

α/β - globin mRNA ของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่เกิดจาก premature termination

รัชก เหมพรหมมินทร์^{1,2} ณัฐยา แซ่อิง^{2*} สุพรรณ พู่เจริญ²
กุลณภา พู่เจริญ² กนกวรรณ แสนไชยสุริยา²

บทคัดย่อ

ยีนบีตาธาลัสซีเมียซึ่งเกิดจาก premature termination มักมีปริมาณ mRNA ลดลงอย่างมากเนื่องจากการสลายของ mutant mRNA โดยกระบวนการ nonsense mediated decay (NMD) การศึกษานี้ได้ตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA โดยใช้วิธี semi-quantitative reverse transcriptase-PCR ของผู้ที่เป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17} β^{27} $\beta^{41/42}$ $\beta^{71/72}$ และ ผู้ป่วยที่มี β^{17} ร่วมกับ β^{27} เทียบกับคนปกติ พบว่าอัตราส่วนของ α/β -mRNA ของคนปกติ มีค่าเท่ากับ 0.98 พาหะของ β^{17} $\beta^{41/42}$ $\beta^{71/72}$ และ ผู้ป่วย $\beta^{17/\beta^{27}}$ มีค่าเท่ากับ 0.89 1.66 1.60 และ 3.09 ตามลำดับ เมื่อนำ cDNA ที่ได้จากยีนบีตาธาลัสซีเมียเหล่านี้ไปตรวจด้วยวิธี DNA sequencing พบว่าตรวจพบ mutant mRNA ได้เฉพาะใน β^{17} เท่านั้น สอดคล้องกับค่าอัตราส่วนของ α/β -mRNA ที่ได้ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนของ α/β -mRNA ขึ้นอยู่กับชนิดและตำแหน่งที่เกิด premature termination และยังมีปัจจัยอื่นภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด NMD ด้วย

คำสำคัญ : บีตาธาลัสซีเมีย เอ็มอาร์เอ็นเอ อาร์ที-พีซีอาร์

บทนำ

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) เป็นกลไกหนึ่งที่ควบคุมการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่มีการกลายพันธุ์แบบ nonsense หรือ frameshift mutation แล้วทำให้เกิดรหัสหยุดในระหว่างการสร้างสายโพลีเปปไทด์ (translation-premature termination) ทำให้การสร้างสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) สั้นสุดลงก่อนกำหนด โดยหน้าที่หลักของกระบวนการ NMD คือช่วยป้องกันการสร้างโปรตีนผิดปกติ (truncated proteins) ที่ส่งผลเสียต่อการทำงานของเซลล์ (dominant negative effects) ซึ่งกระบวนการ NMD นี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ พืช และสัตว์เลี้ยง

ลูกด้วยนม⁽¹⁾ ในบีตาธาลัสซีเมียก็พบการกลายพันธุ์บนยีนบีตาโกลบินที่ทำให้เกิดรหัสหยุดในระหว่างการสร้างสายโพลีเปปไทด์ โดยพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ได้ในทุกแอกซอนของยีนบีตาโกลบิน⁽²⁻⁵⁾ มีรายงานว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในส่วนแอกซอน (exon) หนึ่งหรือแอกซอนสองของยีนโกลบินจะทำให้ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอลดลง ส่งผลให้มีการสร้างสายบีตาโกลบินลดลงถึงร้อยละ 50 ในพาหะ^(2,3) ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่เกิดในส่วนแอกซอนสามจะไม่ส่งผลให้ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอลดลง^(4,5) จึงเกิดการสร้างโปรตีนผิดปกติ (truncated proteins) ในปริมาณใกล้เคียงกับโปรตีนปกติที่ผลิตได้จากอัลลีล (allele) ปกติ จนเกินความสามารถของเอนไซม์ที่ย่อย

¹ นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

α/β Globin mRNA of β -thalassemia genes with premature termination

Ratchanok Ngouprommin^{1, 2}, Nattaya Sae-ung^{2*}, Supan Fucharoen², Goonnapa Fucharoen², Kanokwan Sanchaisuriya²

