การสังเคราะห์สายโกลบินในฮีโมโกลบินไทย

(คอนสแตนท์ สปริง)

นางสาว สุนันท์ พงษ์สามารถ

005819

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2517

I 17986017

GLOBIN CHAIN SYNTHESIS IN HAEMOGLOBIN THAI (CONSTANT SPRING)

Miss Sunant Pongsamart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1974

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ .....ประธานกรรมการ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

.....กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย นายแพทย์ ส่งา ภู่ระกูล M.D., Ph.D.

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์สายโกลบินในฮีโมโกลบินไทย (คอนสแตนท์ สปริง)

ชื่อ นางสาว สุนันท์ พงษ์สามารถ แผนกวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2517

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินไทย (คอนสแตนท์ สปริง) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติในสายอัลฟา โดยมีกรดอมิโนอีก 31 ตัว เพิ่มต่อจากปลาย C-terminal ของสายอัลฟาปกติ และเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบมากในเมืองไทย ฮีโมโกลบินไทยเมื่ออยู่ร่วมกับ α-thalassaemia$_1$ หรือ α-thalassaemia$_2$ จะทำให้เกิดมีอาการของโรค α-thalassaemia ขึ้น จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ก็เพื่อศึกษาการสังเคราะห์ฮีโมโกลบินไทยในคนที่มียีนของฮีโมโกลบินไทย และที่อยู่ร่วมกับยีน α-thalassaemia เพื่อที่จะได้เข้าใจธรรมชาติและกลไกของยีนของฮีโมโกลบินไทยได้ดีขึ้น

การศึกษาใช้ ^{3}H-leucine ติดตามการสังเคราะห์สายเพ็พไทด์ที่สร้างใหม่ใน reticulocyte ที่เตรียมจากเส้นโลหิตดำ หรือใน erythroid cells จากไขกระดูกโดยปล่อยให้มีการสร้างฮีโมโกลบินนาน 3 ชั่วโมง จึงล้างเม็ดเลือดแดงแล้วนำไปเตรียม haemolysate และโกลบิน การแยกสายเพ็พไทด์จากโกลบินใช้ CM-cellulose chromatography ใน sodium phosphate buffer ซึ่งประกอบด้วย 8 M urea และ 0.05 M mercaptoethanol, pH 6.7 สายเพ็พไทด์จะถูกแยกออกมาโดยการค่อย ๆ เพิ่ม sodium ion อย่างสม่ำเสมอ สายเพ็พไทด์แต่ละสายที่ถูกแยกออกมาแล้วนำไปวัดกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่อง Liquid Scintillation Spectrometer คำนวณหาค่า α/β ratio ของสารกัมมันตภาพรังสีได้ค่าเฉลี่ยของ α/β ratio ของการสร้างฮีโมโกลบินในคนปกติ 4 ราย มีค่า 1.08 ± 0.02

ค่าเฉลี่ยของ α/β ratio ของคนไข้ 12 รายที่เป็น Hb H disease ซึ่งในจำนวนนี้ 5 รายที่เกิดเนื่องจาก α-thal$_1$/α-thal$_2$ และ 7 รายที่เกิดเนื่องจาก

α-thal$_1$/Hb Thai มีค่า 0.57 ± 0.15 และ 0.70 ± 0.14 ตามลำดับ α/β ratio ของคนที่เป็น Hb Thai trait เท่ากับ 1.34 ± 0.09 การศึกษาอาการและโลหิตวิทยาของคนที่เป็น α-thal$_2$/Hb Thai disease พบว่าคล้ายกับคนไข้ 3 ราย ที่มี homozygous Hb Thai และค่า α/β ratio ของคนไข้พวกแรกเท่ากับ 1.09 ในขณะที่พวกหลังมีค่าเท่ากับ 1.64 ± 0.11

การแยกส่วนของ slow haemoglobin จากเลือดที่เจาะมาใหม่ ๆ ของคนไข้ α-thal$_1$/Hb Thai disease โดย DEAE-Sephadex พบว่าประกอบไปด้วย สองส่วน แยกได้เป็น X และ Y. ใน starch-gel electrophoresis, pH 8.6 ไม่พบว่ามี Hb A$_2$ ($\alpha_2\delta_2$). การแยกสายเพ็พไทด์ของ slow haemoglobin ที่แยกออกมาแล้ว พบว่ามีสายเดลต้าอยู่ด้วย ซึ่งพิสูจน์ได้โดยใช้ peptide map สายเดลต้าที่มีอยู่ใน slow haemoglobin อาจอยู่ร่วมกับสายโกลบินอื่น เช่น สายอัลฟ่าไทย หรือ สายเบต้า ในรูปของฮีโมโกลบินผิดปกติ

จากการศึกษาส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในเลือดของคนไข้ Hb H disease (α-thal$_1$/Hb Thai) โดยผ่าน Sephadex G-100 พบว่า fast haemoglobin คือ Hb H ถูกไล่ออกมาหลัง Hb A. โมเลกุลของ Hb H ประกอบด้วยสายของเบต้า 4 สาย (β_4) ซึ่งน่าจะมีขนาดใกล้เคียงกับ Hb A ($\alpha_2\beta_2$) ฉะนั้น fast haemoglobin ที่ออกมาหลัง Hb A น่าจะเป็น monomer ของสายเบต้า ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของโมเลกุลของ tetramer ไปเป็น dimer และเป็น monomer ของสายเบต้า ในระหว่างการแยกด้วย chromatography.

การศึกษาส่วนประกอบของ slow haemoglobin ที่ถูกแยกออกมาแล้วซึ่งเป็นฮีโมโกลบินไทย พบว่า ส่วนของ X และ Y จะค่อย ๆ เปลี่ยนไปเป็น Z และในที่สุดเมื่อเก็บไว้นานจะได้เป็นฮีโมโกลบินที่เคลื่อนไปอยู่ที่เดียวกับ Hb A. การศึกษา specific activity ของ Hb Thai และ Hb A ใน reticulocyte และ cells ของไขกระดูกของคนไข้ α-thal$_1$/Hb Thai disease มีสิ่งที่เสนอแนะได้ว่า ฮีโมโกลบินไทยถูกสร้างและถูกทำลายได้รวดเร็ว และค่า specific activity ของฮีโมโกลบินไทย หลังจากให้มี

การสร้างสายโกลบินนาน 4 ชั่วโมงจะมีระดับคงที่ ซึ่งอาจเนื่องจากผลการถูกทำลายของโมเลกุลของฮีโมโกลบินไทย ยิ่งกว่านั้นการศึกษาการแยกสายโกลบินโดย CM-cellulose chromatography ของฮีโมโกลบินไทยซึ่งมีกัมมันตภาพรังสีอยู่ เชื่อว่าควรจะมีแต่สายของ α^Y และ α^X ของฮีโมโกลบินไทย และสายเบต้า แต่กลับพบว่ามีกัมมันตภาพรังสีส่วนใหญ่อยู่ที่สายเบต้าและสายอัลฟ่าปกติ และพบเป็นส่วนน้อยอยู่ที่ สาย α^Y และ α^X จากสิ่งนี้แสดงให้เห็นชัดว่าสาย α^Y และ α^X ของฮีโมโกลบินไทยถูกทำลายจนได้เป็นสายอัลฟ่าปกติ กลไกของการถูกทำลายของส่วนเกิน (31 กรดอมิโนต่อจากปลาย C-terminal ของสายอัลฟ่าปกติ) ของสายอัลฟ่าที่ผิดปกติยังไม่ทราบแน่นอน เนื่องจากว่าฮีโมโกลบินไทยมีการสร้างและการถูกทำลายอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะที่สายอัลฟ่าผิดปกติ และยังมี pool ของสายเบต้าอยู่ด้วย ดังนั้นสายอัลฟ่าปกติที่สร้างใหม่รวมทั้งสายอัลฟ่าที่ถูกทำลายมาจากสายอัลฟ่าผิดปกติ อาจไปอยู่รวมกับสายเบต้าที่ไม่มีสารกัมมันตภาพรังสีที่สร้างขึ้นก่อนใน pool ทำให้มีค่าของ α/β ratio เพิ่มขึ้นในคนไข้ที่เป็น heterozygote และ homozygote ของฮีโมโกลบินไทยซึ่งเป็นไปได้ที่ทำให้ค่า α/β ratio เท่ากับ 1.34 และ 1.64 ตามลำดับ.

Thesis Title Globin Chain Synthesis in Haemoglobin Thai (Constant Spring)

Name Miss Sunant Pongsamart Department Biochemistry

Academic Year 1974

ABSTRACT

Haemoglobin (Hb) Thai (Hb Constant Spring) is an α-chain variant with 31 extra amino acid residues extending from the C-terminal of normal α-chain. The variant is commonly found in the population in Thailand. Interaction of Hb Thai with either α-thalassaemia$_1$ or α-thalassaemia$_2$ results in clinical disorders of α-thalassaemia syndromes. The objective of this investigation is to study the haemoglobin synthesis of the Hb Thai in heterozygote, and in combination with α-thalassaemia in order to get better understanding the nature and the gene action of the Hb Thai.

