38 (0.74-2.61)		
43	rs10482215	151362282	A/T	52	29	0.358	51	24	0.320	T	7.35E-01	1.19 (0.61-2.30)		
44	rs6526113	151367997	A/G	53	28	0.346	52	22	0.297	G	6.06E-01	1.25 (0.63-2.46)		
45	rs5970309	151373571	T/G	47	33	0.413	45	30	0.400	G	1.00E+00	1.05 (0.55-2.00)		
46	rs6627597	151382065	A/G	53	28	0.346	51	24	0.320	G	8.65E-01	1.12 (0.58-2.19)		
47	rs6627600	151399613	T/A	54	27	0.333	51	23	0.311	A	8.64E-01	1.11 (0.56-2.18)		
48	rs5969898	151405698	A/G	22	59	0.272	28	47	0.373	G	2.29E-01	1.60 (0.81-3.15)		
49	rs12008828	151407087	C/T	76	5	0.062	70	5	0.067	C	1.00E+00	1.09 (0.30-3.91)		
50	rs12353750	151414854	C/T	80	1	0.012	74	1	0.013	N/A	1.00E+00	N/A		

No.	dbSNP ID	Position ^a	Alleles	Case				Control		Risk allele	P-value (Fisher's exact test)	OR (95% CI)
				Genotype		MAF		Genotype				
				1	2			1	2			
51	rs4828697	151417383	C/T	37	44	0.457	29	46	0.387	C	4.19E-01	1.33 (0.70-2.52)
52	rs17326876	151423704	G/T	57	24	0.296	55	19	0.257	T	5.96E-01	1.22 (0.60-2.47)
53	rs2142466	151429146	G/A	18	63	0.222	19	55	0.257	A	7.07E-01	1.21 (0.58-2.53)
54	rs4379587	151446467	A/G	33	47	0.413	26	49	0.347	A	4.13E-01	1.32 (0.69-2.54)
55	rs4385609	151461027	C/T	68	13	0.160	61	14	0.187	C	6.78E-01	1.20 (0.52-2.75)

The significantly association study is shown in bold

CI confidence interval

N/A Not Available

^a From NCBI Genome build 36.3_NT 011726.13 reference

^b Included SNP in this study that shown significance in previous study

^c Additional captured SNP by the rs5970264

สรุปผลการศึกษา GWAS-Pooled DNA study

1. พบความสัมพันธ์ของ SNPs ใกล้ยีน *DPP6* และ *THPP* แต่ไม่สามารถยืนยันผลการศึกษาที่ได้เมื่อทำ individual genotyping ในประชากรที่มากขึ้น
2. จากการทดสอบหาความสัมพันธ์ของ SNPs ใกล้ candidate ion channel genes ได้แก่ *SCN4A*, *CACNA1S*, *GLRA1* ไม่พบความสัมพันธ์กับโรค THPP
3. พบความสัมพันธ์ของ htSNPs 25 SNPs ที่ใกล้ intron 3 ของยีน *GABRA3* ซึ่งเป็นการยืนยันผลการศึกษาที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้

