Thesis Title: Molecular Mutation and Incidence of the Non-Southeast Asian Deletion Type of α-Thalassemia-1 in Patients with Hemoglobin H Disease

Author: Mr. Chantawat Kantamool

Degree: Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assistant Professor Dr. Siriwan Ong-chai — Chairperson

Emeritus Professor Torpong Sanguansermsri — Member

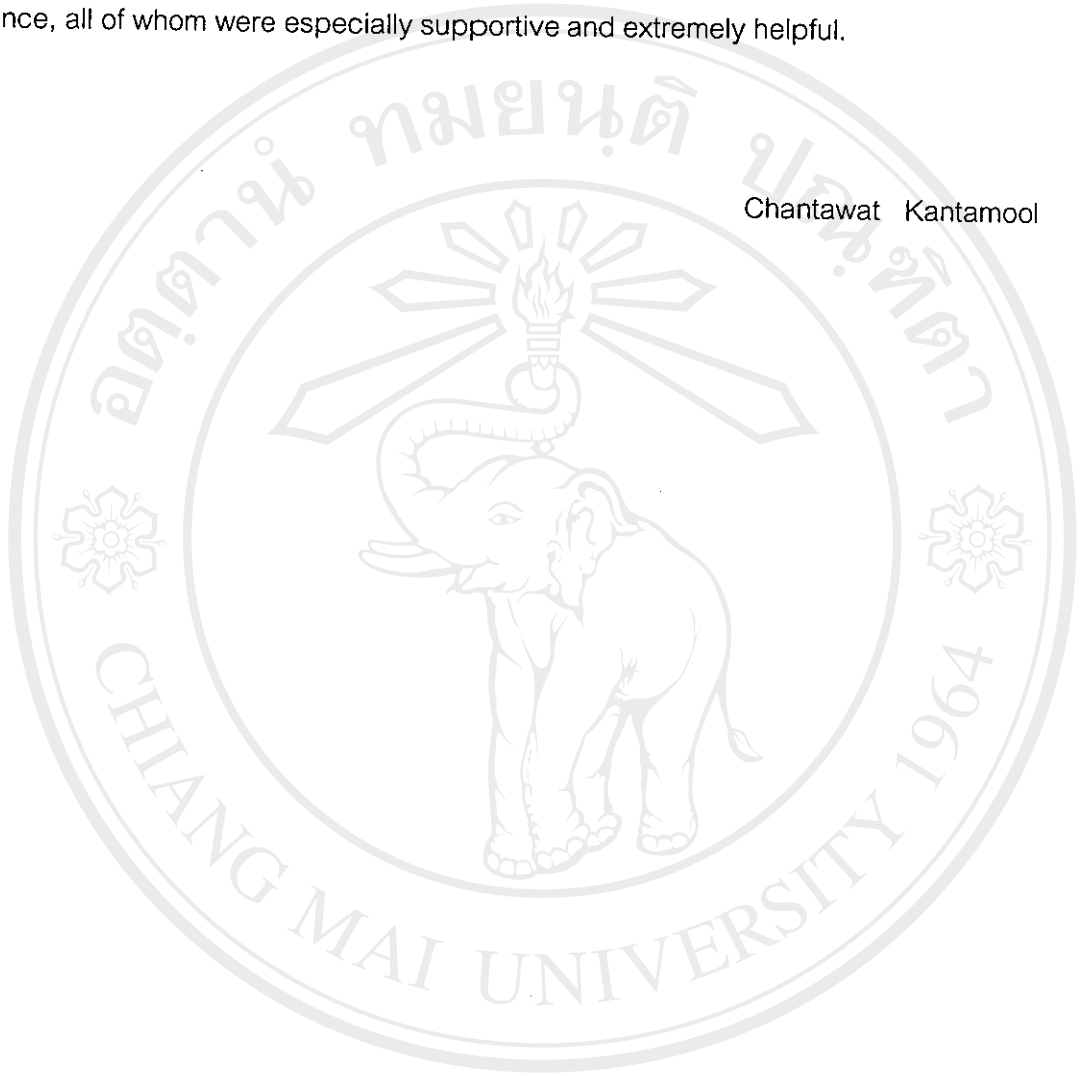
ABSTRACT

α-Thalassemia-1 is a hemolytic anemia resulting from deficient synthesis of α-globin chain. In Thailand, the most common α-thalassemia-1 deletion results from a deletion of approximately 20-kb that removes both α-genes but leaves the ζ_2- and $\psi\zeta_1$- genes intact, its so-called Southeast Asian deletion ($--^{SEA}$). Nevertheless there have been reports of Thai individuals with α-thalassemia-1 in whom there is a complete deletion of the ζ-α complex on one chromosome. They are called these the Filipino ($--^{FIL}$) and Thailand ($--^{THAI}$) deletions. Carriers are clinically normal, but homozygous α-thalassemia-1 or compound heterozygous α-thalassemia-1 can be produced a severe condition known as Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. A fetus with this

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Finally, I am especially grateful to my family, father, mother, brothers and Miss Aksara Thongprachum for their wonderful inspiration, useful guidance and emotional assistance, all of whom were especially supportive and extremely helpful.