Abstract

Mutation of β -globin gene causing translation-premature termination results in significant decrease of the mRNA abundance. This phenomenon arises from the degradation of mutant mRNA by nonsense codon-mediated mRNA decay (NMD). In this study, α/β -globin mRNA ratio was determined by semi-quantitative RT-PCR in β -thalassemia carriers with the β^{17} , $\beta^{41/42}$, $\beta^{71/72}$ and β^{27} mutations and in a patient with compound heterozygous β^{17} , β^{27} mutations. Values were compared with normal individual. The α/β -globin mRNA ratio of normal individual was found to be 0.98 whereas those of heterozygous for β^{17} , $\beta^{41/42}$, $\beta^{71/72}$ and compound heterozygous β^{17}/β^{27} were 0.89 1.66 1.60 and 3.09, respectively. Direct DNA sequencing of the cDNA demonstrated mutant mRNA only in the carrier with β^{17} mutation but not other mutations. This result was in concordance with the α/β -globin mRNA ratio observed. This data indicates that the α/β -globin mRNA ratio is dependent on the type and the location of premature termination mutation and related to some other factors involving NMD mechanism in cells.

Key words : β -thalassemia, mRNA, RT-PCR

กำจัดโปรตีนที่ผิดปกติ (proteolytic enzyme) นำไปสู่การตกตะกอนของสายบีตาโกลบินในเซลล์และเกิดภาวะการสร้างเม็ดเลือดแดงอย่างไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective erythropoiesis) เป็นผลทำให้เกิด dominant β -thalassemia ขึ้นซึ่งเป็นกลไกการเกิดโรคที่พบได้ใน Hb Khon Kaen⁽⁶⁾ และ dominant β -thalassemia อื่นๆ อีกหลายชนิด⁽⁷⁾ การศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นจากการวัดอัตราส่วนของ α/β -mRNA และตรวจลำดับ

การเรียงของสารพันธุกรรมจาก β -cDNA ในพาหะบีตา ศูนย์รหัสซีเมีย ชนิด β^{17} β^{27} $\beta^{41/42}$ $\beta^{71/72}$ และผู้ป่วยที่มียีน β^{17} ร่วมกับ β^{27} เมื่อเทียบกับคนปกติ แล้วบ่งชี้ให้เห็นว่าการเกิด premature termination ของบีตารหัสซีเมียนั้นนอกจากชนิดและตำแหน่งที่เกิด premature termination แล้วยังมีปัจจัยอื่นภายในเซลล์เกี่ยวข้องอีกด้วย

¹ M.Sc. Student in Medical Science Program, Faculty of Associated Medical Sciences,

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CDML), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author (e-mail: nattaya@kku.ac.th)

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือด

เป็นตัวอย่างเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งของผู้ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 5 ราย โดยเป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมียจำนวน 4 รายซึ่งเป็นชนิด β^{17} , β^{27} , $\beta^{41/42}$, $\beta^{71/72}$ และผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียเฮโมเจอร์ที่มี $\beta^{17/\beta^{27}}$ จำนวน 1 ราย ซึ่งชนิดของยีนบีตาธาลัสซีเมีย ได้จากการตรวจด้วยวิธี allele specific PCR ในงานประจำวันของโครงการวิจัยธาลัสซีเมียของ ศวป. การศึกษานี้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE491018)