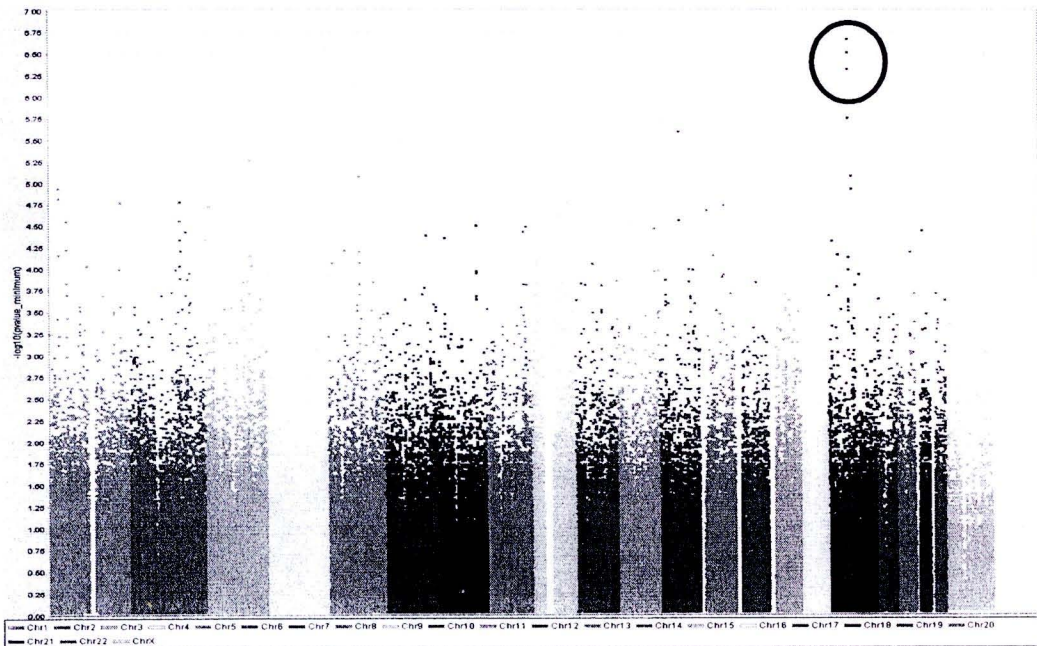
3. ผลการศึกษา GWAS individual study

- ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา GWAS เพื่อหา susceptible loci ต่อ THPP โดยเป็นการเปรียบเทียบ allele frequencies ของ htSNPs บน Illumina Human 610-Quad Bead Chip (San Diego, CA, USA). ในผู้ป่วย THPP 78 คน และกลุ่มควบคุม 74 คน จากจำนวน SNPs ทั้งหมด 600,420 SNPs ที่ได้รับการ genotyped พบว่ามีจำนวน 498,465 autosomal SNPs และ 9,928 SNPs ของ X chromosome ที่มีค่า SNPs call rate มากกว่า 0.99

- จากการคำนวณทางสถิติพบว่า ไม่พบมีความแตกต่างของ SNPs allele frequencies ที่ได้ค่า genome wide significant p value $<10^{-8}$ อย่างไรก็ตามก็พบ SNP rs312729 ที่โครโมโซม 17 มีความแตกต่างของ allele frequencies น้อยที่สุดดังแผนภูมิที่ 5 ($P = 2.09 \times 10^{-7}$)

- ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ individual genotyping ด้วย multiplex-PCR based Invader assay. เพื่อยืนยันผลของ Illumina assay โดยคัดเลือก 20 SNPs แรกที่แสดงค่า p value ที่ต่ำที่สุดจากการคำนวณด้วย Fisher exact test พบว่าค่า allele frequencies and genotype frequencies ของ SNPs ที่ทำการทดสอบด้วย Invader platform มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จาก Illumina assay

แผนภูมิที่5แสดง-log10 P-value plotsจากผลการศึกษา genome-wide association study. ทั้งนี้ค่า P value ได้จากการคำนวณจากFisher's exact tests ที่ต่ำที่สุดโดยการเปรียบเทียบจาก 3 รูปแบบของการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้แก่ dominant, recessive และ allele frequency model.



ผลการทดสอบในreplication cohort

- ผู้วิจัยได้ทำการตรวจ individual genotyping top 20 SNPs ใน replication cohort ที่ประกอบด้วย THPP 28 คน และกลุ่มควบคุม 48 คน ได้ผลยืนยัน SNPs ที่มีค่า p value ต่ำสุดคือ rs312729 บนโครโมโซม 17
- ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบ fine mapping โดยการ individual genotyping htSNPs โดยเลือกจาก SNPs ที่มีค่า $p > 0.8$, $MAF > 0.1$ ทั้ง cohort 1 และ 2 อีก 57 SNPs ที่ใกล้เคียงตำแหน่ง rs312729 ในระหว่าง 65.65-65.85 Mb (ตารางที่ 10) เพื่อหา SNPs ที่มีค่า p value ต่ำที่สุดที่สัมพันธ์กับโรค THPP จากผลการทำ fine mapping พบว่า rs623011 ให้ค่า p-values ต่ำที่สุดดังตารางที่ 11 ทั้งใน test cohort และ validation ($P = 3.44 \times 10^{-5}$, $OR = 5.13$; 95% $CI = 1.87-14.1$; combined-analysis $P = 3.71 \times 10^{-12}$, $OR = 5.46$; 95% $CI = 3.04-9.83$)