Chantawat Kantamool



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

syndrome almost always either dies *in utero* or soon after birth. Therefore, the reliable detection of this deletion is useful for the genetic counseling and prenatal diagnosis.

Molecular characterization of α-thalassemia-1 used to be carried out using Southern blot analysis. The method is both labors intensive and expensive. Moreover, its success depends heavily on the quality of the genomic DNA under test and the quantity available. Thus, this method is not practical and suitable for the most laboratories.

In this study, we have developed a rapid approach to detect the three types of α-thalassemia-1 deletions by the multiplex PCR technique, which took a few hours to complete. Specific primers selectively amplified appropriate segments of the chromosome with the deletion and the normal chromosome under identical experimental conditions, and the PCR products were identified by electrophoresis on 2% agarose gel. The DNA sequencing technique was used to confirm the deletion breakpoints of each α-thalassemia-1 deletion types.

The multiplex PCR technique was employed to detect the α-thalassemia-1 deletion in 114 cases of Hb H disease in Maharaj Nakorn Chiang Mai hospital. Out of these 114 cases, 113 cases were heterozygous for $--^{SEA}$ deletion and only one was heterozygous for $--^{THAI}$ deletion. None of them has the $--^{FIL}$ deletion. Furthermore, we analyzed DNA from 33 Thai infants with the Hb Bart's hydrops fetalis. Only two out of 33 cases were of compound heterozygotes for the $--^{THAI}$ and $--^{SEA}$ mutants ($--^{THAI}/--^{SEA}$). The remaining 31 cases were homozygous for the common $--^{SEA}$ mutants ($--^{SEA}/--^{SEA}$). None of them has the compound heterozygotes for the $--^{THAI}$ or $--^{SEA}$ and $--^{FIL}$ mutants. To define the deletion breakpoints of each α-thalassemia-1 deletion types, the $--^{SEA}$ deletion, the 5' breakpoint lies between 26259 and 26260 of GenBank accession number Z84721 and the 3' breakpoint lies between 2608 and 2609 of Z69706, a total of 19,304 nucleotides were deleted. For the $--^{THAI}$ deletion, the 5' breakpoint lies between 10725 and 10726 of GenBank accession number Z84721 and the 3' breakpoint lies between 1220 and 1221 of Z69706, a total of 33,450 nucleotides were deleted. And the $--^{FIL}$ deletion breakpoint located within the completely homologous 21-bp segment. The 5' breakpoint lies

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

between 12483 to 12503 of GenBank accession number Z84721, and the 3' breakpoint lies between 204 and 224 of Z69706, a total of 30,656 nucleotides were deleted.

Since the population of Thailand is one of the highest frequencies of α-thalassemia in the world. Characterization of the molecular defects in population is importance for management and controls the spreading of the disease. Detection of the α-thalassemia-1 by multiplex PCR technique is convenient, reliable, and suitable for evaluated its incidence in population. In addition, this method should greatly facilitate the genetic counseling, prenatal diagnosis and prevention of the α-thalassemia in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผ่าเหล่าในระดับโมเลกุลและอุบัติการณ์ของอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ที่ไม่ใช่ชนิดเซาธ์อีสท์เอเชียน ดีลีชั่น ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช

ผู้เขียน นายฉันทวัฒน์ กันธะมูล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย ประธานกรรมการ

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ นายแพทย์ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี กรรมการ

บทคัดย่อ

อัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 เป็นโรคโลหิตจางชนิดหนึ่งเกิดจากการสร้างสายโกลบินชนิดอัลฟ่า (α-globin chain) ผิดปกติ อัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิดที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย เกิดจากการขาดหายในขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ซึ่งมีการขาดหายของ α-globin gene ทั้งสองยีนบนโครโมโซมที่ 16 ข้างหนึ่ง แต่การขาดหายนี้ไม่รวมยีน ζ_2 และ $\psi\zeta_1$ เรียกโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิดนี้ว่า Southeast Asian ($--^{SEA}$) deletion นอกจากนี้มีรายงานว่าพบโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิดที่มีการขาดหายไปของยีนทั้งหมดที่อยู่บนโครโมโซมที่ 16 ข้างหนึ่ง ได้แก่ ชนิด Thailand ($--^{THAI}$) และ Filipino ($--^{FIL}$) deletion ในประชากรไทย ผู้เป็นพาหะ (heterozygotes) ของโรคนี้จะไม่แสดงอาการของโรค แต่ถ้ามีการปฏิสัมพันธ์กันของยีนอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิดเดียวกัน (homozygous α-thalassemia-1) หรือต่างชนิดกัน (compound heterozygous α-thalassemia-1) จะก่อให้เกิดกลุ่มอาการรุนแรงที่เรียกว่า Hb Bart's hydrops fetalis ลูกอ่อนในครรภ์ที่เป็นโรคนี้จะตายตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือตายทันทีหลังคลอด ดังนั้นวิธีการตรวจหาผู้ที่เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พาหะของโรคนี้ที่มีความน่าเชื่อถือจึงมีความสำคัญต่อการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ตลอดจนการวินิจฉัยโรคก่อนคลอด

การศึกษาในระดับโมเลกุลของโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 วิธีดั้งเดิมที่ใช้คือ Southern blotting ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง แต่มีความยุ่งยากสลับซับซ้อน ใช้เวลานาน และเสียค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ยังต้องการใช้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงในปริมาณมากอีกด้วย จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การศึกษานี้เราได้พัฒนาเทคนิคที่มีความรวดเร็วในการตรวจหาโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว โดยเทคนิคที่เรียกว่า Multiplex PCR ในสภาวะที่เหมาะสมไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมียแต่ละชนิดจะเลือก amplify segment เป้าหมายที่เหมาะสมบนโครโมโซมที่มีการขาดหายของยีน หรือบนโครโมโซมปกติ และ PCR product จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจล agarose จากนั้นเทคนิค DNA sequencing จะถูกนำมาใช้ในการยืนยัน deletion breakpoint ของยีนในโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 แต่ละชนิด

เทคนิค Multiplex PCR ถูกนำมาใช้ตรวจหาชนิดของโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ในผู้ป่วยโรค Hb H ที่เข้ามารักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่จำนวน 114 ราย จากตัวอย่างทั้งหมดพบว่ามีผู้ที่เป็นพาหะของโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิด $--^{SEA}$ deletion จำนวน 113 ราย และชนิด $--^{THAI}$ deletion มีเพียง 1 ราย โดยไม่พบชนิด $--^{FIL}$ deletion แต่อย่างใด นอกจากนี้เราได้ตรวจหาชนิดของยีนอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ใน DNA ตัวอย่างของลูกอ่อนที่เป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis จากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่จำนวน 33 ราย พบว่ามีเพียง 2 รายที่สาเหตุของโรคเกิดจากการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างยีนอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิด $--^{THAI}$ deletion กับ $--^{SEA}$ deletion ส่วนอีก 31 รายที่เหลือเกิดจากการปฏิสัมพันธ์กันเองของชนิด $--^{SEA}$ deletion โดยไม่พบสาเหตุของโรคที่เกิดจากการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างยีนอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิด $--^{FIL}$ deletion กับ $--^{SEA}$ deletion หรือ $--^{THAI}$ deletion แต่อย่างใด

สำหรับ Deletion breakpoint ของโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิด $--^{SEA}$ deletion จะมี breakpoint ทางด้านปลาย 5' อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 26,259 และ 26,260 (เมื่อเทียบกับตำแหน่งที่ระบุไว้ในแต่ละนิวคลีโอไทด์ของอัลฟ่าโกลบินยีนปกติที่ได้ข้อมูลมาจาก GenBank, Z84721) และ breakpoint ทางด้านปลาย 3' อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2,608 และ 2,609 (GenBank, Z69706) รวมแล้วมีการขาดหายไปทั้งหมด 19,304 นิวคลีโอไทด์

Deletion breakpoint ของชนิด $--^{THAI}$ deletion มี breakpoint ทางด้านปลาย 5' อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 10,725 และ 10,726 (GenBank, Z84721) และ breakpoint ทางด้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลาย 3' อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,220 และ 1,221 (GenBank, Z69706) รวมแล้วมีการขาดหายไปทั้งหมด 33,450 นิวคลีโอไทด์

และ Deletion breakpoint ของชนิด $--^{FIL}$ deletion จะอยู่ภายใน homologous segment ขนาด 21 เบส โดย breakpoint ทางด้านปลาย 5' อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 12,483 ถึง 12,503 (GenBank, Z84721) และ breakpoint ทางด้านปลาย 3' อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 204 ถึง 224 (GenBank, Z69706) รวมแล้วมีการขาดหายไปทั้งหมด 30,656 นิวคลีโอไทด์

เนื่องจากในประชากรไทยมีอุบัติการณ์ของโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมียสูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก การตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของโรคนี้ในประชากร จึงมีความสำคัญต่อการจัดการและควบคุมการแพร่ระบาดของโรค การตรวจหาโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค Multiplex PCR สามารถทำได้ง่าย มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการประเมินหาอุบัติการณ์ของโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมีย 1 ในประชากร นอกจากนั้นเทคนิคดังกล่าวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ และใช้ในการวินิจฉัยโรคก่อนคลอด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเป็นโรคอัลฟ่าธาลัสซีเมียในโอกาสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved