

**GENOME-WIDE SEARCH FOR DISEASE MODIFIER GENES  
IN  $\beta$ -THALASSEMIA**

**ORAPAN SRIPICHAJ**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2006**

**ISBN 974-04-7947-2  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาหาตัวแปรในจีโนมที่ทำให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน  
(GENOME-WIDE SEARCH FOR DISEASE MODIFIER GENES IN  $\beta$ -THALASSEMIA)

อรพรรณ ศรีพิชัย 4436738 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., สุทัศน์ ฟูเจริญ, พ.บ.,  
ม.ร.ว. ชัยฉูธรรม สวัสดิวัตน์, Ph.D., มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีนเดี่ยว แม้จะทราบถึงการกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรค แต่ปัญหาสำคัญที่ยังไม่สามารถอธิบายได้คือเหตุใดผู้ป่วยจึงมีความรุนแรงของการแสดงออกของโรคแตกต่างกัน

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหา ยีนที่อาจส่งเสริมหรือช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรค (modifier genes) ในผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี โดยศึกษาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด single nucleotide polymorphisms (SNPs) ในขั้นตอนแรกได้นำความถี่อัลลีลที่ตรวจวิเคราะห์ได้จาก DNA pools ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงมาเปรียบเทียบกับของผู้ป่วยที่มีอาการน้อย จาก SNPs ประมาณ 110,000 ตำแหน่งที่พบปรากฏอยู่บนยีนประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ในมนุษย์ พบว่า SNPs 620 ตำแหน่งมีอุบัติการณ์ความถี่ที่แตกต่างกันในผู้ป่วยสองกลุ่ม จากนั้นได้นำ SNPs เหล่านี้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ในผู้ป่วย 530 คน พบว่า SNPs 210 ตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับอาการแสดงออกของโรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย ซึ่ง SNPs ดังกล่าวพบปรากฏอยู่ทั้งในกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบิน ( $\beta$ -globin gene cluster) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอ็นไซม์หลายๆ ตัว โดยเฉพาะโปรตีนเอสในเม็ดเลือดแดง ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ การสื่อสารระหว่างเซลล์ และยีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ฯลฯ อย่างไรก็ตามการที่จะสามารถยืนยันความสำคัญของ SNPs หรือยีนเหล่านี้ในการเป็น modifier genes นั้น ต้องอาศัยการศึกษายืนยันในกลุ่มประชากรอื่นควบคู่กับการศึกษาเพิ่มเติมถึงหน้าที่ของยีนด้วย

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า  $\beta$ -globin gene cluster บนโครโมโซม 11p15.5 เป็น candidate loci ที่สำคัญ โดยพบว่า SNPs 45 ตำแหน่งที่ปรากฏอยู่บน LCR, ยีนเอพซีลอน-โกลบิน, แกมมา-โกลบิน, สุกโตเบต้า-โกลบินและ เดลต้า-โกลบิน อยู่ใน linkage disequilibrium เดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบอุบัติการณ์ความถี่ของ SNPs ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากและกลุ่มที่มีอาการน้อย พบว่า SNP ทุกตำแหน่งมีแตกต่างกันอย่างมีระดับนัยสำคัญน้อยกว่า  $1 \times 10^{-9}$  และมีค่า odds ratio อยู่ระหว่าง 2.04 ถึง 2.22 จากการศึกษาการแสดงออกของยีนพบว่า SNP haplotype มีความสัมพันธ์กับปริมาณการสร้างสายแกมมา-โกลบิน และระดับฮีโมโกลบินเอฟ (Hb F)

**GENOME-WIDE SEARCH FOR DISEASE MODIFIER GENES IN  
β-THALASSEMIA.**

ORAPAN SRIPICHAJ 4436738 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS : PRAPON WILAIRAT, Ph.D., SUTHAT FUCHAROEN,  
M.D., M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., MATHUROSE  
PONGLIKITMONGKOL, Ph.D.**ABSTRACT**

Despite similar genetic backgrounds, β-thalassemia/Hb E patients show a remarkable phenotypic diversity. The reasons underlying this clinical heterogeneity remain largely obscure.

To identify disease modifier genes, a large-scale association study with approximately 110,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within 99 percent of known and predicted human genes was performed in mild and severe β-thalassemia/Hb E patients. Allele frequencies for all tested SNPs were estimated in DNA pools of patients with extremely mild and severe courses, and 4,175 SNPs suggesting significant differences ( $P$ -value  $<0.02$ ) were selected for verification by repeated pooled DNA analysis. In order to determine precise allele and genotype frequencies, 620 significant SNPs ( $P$ -value  $<0.05$ ) from a second scan were selected for genotyping of the 503 individual patient DNA. This study observed associations of severe β-thalassemia with 210 variants in 160 genes/regions, particularly in genes included in proteolysis, apoptosis, signal transduction and regulation of gene expression. Further validation in an independent cohort is required to confirm the evidence of association and functional studies are required to confirm the importance of these variants as modifiers of β-thalassemia phenotype.

One of the candidate loci identified was located within the β-globin gene cluster on chromosome 11p15.5. High-density SNP mapping and haplotype analysis further revealed that 45 SNPs located in the LCR through the δ-globin gene have strong linkage disequilibrium with each other. All variants also conferred association with disease severity in β-thalassemia with an odds ratio between 2.04 to 2.22 and  $P$ -value less than  $1 \times 10^{-9}$ . Association of specific haplotype with up-regulation of γ-globin gene was observed from a quantitative gene expression study. This finding suggests that further biological function exploration of this region would be valuable and could yield a better understanding of γ-globin gene regulation and variation of Hb F in β-thalassemia.

**KEY WORDS : β-THALASSEMIA/ Hb E/ GENOTYPE-PHENOTYPE  
INTERACTION/ ASSOCIATION STUDY/ GENOME-WIDE  
SCAN**

209 P. ISBN 974-04-7947-2