Reticulocytes, prepared from venous blood or bone marrow erythroid cells from patients were incorporated with ^{3}H-leucine in incubation mixture for 3 hours. The washed red cells were lysed for haemolysate and globin preparation. Globin chains were fractionated on CM-cellulose chromatography in sodium phosphate buffer, containing 8 M urea and 0.05 M mercaptoethanol, pH 6.7, and followed with a linear gradient of sodium ions. Radioactivity of each globin chain was measured in Liquid Scintillation Spectrometer. The total radioactivity of α/β ratio was calculated. A mean of radioactivity α/β

ratio of 4 normal controls was 1.08 ± 0.02.

The means of radioactivity α/β ratio of 12 patients with Hb H disease; 5 with α-thal$_1$/α-thal$_2$ and 7 with α-thal$_1$/Hb Thai, were 0.57 ± 0.15 and 0.70 ± 0.14 respectively. The α/β ratio of 14 Hb Thai traits revealed a mean of 1.34 ± 0.09. The clinical and haematological findings of a case of α-thal$_2$/Hb Thai disease were similar to those of 3 cases of homozygous Hb Thai, but the α/β ratio of the former was 1.09, while the latter with a mean of 1.64 ± 0.11.

A fresh slow haemoglobin components which were isolated from a haemolysate of α-thal$_1$/Hb Thai disease by DEAE-Sephadex revealed only two major components; X and Y on starch-gel electrophoresis, pH 8.6 . No Hb A$_2$ ($\alpha_2\delta_2$) was observed. The CM-cellulose chromatography of the globin prepared from the isolated slow haemoglobin revealed a peak with its peptide map identical to δ-chain. The δ-chain present in the slow haemoglobin probably joined to other chains such as α^{Thai}, β-chain, forming an unusual haemoglobin structure.

From the studies of haemoglobin components in haemolysate of Hb H disease (α-thal$_1$/Hb Thai) on Sephadex G-100 gel-filtration, it was evident that the fast component of Hb H was eluted after Hb A. Hb H molecule has been described as tetramer of β-chain-β_4 which presumably has the same size as Hb A ($\alpha_2\beta_2$). Thus the fast component which was eluted after Hb A was believed to be a monomer of β-chain. This was presumably a result of the dissociation of the unstable tetrameric molecule of Hb H into dimer and finally into monomer of β-chain during the process of chromatography.

Evidence from the electrophoretic studies of the isolated slow haemoglobin component-Hb Thai suggested that the components X and Y were gradually converted to form component Z and finally to a haemoglobin which migrate at the same rate as Hb A. The studies of specific activity of the isolated Hb Thai and Hb A in reticulocytes and bone marrow cells of α-thal$_1$/Hb Thai disease suggested that the Hb Thai had rapid turnover rate and that its levelling of specific activity at four hour incubation in reticulocytes was probably due to the destruction of the unstable haemoglobin molecule. Furthermore, the studies of CM-cellulose chromatography of the labelled Hb Thai-which was believed to contain α^Y and α^X of the Hb Thai and β-chain revealed that radioactivity was mainly incorporated into β- and normal α-chain but only small was found into α^Y and α^X. This strongly indicated that the α^Y and α^X of Hb Thai were degraded to yield normal α-chain. The actual mechanism of degradation of the appendage (31 amino acid residues from the C-terminal of normal α-chain) of the abnormal α-chain is not known. Since the rapid turnover rate of Hb Thai, especially α abnormal chain and the β-pool was presumably present, the newly synthesized normal α-chain including the degradation products from the α abnormal chain probably combined with the non-radioactive β-chain in the pool resulting in the increased radioactivity α/β ratio of heterozygous and homozygous Hb Thai. This would be compatible with the radioactivity α/β ratio in heterozygote and homozygote for Hb Thai of 1.34 and 1.64 respectively.

ACKNOWLEDGEMENT

My deep gratitude is confered to Dr. Sa-nga Pootrakul for his close supervision and constant encouragement throughout the development of this study.

Great thanks are extended to Dr. Supa Na-Nakorn, Dr. Prawase Wasi and Dr. Pensri Pootrakul of Haematology Division, Department of Medicine, Siriraj Hospital, for their assistance and co-operation.

The author also indebted Dr. Nikorn Dusitsin and Mr. Samai Leepipatpaiboon, Department of Obstetric and Gynecology, Chulalongkorn Hospital who made possible the use of the Liquid Scintillation Spectrometer for the laboratory experiment; to all staff of Medical Illustration Center, Siriraj Hospital who supplied the photographs for references; to Mr. Vichian Intarakasetr, Mr. Suwat Sapprapa and the staffs of Division of Haematology, Department of Medicine, Siriraj Hospital who made valuable advices.

Finally, my sincere gratitute is expressed to Dr. Kamchad Mongkolkul and Dr. Varapan Danutra of the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Dr. Prachot Plengvidhaya, Head of the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University and his colleague for the encouragement and kind assistance throughout this study.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vii
ACKNOWLEDGEMENT	x
TABLE OF CONTENTS	xi
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
CHAPTER	
1 INTRODUCTION	1
2 MATERIALS AND METHODS	8
3 RESULTS	19
4 DISCUSSION	60
5 CONCLUSION AND RECOMMENDATION	75
BIBLIOGRAPHY	81
VITA	88

LIST OF TABLES

Table — Page

1. Haematological data and globin chain synthesis in normal control. 20

2. Haematological data and globin chain synthesis in Hb H disease (α-thal$_1$/α-thal$_2$). 21

3. Haematological data and globin chain synthesis in Hb H disease with Hb Thai (α-thal$_1$/Hb Thai). ... 23

4. Haematological data and globin chain synthesis in Hb Thai trait. 24

5. α/β ratio of Hb Thai trait observed before and after gel-filtration on Sephadex G-100 chromatography. 25

6. Haematological data and α/β ratio of globin chain synthesis of family R.P. 30

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Amino acid sequences of the α^{CS1} and α^{CS2}-chains....	4
2.	Chromatography of gel-filtration on Sephadex G-100 of the labelled fresh haemolysate from reticulocytes of Hb Thai trait.	26
3.	Chain separation by CM-cellulose chromatography of radioactivity peak B from figure 2 with non-radioactive Hb A as carrier.	28
4.	Pedigree of family R.P.	29
5.	Pedigree of family N.K.	32
6.	Pedigree of family P.V.	32
7.	A summary of the means of total radioactivity of α/β chain ratio in alpha-thalassaemia syndromes.....	34
8.	Starch-gel electrophoresis in Tris-borate-EDTA buffer at pH 8.6, of fresh haemolysate, stained with o-dianisidine.	36
9.	CM-cellulose chromatography of labelled globin which was prepared from reticulocytes of Hb H disease with Hb Thai.	38
10.	Chain separation by CM-cellulose chromatography of labelled globin from bone marrow of Hb H disease with Hb Thai.	39

Figure Page

11. Preparative chain separation by CM-cellulose chromatography of whole haemolysate from peripheral blood of Hb H disease with Hb Thai, previously fractionated on Sephadex G-100 column. 40

12. Fingerprint of tryptic peptide globin chains, stained with ninhydrin, from Hb H disease with Hb Thai. 41

13. Chromatography of gel-filtration on Sephadex G-100 of the fresh lysate of labelled nucleated bone marrow cells. 43

14. Starch-gel electrophoresis in Tris-borate-EDTA buffer at pH 8.6, of haemoglobin fractions from figure 13, stained with orthodianisidine. 44

15. Chain separation by CM-cellulose chromatography of labelled globin from fraction A in figure 13 without Hb A carrier. 46

16. Chain separation by CM-cellulose chromatography of labelled globin from fraction B in figure 13 with cold Hb A carrier. 47

17. Chain separation by CM-cellulose chromatography of labelled globin from fraction C in figure 13 with cold Hb A carrier. 48

18. CM-cellulose chromatography of slow haemoglobin, previously separation on DEAE-Sephadex chromatography, with cold Hb A carrier. 50

Figure		Page
19.	Starch-gel electrophoresis in Tris-borate-EDTA buffer pH 8.6, of slow haemoglobin after separation on DEAE-Sephadex, stained with o-dianisidine.	51
20.	Preparative CM-cellulose chromatography of globin which was prepared from slow haemoglobin fractions of Hb H with Hb Thai separated on DEAE-Sephadex. ..	53
21.1	Fingerprint of tryptic peptide of α^{A}-chain control, stained with ninhydrin.	54
21.2	Fingerprint of tryptic peptide of peak C globin from figure 20.	54
21.3	Fingerprint of tryptic peptide of peak D globin from figure 20.	55
21.4	Fingerprint of tryptic peptide of peak E globin from figure 20.	55
21.5	Fingerprint of tryptic peptide of minor peak globin followed α^{A}-chain from figure 11.	56
22.1	Specific activity of the isolated Hb Thai and Hb A synthesis at 1 and 4 hours from reticulocytes of Hb H with Hb Thai.	58
22.2	Specific activity of the isolated Hb Thai and Hb A synthesis at 1 and 4 hours from bone marrow of the same patient Hb H disease with Hb Thai.	59
23.	The amino acid sequences of β- and δ-chains. ...	64