

14 FEB 2003



**ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN THE 5'-FLANKING
REGION OF THE GENE FOR APOLIPOPROTEIN(a) IN THAI
SUBJECTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE**

PUSHDEE THONGSAEN

๒

With compliments

of

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2002

ISBN 974-04-2648-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P987a
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4237740 SIBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

KEY WORDS : APOLIPOPROTEIN(a)/ CORONARY ARTERY DISEASE/

5'-FLANKING REGION/ LIPOPROTEIN(a)/ POLYMORPHISMS

PUSHDEE THONGSAEN : ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN THE 5'-FLANKING REGION OF THE GENE FOR APOLIPOPROTEIN(a) IN THAI SUBJECTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE. THESIS ADVISOR : NEDNAPIS TIRAWANCHAI, Ph.D., SOMPONG ONG-AJYOOTH, M.Sc., WATTANA LEOWATTANA, MD., ATIP LIKIDLILID, M.Sc. 167 p. ISBN 974-04-2648-4

Lipoprotein(a) [Lp(a)] is a complex particle in human plasma. It is made up of an LDL-like structure in which apo B-100 is linked to apolipoprotein(a) by a disulfide bond. Plasma Lp(a) concentrations vary greatly-over one thousand fold among individuals. They are controlled by a single gene with multiple alleles, each coding for different concentrations. This gene is the apo(a) gene that was closely linked to the gene for plasminogen on chromosome 6q27. Lp(a) may participate in both prothrombogenic and proatherogenic processes owing to the plasminogen-like properties of apo(a) and the LDL-like properties of Lp(a). Elevated plasma levels of Lp(a) have been found to be an independent risk factor for coronary artery disease (CAD). Previous studies revealed the presence of polymorphisms in the 5'-flanking region (5'-FL) of the apo(a) gene at three positions: G or A (-914), C or T (-49), and G or A (-21), which can be detected by cleavage of PCR-amplified DNA products with *TaqI*, *MaeII*, and *HhaI* endonucleases respectively. The 5'-FL types of the apo(a) gene can be classified by the combination of the presence (+) or absence (-) of these restriction sites. In the present study, we examined 100 healthy control subjects, 26 CAD patients with Lp(a) \leq 30 mg/dl, and 94 CAD patients with Lp(a) $>$ 30 mg/dl. The 5'-FL types of the apo(a) gene were analyzed by polymerase chain reaction followed by restriction endonuclease digestion (PCR-RFLP). We found that there were four types of the 5'-FL which were A, B, C, and D in all groups. Type A was the most prominent among the 3 subject groups. There was no significant difference in the frequencies of the 5'-FL types among these groups ($p < 0.05$). The frequency of type A of CAD patients with Lp(a) $>$ 30 mg/dl was notably increased, about 7.6%, when compared with those of CAD patients with Lp(a) \leq 30 mg/dl and healthy control subjects. However, this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). In normal Thai subjects, the 5'-FL types corresponded with Caucasian American ($p > 0.05$), whereas there was significant difference of the 5'-FL types between normal Thai and Japanese individuals ($p < 0.05$). Additionally, there was significant difference of the 5'-FL types between Thai patients with CAD (in this study) and Japanese patients with MI ($p < 0.05$). Type E was found in only one case of Japanese patients with MI, but not found in Thai patients with CAD. It is observed that, although type A was the most abundant 5'-FL type of the apo(a) gene, type C showed the highest level of plasma Lp(a). Plasma Lp(a) levels in homozygotes of type C were higher than in those of type D, suggesting that at least some 5'-FL types are associated with different levels of plasma Lp(a). However, there was no significant difference of Lp(a) levels between different types within the same subject group ($p > 0.05$). In addition, plasma Lp(a) levels of the same type in different subject groups were significantly different ($p < 0.05$).

4237740 SIBC/M: สาขาวิชา: ชีวเคมี; วท.ม. (ชีวเคมี)

ผู้สืบทอด: การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนในบริเวณปลาย 5' ของ อะโปไลโปโปรตีนเอ ในคนไทยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ (ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN THE 5'-FLANKING REGION OF THE GENE FOR APOLIPOPROTEIN(a) IN THAI SUBJECTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เนตรนภิส วีระวัลย์ชัย, Ph.D., สมพงษ์ อองอาจยุทธ, M.Sc., วัฒนา เลี้ยววัฒนา, M.D., อธิป ลิขิตลิลิต, M.Sc. 167 หน้า ISBN 974-04-2648-4

ไลโปโปรตีนเออยู่ในกระแสเลือด ประกอบด้วย แอลดีแอล และ อะโปไลโปโปรตีนเอ โดยที่อะโปบีของแอลดีแอล เชื่อมกับอะโปเอด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ความเข้มข้นของไลโปโปรตีนเอในพลาสมาของแต่ละบุคคลแปรผันมากกว่าพันเท่าซึ่งถูกควบคุมโดยยีนเดี่ยวแต่มีหลายอัลลีลและแต่ละอัลลีลจะถอดรหัสให้ความเข้มข้นของไลโปโปรตีนเอที่แตกต่างกัน ยีนดังกล่าวนี้คืออะโปเออิน ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 (6q27) ตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนของพลาสมาอินเจน ไลโปโปรตีนเออาจจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการได้แก่การเกิดก้อนลิ่มเลือดหรือรอรอบบัสเพราะอะโปเอมีลักษณะคล้ายพลาสมาอินเจนและการเกิดหลอดเลือดตีบแข็งเนื่องจากไลโปโปรตีนเอมีแอลดีแอลเป็นองค์ประกอบ ระดับไลโปโปรตีนเอที่สูงขึ้นในพลาสมาถูกพบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่ามีความหลากหลายของยีนตรงบริเวณปลาย 5' (5'-FL) อยู่ 3 ตำแหน่ง คือ G หรือ A ที่นิวคลีโอไทด์ -914, C หรือ T ที่นิวคลีโอไทด์ -49 และ G หรือ A ที่นิวคลีโอไทด์ -21 ซึ่งตรวจพบได้โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI*, *MaeII*, *HhaI* ตามลำดับ แล้วแยกชนิด 5'-FL ของอะโปเออินจากการมี (+) หรือ ไม่มี (-) บริเวณจุดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ การวิจัยนี้ศึกษาจากกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่มคือ กลุ่มคนปกติมีสุขภาพดี 100 คน, กลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไลโปโปรตีนเอ ≤ 30 มก./ดล. จำนวน 26 คน และกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไลโปโปรตีนเอ >30 มก./ดล. จำนวน 94 คน วิเคราะห์ชนิด 5'-FL ด้วยวิธี PCR-RFLP จากผลการทดลองพบว่าชนิด 5'-FL ของอะโปเออิน มีทั้งหมด 4 ชนิดคือ A, B, C และ D เมื่อพิจารณาทุกกลุ่มตัวอย่างพบว่า 5'-FL ชนิด A มีความถี่มากที่สุด ความถี่ของ 5'-FL ทุกชนิดของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม ความถี่ของ 5'-FL ชนิด A ของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไลโปโปรตีนเอ >30 มก./ดล. สูงขึ้น 7.6% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไลโปโปรตีนเอ ≤ 30 มก./ดล. อย่างไรก็ตามความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการเปรียบเทียบชนิด 5'-FL ของกลุ่มคนปกติชาวไทยในงานวิจัยนี้กับการศึกษาในเชื้อชาติอื่นพบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มคนปกติชาวอเมริกันหรือชาว ($p > 0.05$) แต่ต่างจากกลุ่มคนปกติชาวญี่ปุ่น ($p < 0.05$) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบชนิด 5'-FL ของกลุ่มผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจในงานวิจัยนี้กับการศึกษาในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นที่มีกล้ามเนื้อหัวใจตายพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่มีการพบ 5'-FL ชนิด E ในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นที่เป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย 1 รายแต่ไม่พบ 5'-FL ชนิด E ในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ จากการศึกษาแล้วยังพบว่าแม้ว่า 5'-FL ชนิด A จะมีความถี่มากที่สุด แต่กลุ่มคนที่มี 5'-FL ชนิด C มีความเข้มข้นเฉลี่ยของไลโปโปรตีนเอมากที่สุด ระดับไลโปโปรตีนเอในคนที่ เป็นโฮโมไซโกตของ 5'-FL ชนิด C มีค่าสูงกว่าคนที่ เป็นโฮโมไซโกตของ 5'-FL ชนิด D บ่งชี้ว่าอย่างน้อยก็มี 5'-FL บางชนิดเกี่ยวข้องกับระดับไลโปโปรตีนเอที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับไลโปโปรตีนเอของ 5'-FL ที่ต่างชนิดกันในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน ($p > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของระดับไลโปโปรตีนเอใน 5'-FL ชนิดเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$).