



**DETECTION OF MUTATIONS IN THE FACTOR VIII GENE
BY mRNA ANALYSIS**

PRAPAPORN THANOOTARAKUL
#

อธิปัทนการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-664-415-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
899d
2000

45251 C.2

3836901 SIMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : HEMOPHILIA A / FACTOR VIII / MUTATION DETECTION
PRAPAPORN THANOOTARAKUL : DETECTION OF MUTATIONS IN
THE FACTOR VIII GENE BY mRNA ANALYSIS. THESIS ADVISORS : PA-
THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D.
134 p. ISBN 974-664-415-7

Hemophilia A is an X-linked bleeding disorder caused by deleterious mutations in the coagulation factor VIII gene. The factor VIII gene located at Xq28 and spanned 186 kb, is composed of 26 exons and transcribes mRNA with the length of about 9 kb. The molecular defects of factor VIII gene causing hemophilia A are heterogeneous, giving rise to clinical heterogeneity. The characterization of pathogenic mutations of the factor VIII gene allows the recognition of new mechanisms of functional disturbances of factor VIII. The molecular characterization of mutations in Thai hemophilia A patients in this study was carried out by the methods of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP), and direct DNA sequencing. The RT-PCR method for amplification across the inversion break-point region was used to screen the factor VIII gene inversion, which separates exons 1-22 from exons 23-26 and is found to be a common cause of severe hemophilia A. A combination of long RT-PCR of the factor VIII mRNA and PCR of factor VIII genomic DNA were used to isolate the factor VIII sequence for screening small molecular defects. The entire factor VIII cDNA sequences were amplified and fractionated into seven overlapping fragments by nested PCR. The exon 14 was amplified into two overlapping fragments either by using long cDNA or genomic DNA as a template. The fragments were digested with appropriate restriction enzymes to generate the size suitable for SSCP. DNA sequencing was used to identify mutations detected by the SSCP screening. Once the mutations were identified, the allele-specific amplification (ASA) was developed and used for analysis in all available members of the family to confirm the identification and examine the carrier status.

RT-PCR analysis for the gene inversion of 11 samples from severe hemophilia A patients revealed the discontinuity of RNA when a PCR on reverse transcribed RNA was performed across exons 22-23, demonstrating the presence of factor VIII gene inversion. Ten of these patients have been investigated to have gene inversions by Southern-blot hybridization. The RT-PCR method developed is useful for screening factor VIII gene inversion. cDNA analysis of 18 hemophilia A patients revealed the skipping of total 154 bp of exon 15 combined with the absence of the first 47 bp of exon 16 in one patient due to the G to T transversion at the donor splice site of intron 15 and the activation of a cryptic acceptor splice site within exon 16. The SSCP analysis was performed in 8 hemophilia A patients from 6 families. The mobility shifts were observed in the same cDNA fragment in 2 patients of the same family. From DNA sequencing, it was found that there was a nucleotide substitution at codon 233, ACA>ATA, in exon 6 of the factor VIII gene. This mutation resulted in a novel missense mutation (T233I) in the A1 domain. These results suggest that carrier status in members of both families could be detected by the ASA technique.

3836901 SIMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

ประเภทร ฐานตรกุล : การตรวจมิวเตชันของแฟกเตอร์แปดยีนโดยการวิเคราะห์ เอ็ม-อาร์เอ็นเอ
(DETECTION OF MUTATIONS IN THE FACTOR VIII GENE BY mRNA ANALYSIS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เพทาย เข็นจิตโสมนัส, Ph.D., วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D. 134 หน้า. ISBN 974-664-415-7

