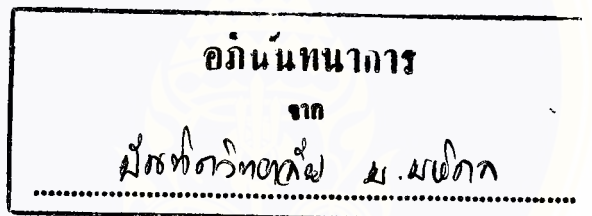




11 JUL 2000

**MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A
IN 19 THAI PATIENTS**

SORASAK INTORASOOT



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-663-825-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S 713 m
2000
C-2

44585 c.2

Copyright by Mahidol University

4036156 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS-GENETIC
ENGINEERING; M.Sc (MOLECULAR GENETICS-
GENETIC ENGINEERING)

KEYWORDS : HEMOPHILIA A/ FACTOR VIII GENE/ SINGLE
STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM
(SSCP)/ THAILAND

SORASAK INTORASOOT: MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A
IN 19 THAI PATIENTS. THESIS ADVISORS: VARAPORN

AKKARAPATUMWONG, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., PA-THAI
YENCHITSOMANUS, Ph.D.

149 p. ISBN 974-663-825-4

Hemophilia A is an X-linked recessive bleeding disorder caused by mutations in factor VIII (FVIII) gene. The FVIII gene, which locates at Xq28 and spans 186 kb, is composed of 26 exons and transcribes mRNA with the length of about 9 kb. The molecular defects of FVIII gene causing hemophilia A are heterogeneous, giving rise to clinical heterogeneity. To study the molecular basis of hemophilia A in Thai patients, mutations of the FVIII gene were screened and identified, respectively, by single strand conformation polymorphism (SSCP) technique and DNA sequencing analysis. A combination of long reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of FVIII mRNA and PCR of FVIII genomic DNA were used to isolate FVIII sequence for the screening and analysis. The entire coding and essential FVIII sequences were amplified and fractionated into eight fragments. Four overlapping fragments containing the FVIII coding sequence were amplified from its cDNA. Four fragments, one covering the putative promoter, two containing exon 14 sequence, and one including the polyadenylation signal, were amplified from genomic DNA. Restriction endonuclease digestions or nested PCR were conducted to generate smaller DNA fragments prior to the SSCP and sequencing analyses. Once identified, the mutation was detected by SSCP or heteroduplex analysis (HA) in all available members of the family to examine the carrier and non-carrier statuses.

From the studies of FVIII gene of nineteen hemophilia A patients, nine different mutations were identified in nine patients. In addition, one polymorphism, V56D, which has previously been reported, was also identified in a patient, without detectable disease-causing mutation. Among the nine different mutations identified, three (1191 del A, 1187-1188 del ACAC and 1439 ins A) have previously been reported. The other six mutations including three small deletions (1145 del T, 1534 del A, and 1458 del GA), two insertions (1934 ins TA and 75-bp ins at exon 22/23 boundary) and one missense mutation (W2229S) have never previously been documented. The types of FVIII gene mutations identified in seven patients were found to be well correlated with the clinical manifestations. Interestingly, two frameshift mutations (1191 del A and 1439 ins A) showed genotype and phenotype discrepancies, with unexpected moderate phenotypes, which may be explained by slippage during transcription of the FVIII gene producing in-frame message since both 1191 del A and 1439 ins A occurred in the runs of 9As and 8As, respectively. Eight mutations were found to inherit from the patients' mothers but the inheritance of one mutation (the 75-bp insertion at exon 22/23 boundary) was not known because only the patient participated in this study. In the families with several female members, the detections of carrier and non-carrier statuses were feasible. The mutations of FVIII gene in the remaining ten patients could not be observed in the SSCP analysis, waiting for examining by a more sensitive method.

4036156 MBMG/M : สาขาวิชา : อนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ; วท.ม
(อนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์)

สรศักดิ์ อินทรสุด : สมภูฐานระดับอนุของโรคฮีโมฟีเลีย-เอในผู้ป่วย 19 ราย

(MOLECULAR BASIS OF HEMOPHILIA A IN 19 THAI PATIENTS) คณะกรรมการควบคุม

วิทยานิพนธ์ : วราภรณ์ อัครปฐมวงศ์, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., เพทาย เข็นจิตโสมนัส, Ph.D.

149 หน้า. ISBN 974-663-825-4

ฮีโมฟีเลีย-เอ (Hemophilia A) เป็นโรคพันธุกรรมชนิด X-link recessive ที่ทำให้เลือดออกง่ายแต่หยุดยาก เกิดจากมิวเตชันของยีนแฟคเตอร์แปด ยีนนี้อยู่บนโครโมโซม-เอ็กซ์ส่วนปลายในตำแหน่ง Xq28 ซึ่งมีขนาด 186 กิโลเบส ประกอบด้วยเอ็กซอนจำนวน 26 เอ็กซอน และสังเคราะห์เอ็ม-อาร์เอ็นเอขนาด 9 กิโลเบส ความผิดปกติของยีนแฟคเตอร์แปดมีลักษณะหลากหลาย ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในความรุนแรงของโรค เพื่อที่จะศึกษาสมภูฐานระดับอนุของโรคฮีโมฟีเลีย-เอในผู้ป่วยไทย งานวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้จึงทำการตรวจสอบและวิเคราะห์มิวเตชันของยีนแฟคเตอร์แปด ด้วยวิธี single strand conformation polymorphism (SSCP) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ยีนแฟคเตอร์แปดที่นำมาศึกษาแยกด้วยวิธี long reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และจากจีโนมิก-ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) ส่วนของยีนใช้กำหนดโครงสร้างของโปรตีนและที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนนำมาเพิ่มปริมาณและแบ่งออกเป็นแปดชิ้น ในจำนวนนี้ สี่ชิ้นที่มีส่วนของยีนที่ใช้กำหนดโครงสร้างของโปรตีน แยกมาจาก cDNA อีกสี่ชิ้นประกอบด้วยบริเวณที่มี promoter บริเวณยีนส่วน exon 14 (จำนวน 2 ชิ้น) และบริเวณ polyadenylation signal แยกมาจากจีโนมิก-ดีเอ็นเอ ชิ้นของดีเอ็นเอเหล่านี้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือทำให้สั้นลงด้วยวิธี nested PCR ก่อนตรวจสอบด้วยวิธี SSCP และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อพบมิวเตชัน จึงทำการตรวจสอบสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่สามารถตามมาตรฐานได้ด้วยวิธี SSCP หรือ heteroduplex analysis (HA) เพื่อให้ทราบภาวะของพาหะและไม่ใช่พาหะในสมาชิกครอบครัว

จากการศึกษายีนแฟคเตอร์แปดของผู้ป่วยฮีโมฟีเลีย-เอ จำนวน 19 คน พบมิวเตชัน 9 ชนิด ในผู้ป่วยจำนวน 9 คน นอกจากนี้ยังพบ polymorphism ชนิด V56D ซึ่งเคยมีผู้รายงานไว้แล้ว ในผู้ป่วย 1 คน โดยไม่พบมิวเตชันที่เป็นสาเหตุของโรค ในบรรดามิวเตชัน 9 ชนิดที่พบ 3 ชนิด (1191 del A, 1187-1188 del ACAC และ 1439 ins A) ได้เคยมีการรายงานมาก่อนแล้ว อีก 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย ชนิดที่มีการขาดหายของดีเอ็นเอสั้นๆ 3 แบบ (1145 del T, 1534 del A และ 1458 del GA) ชนิดที่มีการเพิ่มของดีเอ็นเอ 2 แบบ (1934 ins TA และ 75-bp ins at exon 22/23 boundary) และชนิดที่มีการเปลี่ยนของกรดอะมิโน 1 แบบ (W2229S) ยังไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน มิวเตชันที่พบใน 7 ราย มีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก ที่น่าสนใจ คือ มิวเตชันชนิด frameshift ในผู้ป่วย 2 ราย ไม่มีความสัมพันธ์กับอาการทางคลินิก เนื่องจากมีความรุนแรงของโรคขั้นปานกลาง ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากการเกิด slippage ระหว่างการสังเคราะห์เอ็ม-อาร์เอ็นเอของยีนแฟคเตอร์แปด ทำให้มีเอ็ม-อาร์เอ็นเอที่มีรหัสพันธุกรรมในลักษณะ in-frame เกิดขึ้นในบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ชนิด A เรียงติดต่อกันจำนวน 9 และ 8 ตัว ตามลำดับ มิวเตชัน 8 ชนิด พบว่าผู้ป่วยได้รับถ่ายทอดมาจากแม่ ส่วนอีก 1 ชนิด (75-bp insertion ที่ exon 22/23 boundary) ไม่ทราบว่าผู้ป่วยได้รับการถ่ายทอดมาหรือไม่เนื่องจากมีเพียงผู้ป่วยเท่านั้นที่เข้าร่วมในการศึกษานี้ ในครอบครัวที่มีสมาชิกเพศหญิงหลายคน การตรวจภาวะพาหะและไม่ใช่พาหะสามารถกระทำได้ ส่วนมิวเตชัน ของยีนแฟคเตอร์แปดในผู้ป่วยจำนวน 10 คนที่เหลือ ตรวจสอบไม่พบด้วยวิธี SSCP จะต้องตรวจด้วยวิธีที่มีความไวยิ่งขึ้นต่อไป