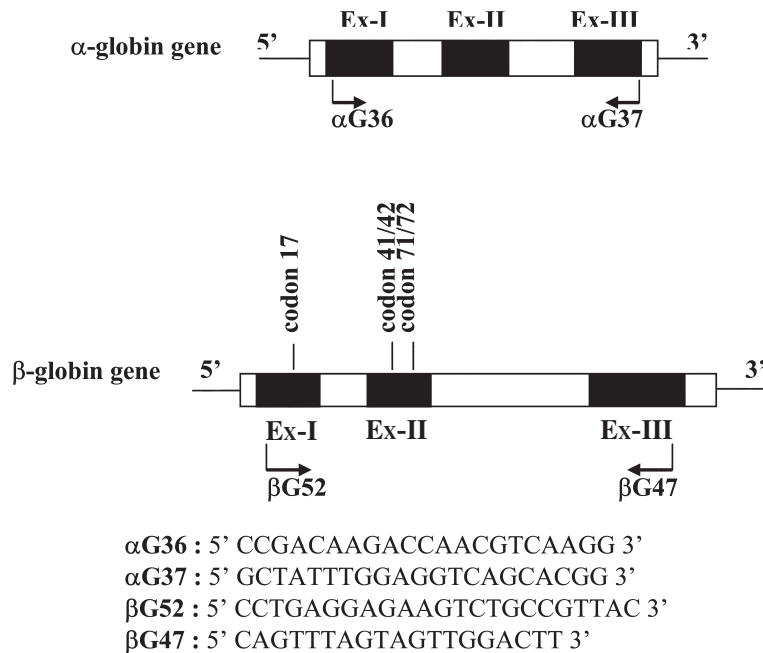
2. วิธีการศึกษา

2.1 การตรวจวัด α/β mRNA ratio โดยวิธี semi-quantitative reverse transcription polymerase

chain reaction (RT-PCR)

ได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเม็ดเลือดแดง ตามวิธีของ Chomczynski⁽⁸⁾ โดยใช้รีเอเจนต์ Trizol® (Invitrogen) จากตัวอย่างเลือดประมาณ 1 มล. และทำการตรวจ RT-PCR แบบสองขั้นตอน คือ

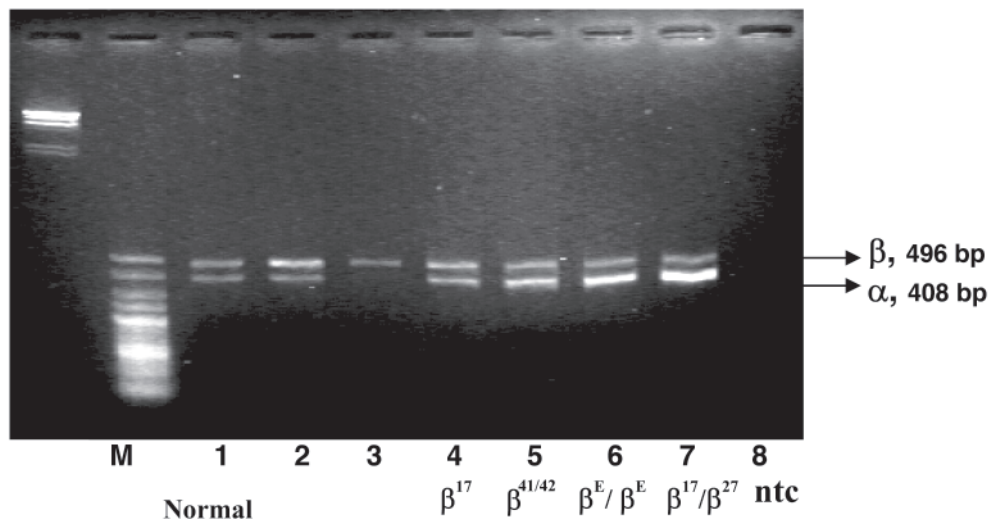
2.1.1 การเปลี่ยน α - และ β -globin mRNA เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่งในปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 μ l ประกอบด้วย 1x RT buffer (Biolab, New England), dNTP 8 mM, alpha reverse primer (α G37, 5'GCTATTTGGAGGTCA GCACGG3') 0.04 pmol, beta reverse primer (G47, 5'CAGTTTAGTAGTTGGACTT3') 0.1 pmol, MMuLV reverse transcriptase 0.2 unit/ μ l (Biolab), RNA 50 ng/ μ l นำส่วนผสมนี้ไปทำพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง Thermal Cycle 9600 (Perkin-Elmer, USA) ที่อุณหภูมิ 48 °C เป็นเวลา 30 นาที antisense-primer ที่จำเพาะต่อยีนอัลฟาและยีนบีตา (รูปที่ 1)



