Thesis Title Structural Analysis of α-Globin Genes of Haemoglobin Chiang Mai by Polymerase Chain Reaction and DNA Sequencing Techniques.

Author Mr. Pongsathorn Dhumtanom

M.S. Biochemistry

Examining Committee :

Assistant Professor Dr. Prachya Kongtaweelert	Chairman
Professor Torpong Sanguansermsri	Member
Assistant Professor Dr. Pranee Leechanachai	Member
Mr. Prasit Chanarat	Member

ABSTRACT

Haemoglobin Chiang Mai (Hb Chiang Mai) was first reported by Sanguansermsri in 1988. Cellulose acetate gel electrophoresis of the haemolysate of β-thalassemia-major child showed the faint band of Hb Chiang Mai separated from the others normal haemoglobins. Sitthipreechacharn (1994) reported the further haematologic study of β-thalassemia-major child's father and the clearly separated band of Hb Chiang Mai was also obtained from cellulose acetate gel electrophoresis. Hb Chiang Mai was found in 24.6% from the total haemoglobin by using HPLC technique. From the electrophoresis in 6M urea buffer, α-

globin chain isolated from the child's father was moved to the anode faster than the normal α-globin chain, indicating the point mutation presented in α-globin protein. In the present study, DNA sequence of α-globin genes from the child's father were analysed. Specific α_1-and α_2-globin genes amplification products were obtained by using the developed PCR system. Purified PCR products were then used as the templates for Chain-termination cycle sequencing. The point mutations observed from the sequencing data were confirmed by digestion with the specific restriction enzymes.

According to the sequencing data of Hb Chiang Mai's α-globin genes, the two single base substitutions were found in each α_1-and α_2-globin gene and confirmed by digestion with *Alw44* I and *Stu* I, respectively. The first single base substitution, G-->C, occurred at the nucleotide number 10853 (GeneBank, HUMHBA4) which corresponding to the amino acid substitution of Aspartic acid to Histidine (Asp-->His) at the amino acid residue 74 in exon 2 ($\alpha_1^{74\ \text{Asp-->His}}$). This was aggreed with the study of Sitthipreechacharn (1994) that the amino acid substitution occurred in α-globin chain of Hb Chiang Mai was the acidic to basidic amino acid which caused the separation of the abnormal haemoglobin from the normal Hb A in cellulose acetate gel electro-

phoresis. This type of haemoglobin variant was originally called Hb Mahidol (Hb Q-Thailand, $\alpha_1{}^{74\ Asp\text{-->}His}$).

The other single base substitution, C-->G, occurred at the nucleotide number 7330 (GeneBank, HUMHBA4) which resulted in the basidic to basidic amino acid substitution. Histidine was substituted by Glutamine at the amino acid residue 122 in exon 3 ($\alpha_2{}^{122\ His\text{-->}Gln}$).

Hb Mahidol has been reported to link to the leftward deletional α_2-globin gene (α-thalassemia-2 leftward deletion, -4.2 kb). Combining with the results from the restriction enzyme digestion experiments, it can be hypothesized that the father of the β-thalassemia-major child, the study subject in this study, has two haemoglobin chain variants, Hb Mahidol and Hb Westmead, located in the α_1-and α_2-globin gene respectively. These variants were found on the different chromatids of chromosome 16.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์แอลฟ่า โกลบิน ยีนของฮีโมโกลบิน เชียงใหม่ โดยวิธีโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น และ ดีเอนเอ ซีเควนซิ่ง
ชื่อผู้เขียน	นายพงศธร ธรรมถนอม
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
ศ.ดร.ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี	กรรมการ
ผศ.ดร.ปราณี ลี้ชนะชัย	กรรมการ
อาจารย์ประสิทธิ ชนะรัตน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินเชียงใหม่ ถูกรายงานการค้นพบเป็นครั้งแรก โดย ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ในปี 1988 โดยเมื่อทำการศึกษาฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในเลือดของเด็กชายคนหนึ่งซึ่งป่วยด้วยอาการของโรค เบต้า ธัลลัสซีเมียร์ เมเจอร์ โดยอาศัยเซลลูโลส อะซิเตท เจล อิเลคโตรโฟรีลิส สามารถแยกฮีโมโกลบินเชียงใหม่ ออกจากฮีโมโกลบินเอปกติได้ รจนา สิทธิปรีชาชาญ ได้รายงานการศึกษาเพิ่มเติมในบิดาของเด็กชายดังกล่าว ในปี 1994 ว่าสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินเชียงใหม่ ได้ด้วยเทคนิคเดียวกันนั้น นอกจากนั้น ยังสามารถคำนวณปริมาณของ ฮีโมโกลบินเชียงใหม่ได้จากการใช้ ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตรกราฟฟี่ (HPLC) ว่าพบเป็น 24.6