ตารางที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของ 57 SNPs จากการทำ fine mapping study ในผู้ป่วย THPP ชาวไทย

SNP	Chromosome position	Allele (1/2)	Case				Control				P-value		
			11		12		11		12				
			11	12	22	Freq of allele 1	11	12	22	Freq of allele 1	1 vs 2	11 vs 12+22	11+12 vs 22
rs6501379	65651635	T / C	55	21	1	0.851	56	16	0	0.889	3.91E-01	4.53E-01	1.00E+00
rs236512	65677948	C / G	34	36	7	0.675	28	34	10	0.625	3.96E-01	6.18E-01	4.43E-01
rs173135	65683921	C / T	53	23	1	0.838	62	10	0	0.931	1.83E-02	1.83E-02	1.00E+00
rs1544490	65688484	A / G	23	37	17	0.539	21	36	15	0.542	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
rs4328485	65689360	C / A	20	39	18	0.513	21	37	14	0.549	5.63E-01	7.16E-01	6.90E-01
rs12949668	65694454	G / C	68	7	2	0.929	40	31	1	0.771	1.38E-04	7.92E-06	1.00E+00
rs17775970	65697514	C / T	56	18	3	0.844	53	16	3	0.847	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
rs8079702	65702421	A / G	21	44	12	0.558	21	34	17	0.528	6.42E-01	8.56E-01	3.01E-01
rs3744486	65705638	G / A	26	44	7	0.623	32	29	11	0.646	7.19E-01	2.39E-01	3.17E-01
rs1468473	65712954	C / T	26	39	12	0.591	22	46	4	0.625	5.55E-01	7.27E-01	6.38E-02
rs236591	65718183	T / C	20	39	18	0.513	10	40	22	0.417	1.05E-01	1.01E-01	3.59E-01
rs236594	65719222	A / G	30	38	9	0.636	25	35	12	0.590	4.75E-01	6.14E-01	4.81E-01
rs8076345	65724145	G / A	61	14	2	0.883	51	21	0	0.854	4.95E-01	2.60E-01	4.97E-01
rs236524	65725094	G / A	24	37	16	0.552	13	38	21	0.444	8.19E-02	8.73E-02	2.60E-01
rs236530	65729066	C / T	17	53	7	0.565	11	46	15	0.472	1.31E-01	3.04E-01	6.32E-02
rs189323	65733612	A / G	44	28	5	0.753	30	36	6	0.667	1.25E-01	7.19E-02	7.60E-01
rs2366491	65733830	C / T	58	19	0	0.877	45	27	0	0.813	1.49E-01	1.11E-01	1.00E+00
rs12150382	65734367	G / A	59	15	3	0.864	41	29	2	0.771	4.99E-02	1.44E-02	1.00E+00
rs236550	65758966	C / T	47	26	4	0.779	32	35	5	0.688	8.78E-02	4.97E-02	7.39E-01
rs236562	65767890	A / G	37	33	7	0.695	30	34	8	0.653	4.60E-01	5.10E-01	7.88E-01