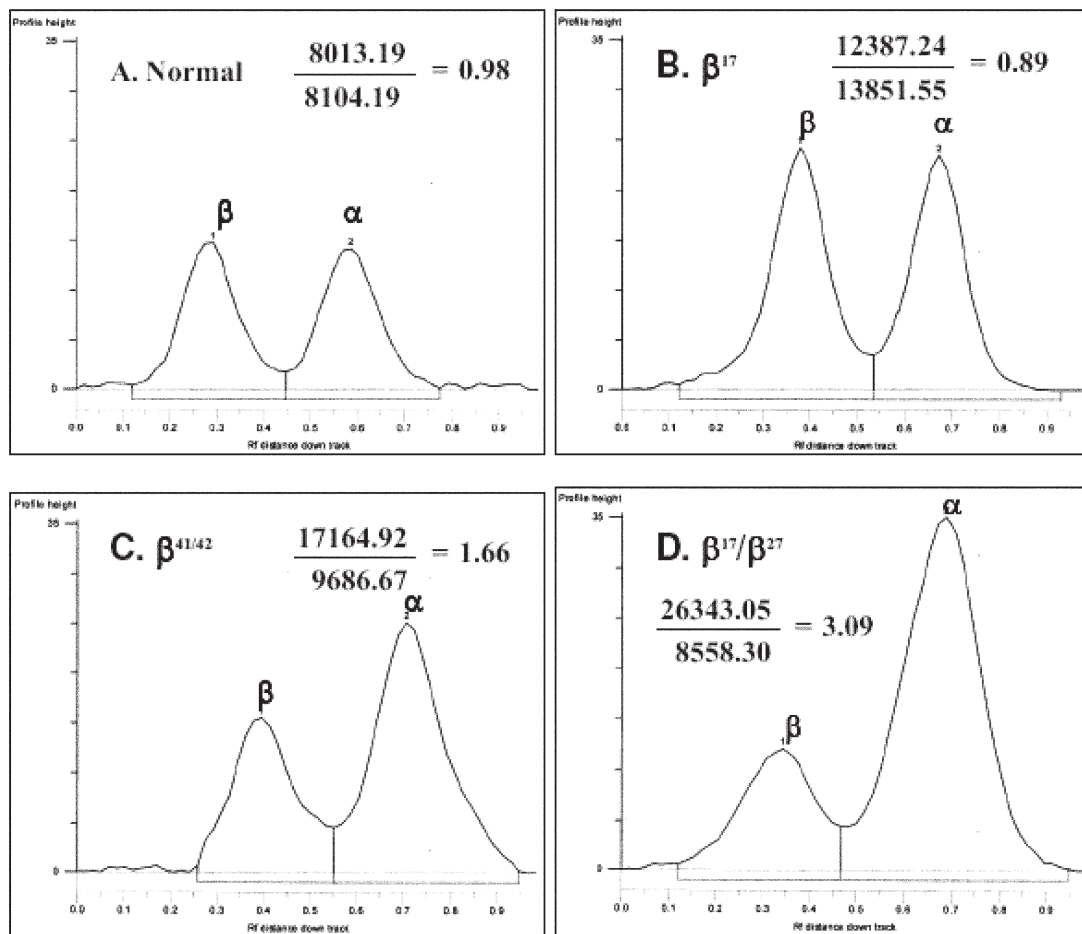
รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ mRNA ของยีนอัลฟาโกลบิน และยีนบีตาโกลบิน ด้วย semi-quantitative RT-PCR

2.1.2 การเพิ่มชิ้นส่วนของ α และ β cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 คู่ ซึ่งจะได้อัตราส่วนขนาด 408 bp สำหรับ α cDNA และชิ้นส่วนขนาด 496 bp สำหรับ β cDNA (รูปที่ 2) ปฏิบัติ PCR ใช้ปริมาตรรวม 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย 1x *Taq* buffer, dNTP 8 mM, alpha forward primer α G36 (5'CCGACAAGACCAACGTCAAGG3') 0.04 pmol, alpha reverse primer α G37 0.04 pmol, 0.04 pmol, beta forward primer G52 (5'CCTGAGGAGAAGTCTGCCGT

TAC3') 0.1 pmol, beta reverse primer G47 0.1 pmol, betaine 0.5 M, *Taq* DNA polymerase (Promega) 0.4 unit และ RT-product หรือ cDNA 5 μ l ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler 9600 จำนวน 20 รอบ คือ 95°C นาน 15 วินาที ตามด้วย 58°C นาน 1 นาที ตรวจสอบผลของพีซีอาร์บน 2% agarose gel electrophoresis และย้อมเจลด้วย ethidium bromide วิเคราะห์ความเข้มของแถบโดยเครื่อง GeneFlash gel documentation system (SynGene Bio imaging, Cambridge) (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 ตัวอย่างการตรวจชิ้นส่วนของ α - และ β -cDNA ซึ่งมีขนาด 408 bp และ 496 bp ตามลำดับ ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ทุกตัวอย่างจะมี 2 แถบ ซึ่งความเข้มของแถบทั้งสองจะใกล้เคียงกันในคนปกติ (แถว 1) และพาหะบีตาคุณย์ชนิด β^{17} (แถว 4) ส่วนพาหะบีตาคุณย์ชนิด $\beta^{41/42}$ (แถว 5) ผู้ป่วย $\beta^{17/27}$ (แถว 7) และโฮโมไซกัสฮีโมโกลบินอี (แถว 6) พบแถบขนาด 496 bp จางลง ซึ่งผลตรงข้ามกับพาหะอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 (แถว 2) และ โรคฮีโมโกลบินเอช (แถว 3) ซึ่งมีแถบขนาด 408 bp จางลง สำหรับแถว 8 เป็น non- template control (ntc)

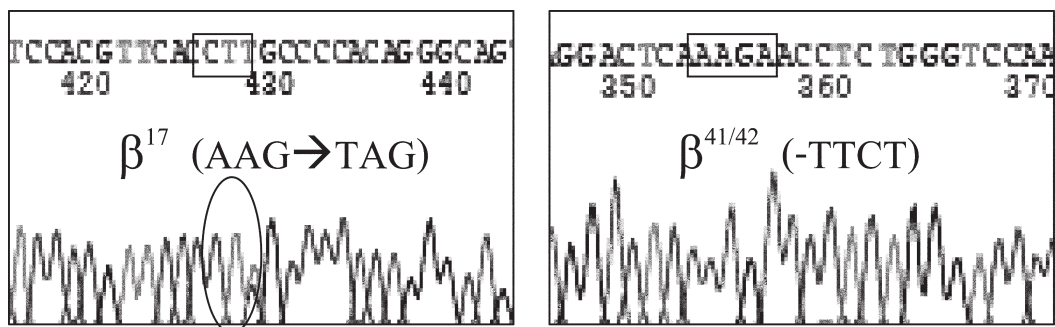


รูปที่ 3 ตัวอย่างภาพการวิเคราะห์อัตราส่วนของ α/β mRNA จากแถบขนาด 408 bp สำหรับ β -mRNA และ แถบขนาด 496 bp สำหรับ β -mRNA โดยเครื่อง Gene Flash, gel documentation ของคนปกติ (A) พาหะบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17} (B) ชนิด $\beta^{41/42}$ (C) และผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17}/β^{27} (D)

2.2 ตรวจยืนยันชิ้นส่วนของ β -cDNA โดยเทคนิค DNA sequencing

ได้ทำการเพิ่มจำนวน cDNA จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะต่อ β -cDNA ซึ่งได้ชิ้นส่วน

ขนาด 496 bp แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค DNA sequencing (DNA sequencer, ABI 3100) (**รูปที่ 4**)