เปอร์เซ็นต์ของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมด และความผิดปกติเกิดขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุของฮีโมโกลบินเชียงใหม่นั้นเกิดกับ อัลฟ่า โกลบิน เชน เนื่องมาจากการศึกษาโดยอาศัยการทำ โกลบินอีเลคโตรโฟรีสิส ใน ยูเรีย บัฟเฟอร์ อย่างไรก็ตามรายงานฉบับดังกล่าวไม่ได้ทำการศึกษาสาเหตุของความผิดปกตินี้ในระดับดีเอนเอ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาแอลฟ่า โกลบิน ยีน ของบิดาของผู้ป่วยเด็กชายดังกล่าว ซึ่งเป็นพาหะสำหรับฮีโมโกลบินเชียงใหม่ โดยอาศัย การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ แอลฟ่า-1 และแอลฟ่า-2 โกลบิน ยีนด้วยเทคนิค โพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น (พีซีอาร์) ที่ได้รับการพัฒนาแล้ว พีซีอาร์โปรดัค ที่ได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ ก่อนจะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการทำ ไซเคิล ซีเควนซิ่ง และลำดับการเรียงตัวของ นิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากแอลฟ่า โกลบิน ยีนปกติ นิวคลีโอไทด์ที่ผิดไปจะถูกนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการเลือก เรสตริกชั่น เอนไซม์ ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจสอบยืนยัน ความผิดปกตินั้นอีกครั้งหนึ่ง

จากผลการศึกษาพบว่า มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์เกิดขึ้นรวม 2 ตำแหน่งในแต่ละ แอลฟ่า โกลบิน ยีนของผู้ที่เป็นพาหะสำหรับฮีโมโกลบินเชียงใหม่รายนี้ โดยในตำแหน่งที่หนึ่ง เกิดจากการแทนที่ของเบส G ด้วย C ในตำแหน่งที่ 10853 (เมื่อเทียบกับตำแหน่งที่ระบุไว้ในแต่ละนิวคลีโอไทด์ของ แอลฟ่า โกลบิน ยีนปกติที่ได้ข้อมูลมาจาก GenBank. HUMHBA4) นิวคลีโอไทด์ที่ถูกแทนที่ดังกล่าวอยู่ใน เอคซอน-2 ของแอลฟ่า-1 โกลบิน ยีน ของฮีโมโกลบินเชียงใหม่ ซึ่งเท่ากับเป็นการแทนที่ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่เป็น กรดแอสพาร์ติค ด้วย ฮีสติดีน การค้นพบดังกล่าวสอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้โดย รจนา สิทธิปรีชาชาญ (1994) ที่ว่า การแทนที่ของกรดอะมิโนดังกล่าวเกิดในลักษณะของ อะซิดิค อะมิโนแอซิดถูกแทน ที่ด้วย เบสิดิค อะมิโน แอซิด ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนที่ได้ต่างจากฮีโมโกลบินเอ ในการทำ เซลลูโลส อะซิเตท เจล

อิเลคโตรโฟรีสิส ความผิดปกติในลักษณะนี้ สอดคล้องกับฮีโมโกลบินผิดปกติที่ชื่อว่า ฮีโมโกลบินมหิดล (Hb Mahidol, Hb Q-Thailand)

ในตำแหน่งที่สอง เกิดจากการแทนที่ของเบส C ด้วย G ในตำแหน่งที่ 7330 (เมื่อเทียบกับตำแหน่งที่ระบุไว้ในแต่ละนิวคลีโอไทด์ของ แอลฟ่า โกลบิน ยีนปกติที่ได้ข้อมูลมาจาก GeneBank, HUMHBA4) นิวคลีโอไทด์ที่ถูกแทนที่ดังกล่าวอยู่ในเอคซอน-3 ของ แอลฟ่า-2 โกลบิน ยีนของฮีโมโกลบินเชียงใหม่ ซึ่งเท่ากับเป็นการแทนที่ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่เป็น ฮีสติดีน ด้วย กลูตามีน ซึ่งเป็นการแทนที่ของกรดอะมิโนที่มีประจุใกล้เคียงกัน ความผิดปกติในลักษณะนี้สอดคล้องกับฮีโมโกลบินผิดปกติที่ชื่อว่า ฮีโมโกลบินเวสท์มีด (Hb Westmead)

เนื่องจากเคยมีรายงานว่า แอลฟ่า-1 โกลบิน ยีนที่มีความผิดปกติ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดฮีโมโกลบินมหิดลนั้น จะอยู่ทางขวา (3') ของ แอลฟ่า-2 โกลบิน ยีนที่ขาดหายไป (การขาดหายไปของลำดับดีเอนเอดังกล่าวยาว 4.2 กิโลเบส เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แอลฟ่า-ธัลลัสซีเมีย-2 เลฟท์วาร์ด ดีลีชั่น (-4.2 กิโลเบส) (α-thalassemia-2 leftward deletion (-4.2 kb)) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมารวมเข้ากับผลการทดลองที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าบิดาของผู้ป่วยเด็กโรคเบต้า ธัลลัสซีเมียเมเจอร์รายนี้ มีฮีโมโกลบินผิดปกติ 2 ชนิดคือ ฮีโมโกลบินมหิดล (Hb Mahidol) และ ฮีโมโกลบินเวสท์มีด (Hb Westmead) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการแทนที่ของ นิวคลีโอไทด์เบส ในแต่ละ แอลฟ่า-1 และ แอลฟ่า-2 โกลบิน ยีน ซึ่งอยู่คนละโครมาติด ในโครโมโซมที่ 16.