HUMAN ALPHA-GLOBIN TERMINATION MUTANTS: INTRA-ERYTHROCYTIC PATHOPHYSIOLOGY AND DNA DETECTION

CHAIRAT TURBPAIBOON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7158-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

โปรตีนแอลฟาโกลบินของมนุษย์ชนิดที่มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่งเทอร์มิเนชั่น: พยาธิสรีรวิทยาในเม็ดเลือดแดงและการตรวจพบในระดับดีเอ็นเอ (HUMAN ALPHA-GLOBIN TERMINATION MUTANTS: INTRA-ERYTHROCYTIC PATHOPHYSIOLOGY AND DNA DETECTION)

ชัยรัตน์ เติบไพบูลย์ 4437257 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., นพดล ศิริธนารัตนกุล, พ.บ., จิรันดร ยูวะนิยม, Ph.D.

บทคัดย่อ

การกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคแอลฟ่าธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่ได้เกิดจากการขาดแหว่งของยีนพบได้ในระดับความชุกที่หลากหลายในภูมิภาคอุษาคเนย์ ชนิดที่พบมากที่สุดคือฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง ฮีโมโกลบินปากเซก็เป็นการกลายพันธุ์อีกชนิดที่พบได้บ่อยเช่นกัน การกลายพันธุ์ในกลุ่มนี้ทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโกลบินที่ไม่เสถียรซึ่งมีกรดอะมิโนยาวขึ้นอีก 31 ตัวจากปกติ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าการเกาะตัวบนผนังเม็ดเลือดแดงของสายแอลฟ่าโกลบินชนิดคอนสแตนท์สปริงน่าจะเป็นสาเหตุของการทำลายแบบออกซิเดชั่นต่อผนังเม็ดเลือดแดง ดังนั้น เพื่อให้สามารถเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์นี้ในระดับโมเลกุล จึงได้ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนแอลฟ่าโกลบินชนิดต่างๆกับโปรตีนที่ช่วยรักษาเสถียรภาพของมันด้วยระบบโปรตีนลูกผสมในเซลล์ยีสต์ พบว่ามีความบกพร่องอย่างชัดเจนในการจับกันระหว่างโปรตีนแอลฟ่าโกลบินชนิดที่มีการกลายพันธุ์กับโปรตีนที่ช่วยรักษาเสถียรภาพของมันเมื่อเทียบกับโปรตีนแอลฟ่าโกลบินชนิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยโรคแอลฟ่าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินเฮชชนิดที่มีฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงกับชนิดที่มีฮีโมโกลบินปากเซพบว่ามีอาการทางคลินิกไม่ค่อยแตกต่างกันยกเว้นระดับฮีโมโกลบินเฮชซึ่งอาจมีสาเหตุจากการมีพยาธิสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน แต่จากการศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างในเรื่องของปฏิสัมพันธ์ต่อโปรตีนที่ช่วยรักษาเสถียรภาพของมัน รวมทั้งยังสามารถตรวจพบการเกาะตัวบนผนังเม็ดเลือดแดงของสายแอลฟ่าโกลบินชนิดปากเซด้วยเช่นกัน ดังนั้น การกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดนี้น่าจะมีพยาธิสรีรวิทยาที่คล้ายคลึงกัน และเนื่องจากการกลายพันธุ์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญในทางคลินิกรวมทั้งวิธีการวินิจฉัยในระดับดีเอ็นเอก็ยังมีปัญหาอยู่บ้าง ดังนั้น จึงได้พัฒนาการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีใหม่คือวิธีพีซีอาร์-เอสเอสซีพีด้วย

127 หน้า ISBN 974-04-7158-7

HUMAN ALPHA-GLOBIN TERMINATION MUTANTS: INTRA-ERYTHROCYTIC PATHOPHYSIOLOGY AND DNA DETECTION.

CHAIRAT TURBPAIBOON 4437257 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: PRAPON WILAIRAT, Ph.D., NOPPADOL SIRITANARATKUL, M.D., JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D.

ABSTRACT

Nondeletional gene mutations giving rise to α-thalassemia can be found at polymorphic frequency in Southeast Asia. Although the most common is hemoglobin Constant Spring (Hb CS), caused by a termination codon mutation (*T*AA → *C*AA, Gln) in the α2-globin gene and resulting in reduced synthesis of the α-globin variant, Hb Pakse or Hb PS (TA*A* → TA*T*, Tyr) has also been observed at a significant prevalence. These α2-globin gene termination codon mutations (α^T-globin genes) lead to the production of unstable α-globin chains elongated by 31 amino acids before the next in-frame termination codon. It was previously shown that the presence of membrane-bound α^{CS}-globin chains may account for the oxidative damage found on the red-cell membrane. To better understand the molecular mechanism underlying this phenomenon, a yeast two-hybrid system was used to assay the interaction between α^T-globin and its molecular chaperone, alpha hemoglobin-stabilizing protein (AHSP), and impaired binding of α^T-globin with AHSP compared with $\alpha^{wild\text{-}type}$-globin was observed.

Patients with α-thal 1/Hb CS and α-thal 1/Hb PS disease have quite similar clinical severity except for the different Hb H levels, suggesting possible differences in pathophysiology which may be due to the different 142nd residues of these α^T-globin chains. However, no significant difference on AHSP interaction strength between these two common α^T-globin mutants together with the presence of the α^{PS}-globins on the red-cell membrane, as previously found in the case of Hb CS, was observed in this study, suggesting that these two common α^T-globin mutants may share the same mechanism of α-thalassemic pathophysiology.

As these mutations are known to play an important role in the clinical severity of subjects and the previously established procedures of molecular diagnosis still suffer from a number of drawbacks, a convenient single-tube PCR–single-strand conformational polymorphism (SSCP) protocol for the simultaneous detection of Hb CS and Hb PS has also been developed.

KEY WORDS: α-THALASSEMIA / TERMINATION CODON MUTATION / HEMOGLOBIN CONSTANT SPRING / HB PAKSE / ALPHA-HEMOGLOBIN STABILIZING PROTEIN

127 P. ISBN 974-04-7158-7