รูปที่ 4 ตัวอย่างผลการตรวจ cDNA ของผู้ที่เป็นพาหะบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17} และชนิด $\beta^{41/42}$ โดยวิธี direct DNA sequencing ซึ่งตรวจพบทั้ง mutant mRNA และ normal mRNA ในผู้ที่เป็นพาหะของ β^{17} แต่พบเฉพาะ normal mRNA ในผู้ที่เป็นพาหะของ $\beta^{41/42}$

ผลการศึกษา

จากการเพิ่มปริมาณ cDNA ของ mRNA ของยีน บีตาธาลัสซีเมียโดยวิธี RT-PCR และตรวจวัดอัตราส่วนของ α/β -mRNA พบว่าอัตราส่วนของ α/β -mRNA ของคนปกติมีค่าเท่ากับ 0.98 พาหะ β^{17} $\beta^{41/42}$ $\beta^{71/72}$ และผู้ป่วย $\beta^{17/b27}$ มีค่าเท่ากับ 0.89 1.66 1.60 และ 3.09 ตามลำดับ เมื่อนำ cDNA ที่ได้จากยีนบีตาธาลัสซีเมีย

เหล่านี้ไปตรวจด้วยวิธี DNA sequencing พบว่า พาหะ บีตาธาลัสซีเมียชนิด $\beta^{41/42}$ และชนิด $\beta^{71/72}$ พบเฉพาะ β^A mRNA ส่วนชนิด β^{17} พบทั้ง β^{17} mRNA และ β^A mRNA นอกจากนี้ยังพบว่า ผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17}/β^{27} พบเฉพาะ β^{17} mRNA เท่านั้น ดังสรุปใน ตารางที่ 1 ผลที่ได้สอดคล้องกับอัตราส่วน α/β mRNA ที่วัดได้

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของ mRNA และผลการตรวจ cDNA ด้วยวิธี DNA sequencing

Subject	α/β mRNA ratio	cDNA sequence
Normal	0.98	β^A - mRNA
β -thalassemia trait ($\beta^{41/42}$)	1.66	β^A - mRNA
β -thalassemia trait ($\beta^{71/72}$)	1.60	β^A - mRNA
β -thalassemia trait (β^{17})	0.89	β^A and β^{17} - mRNA
β -thalassemia major (β^{17}/β^{27})	3.09	β^{17} - mRNA

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของการเกิด premature termination ของยีนบีตาโกลบินของพาหะบีตาธาลัสซีเมียในส่วนแรกของแอกซอนหนึ่ง คือ β^{17} และส่วนของแอกซอนสอง คือ $\beta^{41/42}$ และ $\beta^{71/72}$ ต่ออัตราส่วนของ α/β -globin mRNA โดยเปรียบเทียบกับคนปกติ พบว่าในพาหะบีตาธาลัสซีเมียทั้งชนิด $\beta^{41/42}$ และ $\beta^{71/72}$ มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 ขณะที่คนปกติมีค่าเพียง 0.98 (ตารางที่ 1) แสดงว่าพาหะทั้งสองชนิดนี้มีปริมาณ β -globin mRNA ลดลง ซึ่งเมื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิค DNA sequencing ซึ่งพบเฉพาะ β^A mRNA ดังนั้นจึงเป็นได้ว่าปริมาณ β -globin mRNA ที่ลดลงในพาหะบีตาธาลัสซีเมียทั้งสองชนิดนี้น่าจะเกิดจากการทำลาย mutant mRNA โดยกระบวนการ NMD จึงมีเพียงการสร้างสายบีตาโกลบินปกติเท่านั้น ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาในยีนบีตาธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ ที่พบว่าเมื่อมีมิวเตชันเกิดขึ้นในส่วนแอกซอนสองจะส่งผลให้ปริมาณเอมอาร์เอ็นเอลดลง⁽²⁻⁴⁾ โดยกระบวนการ NMD สำหรับพาหะบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17} ที่มีอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เท่ากับ 0.89 ซึ่งใกล้เคียงกับคนปกติ คือ 0.98 แสดงให้เห็นว่ายังมี mutant mRNA คงอยู่ ซึ่งเมื่อตรวจยืนยันด้วยเทคนิค DNA sequencing ก็พบทั้ง β^{17} mRNA และ β^A mRNA แสดงให้เห็นว่า β^{17} -mRNA ไม่ถูกทำลายไปด้วยกระบวนการ NMD เหมือนกับมิวเตชันชนิดอื่นที่ศึกษา เห็นได้จากการตรวจพบเฉพาะ β^{17} mRNA ในผู้ป่วยที่มี β^{17} ร่วมกับ β^{27} ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาใน murine erythroleukemia (MEL) cell ของ Ramao L และคณะในปี ค.ศ. 2000⁽⁹⁾ ที่แสดงให้เห็นว่าการเกิด nonsense mutation ขึ้นในส่วนแอกซอนหนึ่งของยีนบีตาโกลบินที่ตำแหน่งโคดอนที่ 5, 15 และ 17 (β^5 , β^{15} และ β^{17}) ซึ่งอยู่ในแอกซอนหนึ่งทั้งหมด จะยังคงมี mutant mRNA เหลืออยู่ในปริมาณมาก ซึ่งบ่งชี้ว่ามี mutant mRNA ไม่ได้ถูกทำลายไปด้วยกระบวนการ NMD ยิ่งเป็นการยืนยันว่ามี mutant β^{17} mRNA อยู่และไม่ได้ถูกทำลายด้วย