SNP	Chromosome position	Allele (1/2)	Case				Control				P-value	
			11	12	22	Freq of allele 1	11	12	22	Freq of allele 1		
rs9905884	65769333	A / C	39	33	4	0.730	12	41	19	0.451	4.01E-06	1.11E-06
rs992072	65769803	G / T	39	34	4	0.727	10	42	20	0.431	6.36E-07	2.11E-07
rs623011	65771041	A / G	43	28	4	0.760	12	40	20	0.444	2.76E-07	3.23E-08
rs9913349	65771665	C / T	39	34	4	0.727	11	41	20	0.438	1.47E-06	3.90E-07
rs4968804	65772253	G / A	62	15	0	0.903	41	27	4	0.757	3.10E-03	1.00E-03
rs11077484	65772311	G / A	66	11	0	0.929	46	22	4	0.792	3.92E-03	6.79E-04
rs236511	65775691	G / C	41	32	4	0.740	12	40	20	0.444	1.19E-06	2.98E-07
rs4968887	65776140	C / T	64	12	0	0.921	41	27	4	0.757	6.39E-04	1.15E-04
rs2529681	65776392	T / G	41	32	4	0.740	12	40	20	0.444	1.19E-06	2.98E-07
rs236499	65778101	A / G	42	33	1	0.770	12	43	17	0.465	1.06E-07	9.94E-08
rs236500	65778619	T / A	42	32	3	0.753	13	42	17	0.472	1.94E-06	8.30E-07
rs12453584	65779328	G / A	67	9	0	0.941	46	22	4	0.792	1.32E-03	2.25E-04
rs236504	65780331	T / C	51	25	1	0.825	35	32	5	0.708	4.20E-02	1.97E-02
rs7223705	65781307	C / A	42	32	2	0.763	13	40	18	0.465	5.46E-07	1.85E-07
rs1399185	65782550	G / T	42	32	3	0.753	13	42	17	0.472	1.94E-06	8.30E-07
rs1355915	65782640	G / C	42	32	3	0.753	13	42	17	0.472	1.94E-06	8.30E-07
rs8075271	65783655	G / A	64	12	1	0.909	40	28	4	0.750	1.12E-03	3.03E-04
rs8076950	65783673	A / C	64	12	1	0.909	40	28	4	0.750	1.12E-03	3.03E-04
rs17714860	65783949	G / A	64	9	1	0.926	38	30	3	0.746	7.94E-05	4.76E-05
rs11650230	65785348	C / T	64	12	1	0.909	40	28	4	0.750	1.12E-03	3.03E-04

SNP	Chromosome position	Allele (1/2)	CASE						Control			P-Value	
			11	12	22	Freq of allele 1			11	12	22	11 vs 12+22	11+12 vs 22
			69	8	0	0.948	48	21	3	0.813	1.99E-03	2.75E-04	6.99E-04
rs8074548	65787319	C / T	66	10	1	0.922	45	23	4	0.785	4.66E-03	8.67E-04	1.36E-03
rs2215027	65791032	G / A	67	9	0	0.941	46	22	4	0.792	1.32E-03	2.25E-04	8.39E-04
rs8068647	65793761	T / A	67	10	0	0.935	46	22	4	0.792	2.19E-03	3.03E-04	1.12E-03
rs4968890	65797863	C / T	70	7	0	0.955	46	22	4	0.792	2.52E-04	1.68E-05	7.09E-05
rs11077488	65801677	C / T	66	11	0	0.929	43	26	3	0.778	1.02E-03	2.37E-04	4.11E-04
rs6501384	65802728	C / T	60	15	1	0.888	39	29	4	0.743	4.97E-03	1.47E-03	1.65E-03
rs1606655	65808209	T / G	65	12	0	0.922	39	33	0	0.771	1.00E+00	3.11E-04	7.26E-05
rs1606656	65808380	C / T	67	9	1	0.929	45	22	4	0.789	3.43E-03	6.35E-04	1.03E-03
rs7222503	65811380	C / A	75	2	0	0.987	67	5	0	0.965	1.00E+00	2.69E-01	2.64E-01
rs7208007	65812076	G / C	52	24	1	0.831	33	34	5	0.694	1.44E-02	6.23E-03	8.47E-03
rs312707	65812231	C / A	67	9	1	0.929	45	22	4	0.789	3.43E-03	6.35E-04	1.03E-03
rs7225313	65814881	C / A	67	10	0	0.935	43	29	0	0.799	1.00E+00	5.18E-04	1.74E-04
rs17715938	65827243	T / C	69	8	0	0.948	48	21	3	0.813	1.99E-03	2.75E-04	6.99E-04
rs16975551	65828054	C / T	69	8	0	0.948	48	21	3	0.813	1.99E-03	2.75E-04	6.99E-04
rs11653587	65828273	G / A	67	10	0	0.935	43	26	3	0.778	5.01E-04	1.00E-04	1.74E-04
rs10775360	65837463	C / T	68	9	0	0.942	48	19	5	0.799	2.65E-03	2.21E-04	1.63E-03
rs10512574	65849559	T / C											

77 THPP cases and 72 controls

Chromosome positions of the SNPs were derived from dbSNP build 130.