ฮีโมฟีเลียเอ (hemophilia A) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดภาวะเลือดออกง่ายผิดปกติแต่หายากเกิดขึ้นเนื่องจากความผิดปกติของยีนแฟกเตอร์แปด (factor VIII gene) ยีนแฟกเตอร์แปดเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ (186 กิโลเบส) มีตำแหน่งอยู่ที่ส่วนปลายของโครโมโซม เอ็กซ์ (Xq28) ประกอบด้วย 26 เอ็กซอน และสั้เคราะห์ เอ็ม-อาร์เอ็นเอขนาด 9 กิโลเบส ความผิดปกติของยีนแฟกเตอร์แปดที่ทำให้เกิดโรคฮีโมฟีเลียมีความหลากหลายส่งผลให้มีความแตกต่างในความรุนแรงของโรค การศึกษารายละเอียดมิวเตชันของยีนแฟกเตอร์แปดซึ่งทำให้เกิดโรค จะนำไปสู่การเรียนรู้กลไกใหม่ๆ ที่กระทบต่อการทำงานของโปรตีนแฟกเตอร์แปด งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษามิวเตชันในผู้ป่วยไทยที่เป็นโรคฮีโมฟีเลียเอ โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) วิธี RT-PCR ซึ่งเป็นการทำ amplification บริเวณที่เกิดอินเวอร์ชัน นำมาใช้ตรวจมิวเตชันชนิดอินเวอร์ชัน (gene inversion) ซึ่งแยกเอ็กซอน 1-22 ออกจาก เอ็กซอน 23-26 และพบได้บ่อยในผู้ป่วยฮีโมฟีเลียเอ ชนิดรุนแรง วิธี long RT-PCR โดยการสังเคราะห์ซี-ดีเอ็นเอ จากเอ็ม-อาร์เอ็นเอของยีนแฟกเตอร์แปด และการทำ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ได้นำมาใช้เพื่อแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟกเตอร์แปดเมื่อตรวจกรองมิวเตชันอื่นๆที่มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยภายในยีน ซี-ดีเอ็นเอของแฟกเตอร์แปดยีนทั้งหมด ถูกแบ่งเป็น 7 ชิ้น ที่เหลื่อมกัน โดยวิธี nested PCR ส่วนบริเวณเอ็กซอน 14 ถูกแบ่งเป็น 2 ชิ้นที่เหลื่อมกันโดยการใช้ ซี-ดีเอ็นเอ หรือ จีโนมิกดีเอ็นเอ ชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้ จะถูกนำมาตัดเพื่อให้มีขนาดที่เหมาะสมด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะก่อนที่จะนำไปศึกษาด้วยวิธี SSCP และวิเคราะห์มิวเตชันด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อพบมิวเตชัน จะทำการพัฒนาวิธี allele specific amplification (ASA) สำหรับตรวจมิวเตชันเพื่อหาผู้ที่เป็นพาหะในครอบครัว

จากการศึกษาอินเวอร์ชันด้วยวิธี RT-PCR ในผู้ป่วย 11 ราย พบว่าผู้ป่วยทั้งหมดมี เอ็กซอน 22 และ 23 ที่แยกจากกัน แสดงว่ามีอินเวอร์ชันของยีนแฟกเตอร์แปด ผู้ป่วย 10 ใน 11 ราย เคยตรวจมาก่อนว่ามีอินเวอร์ชันด้วยวิธี Southern-blot hybridization วิธี RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้ตรวจกรองมิวเตชันชนิดอินเวอร์ชันของยีนแฟกเตอร์แปดได้ การศึกษาซี-ดีเอ็นเอในผู้ป่วย 18 คน พบว่ามีผู้ป่วย 1 คน ที่มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสั้นกว่าปกติและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีการขาดหายไปของเอ็กซอน 15 ทั้งหมด (154 bp) และส่วนหนึ่งของเอ็กซอน 16 (47 bp) ซึ่งเกิดจากการมีมิวเตชันที่บริเวณ donor splice site ร่วมกับการกระตุ้น cryptic acceptor splice site ภายในเอ็กซอน 16 วิธี SSCP ได้ถูกนำมาหามิวเตชันในผู้ป่วย 8 คน จาก 6 ครอบครัว จากการศึกษพบว่าผู้ป่วย 2 คน ที่มาจากรอบครัวเดียวกันมีการเคลื่อนที่ผิดปกติของดีเอ็นเอชิ้นเดียวกัน จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัวที่ codon 233 จาก ACA>ATA ในเอ็กซอน 6 ของยีนแฟกเตอร์แปด ทำให้เกิดการเปลี่ยนของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 233 (T233I) ในบริเวณโดเมน A1 มิวเตชันชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การตรวจผู้ที่เป็นพาหะของฮีโมฟีเลียเอในทั้ง 2 ครอบครัวสามารถทำได้ด้วยวิธี ASA ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้น