กระบวนการ NMD ดังนั้น ตำแหน่งของการเกิด premature termination ไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่ทำให้ปริมาณ mRNA ลดลง น่าจะมีปัจจัยอื่นภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดกระบวนการ NMD ด้วย นอกจากนี้ การตรวจพบค่าอัตราส่วนของ α/β -globin mRNA ของพาหะบีตาธาลัสซีเมียชนิด β^{17} สูงกว่าชนิด $\beta^{41/42}$ และชนิด $\beta^{71/72}$ ยังชี้ให้เห็นว่าการใช้อัตราส่วนของ α/β -globin mRNA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ในการบอกระดับของบีตาธาลัสซีเมียได้แต่สามารถที่จะใช้ในการบ่งชี้การเป็นบีตาธาลัสซีเมียเบื้องต้นได้ ผลการศึกษาที่ได้ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ ได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี multiplex real time RT-PCR⁽¹⁰⁾ เช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่นและศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. J Cell Science 2005; 118: 1773-76.
2. Baserga S, Benz EJ Jr. Nonsense mutations in the human β -globin gene affect mRNA metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 2056-60.
3. Takeshita K, Forget BG, Scarpa A, Benz EJ Jr. Intranuclear defect in β -globin mRNA accumulation due to a premature translation termination codon. Blood 1984; 64: 13-22.

4. Hall GW, Thein S. Nonsense codon mutations in the terminal exon of the β -globin gene are not associated with a reduction in β -globin mRNA accumulation: a mechanism for phenotype of dominant β -thalassemia. *Blood* 1994; 83: 2031-37.
5. Ho PJ, Wickramasinghe SN, Rees DC, Lee MJ, Eden A, Thein SL. Erythroblastic inclusion in dominantly inherited β -thalassemia. *Blood* 1997; 89: 322-28.
6. Fucharoen G, Fucharoen S, Jetsrisuparb A, Fukumaki Y. Eight bases deletion in exon 3 of the β -globin gene produced a novel variant (β Khon Kaen) with an inclusion body β -thalassemia trait. *Blood* 1991; 78: 537-9.
7. Thein SL. Is it dominantly inherited β -thalassemia or just a β -chain variant that is highly unstable? *Br J Haematol* 1999; 107: 12-21.
8. Chomczynski PA. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-7.
9. Romao L, Inacio A, Santos S, Avila M, Faustino P, Pacheco P, Lavinha J. Nonsense mutations in the human β -globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood* 2000; 96: 2895-901.
10. Chaisue C, Kitcharoen S, Wilairat P, Jetsrisuparb A, Fucharoen G, Fucharoen S. α/β -globin mRNA ratio determination by multiplex quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction as an indicator of globin gene function. *Clin Biochem* 2007 (in press)