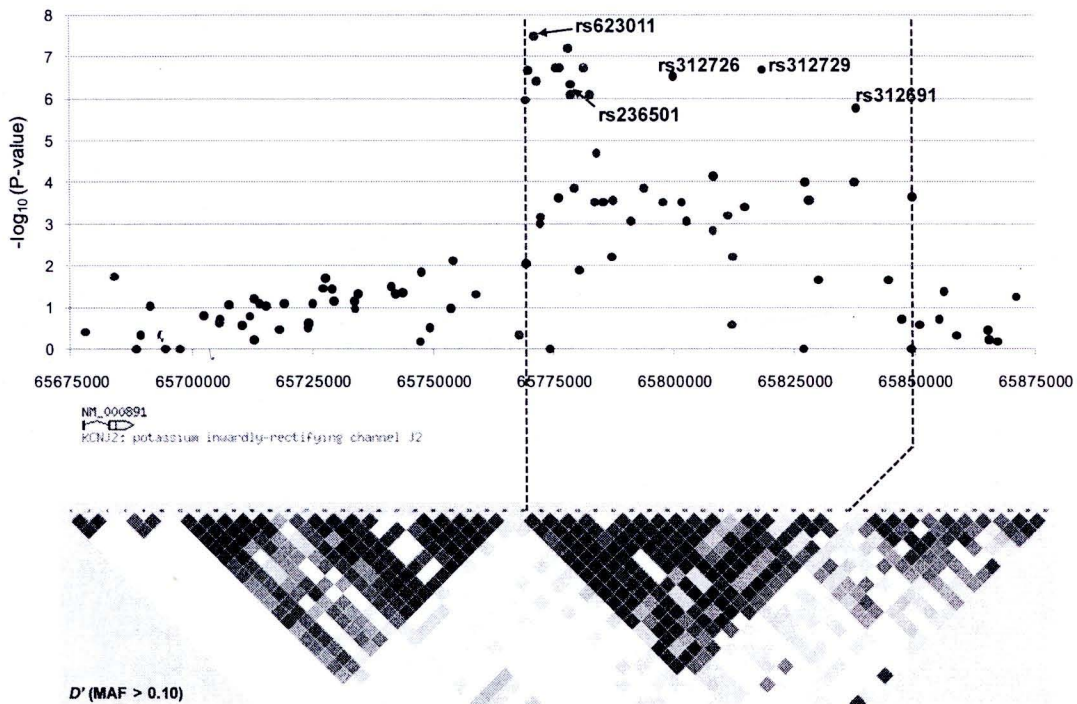
ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของ SNP rs623011 และ THPP ที่ใช้ในการศึกษาแบบ GWAS และการทดสอบยืนยันใน replication cohort

Allele (1/2)	Case						Control						P-value	Odds ratio ^a	95% confidence interval ^a
	Freq of risk allele (A)						Freq of risk allele (A)								
	11	12	22	11	12	22	11	12	22	11	12	22			
First stage	A	43	28	4	0.760	12	40	20	0.444	3.23E-08	4.76E-07	2.51E-04	6.72	3.11-14.5	
Replication		19	7	2	0.804	14	16	18	0.458	3.44E-05	1.65E-03	5.89E-03	5.13	1.87-14.1	
Combined		62	35	6	0.772	26	56	38	0.450	3.71E-12	4.95E-09	6.05E-07	5.47	3.04-9.83	

Freq, frequency^a Odds ratios and confidence intervals were calculated using the non-risk genotype (12+22) as reference.

จากการตรวจสอบตำแหน่งของ SNP rs623011 พบว่าอยู่ 75 kb ไปทาง 3' UTR ของ *KCNJ2* ดัง
ในแผนภูมิที่ 6

แผนภูมิที่ 6 แสดงค่า Log_{10} P-value plots, linkage disequilibrium (LD) map and genomic
structure ของ chromosome 17q24.3 ใกล้ยีน *KCNJ2*.



สรุปผลการศึกษา GWAS individual study

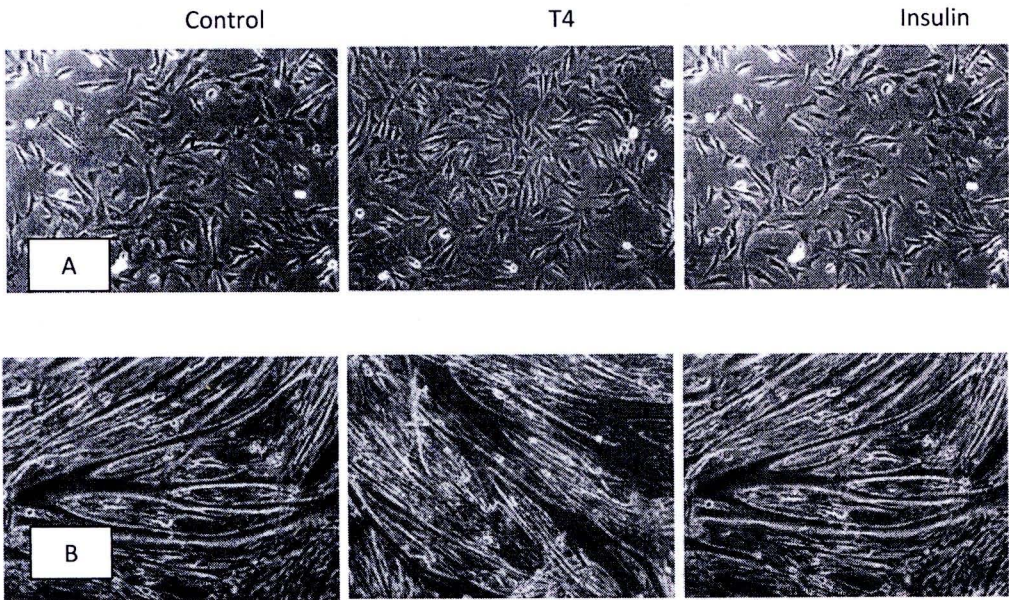
1. จากการศึกษาด้วยวิธี GWAS ทำให้พบ SNP rs312729 เป็น SNP ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค THPP ชาวไทยมากที่สุด
2. จากการตรวจสอบด้วย fine mapping และทำการยืนยันผลใน replication cohort พบว่า SNP rs623011 อยู่ที่ตำแหน่ง 75 Mb ใกล้ 3' UTR ของ *KCNJ2* เป็น SNP ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค THPP มากที่สุดโดยพบว่าได้ค่า genome-wide significant เมื่อ combine analysis (combined-analysis $P = 3.71 \times 10^{-12}$, OR = 5.46; 95% CI= 3.04-9.83)

ผลการศึกษา Functional study บน เซลล์ C2C12

- ไม่พบ การเปลี่ยนแปลงทาง morphological และ functional change หลังจากเติม Thyroxine หรือinsulin ในเซลล์ C2C12 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบมี Cell growth 70-80% confluence ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการเลี้ยงเซลล์ ดังแผนภูมิที่ 7A เซลล์สามารถคงสภาพ spindle shape ได้
- หลังจาก incubate ด้วย media ควบคุม มีฮอร์โมนไทรอยด์ อินซูลิน myotube formation ยังคงได้ตามปกติไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม (แผนภูมิที่ 7B). Myotubes เหล่านี้มีการหดตัวได้เองตามปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

แผนภูมิที่ 7 แสดง C2C12 myoblast and myotube in the absent or present of hormone

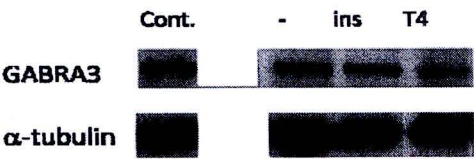
Control = non-treated, T4 = thyroxine hormone-treated, and insulin = insulin-treated



การศึกษา GABRA3 expression บนเซลล์ C2C12 ที่มี T4 and insulin hormone

ผลการศึกษาพบว่าฮอร์โมนไทรอยด์และอินซูลิน ไม่มีกระทบต่อการแสดงออกของ GABRA3 บน เซลล์ C2C12 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมดังแสดงในแผนภูมิที่ 8

แผนภูมิที่ 8 Western blot analysis of C2C12 myoblast



Cont.=Jurkat cell lysate, - = non-treated cell lysate,ins = insulin-treated, T4 = thyroxine-treated