LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

STRUCTURAL STUDIES ON

HEMOGLOBIN β-CHAIN VARIANTS

17 มี.ค. 2532

MEENA SARIKAPUTI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1988

Copyright by Mahidol University

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

18072

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาโครงสร้างฮีโมโกลบินที่มีความผิดปกติในสายเบต้า
ผู้วิจัย นางสาวมีนา สารักะภูติ
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
ดร.มรว. ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์
ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์
นายแพทย์สุทัศน์ ฟูเจริญ
วันที่สำเร็จการศึกษา 8 เมษายน 2531

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ 4 ชนิด จากผู้ป่วยไทย 3 คน

ผู้ป่วย R.K. เป็นชาวไทยอายุ 22 ปี สุขภาพปกติ แต่เมื่อนำฮีโมโกลบินของเขามาแยกในสนามไฟฟ้า ปรากฏว่าในสภาวะไม่เสียสภาพ มีฮีโมโกลบินผิดปกติเคลื่อนไปยังขั้วบวกโดยช้ากว่า HbA และในสภาวะเสียสภาพมี non α-chain variant เคลื่อนไปยังขั้วลบเร็วกว่าสาย β^A จากนั้นเตรียมฮีโมโกลบินที่ผิดปกติโดยใช้ DEAE-cellulose chromatography ได้ในปริมาณ 35% ของฮีโมโกลบินทั้งหมด และต่อมาจึงแยกสาย β^{RK} ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน CM-cellulose column เมื่อเปรียบเทียบ tryptic peptide map ของฮีโมโกลบินที่ผิดปกตินั้นกับสาย β^A จะพบว่าเปปไทด์ β^{RK} Tp 13 เคลื่อนที่ไปยังขั้วลบได้ดีกว่า β^A Tp 13 แม้ว่าจะมีกรดอะมิโนต่าง ๆ เหมือนกันก็ตาม แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ β^{RK} Tp 13 ซึ่งผิดปกตินั้นมีประจุบวกเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการแทนที่ของกลูตามิค โดยกลูตามีนที่ตำแหน่ง 121 ของสาย และสรุปได้ว่าฮีโมโกลบินที่ผิดปกติชนิดนี้เป็น HbD Punjab (α_2 $\beta_2^{121\ Glu-Gln}$)

ผู้ป่วย C.S. ผู้ป่วยเป็นหญิงซึ่งไม่ปรากฏอาการ พบว่ามีฮีโมโกลบิน 2 แถบซึ่งผิดปกติบน cellulose acetate ภายใต้สภาวะไม่เสียสภาพ ได้แก่ HbE และ HbC.S. ซึ่งเคลื่อนที่เร็ว ในขั้นแรกเมื่อผ่าน DEAE-cellulose column สามารถแยก HbE ได้ 32% และ HbC.S. ได้ 68% และต่อมาจึงแยกสายที่ผิดปกติ β^E และ β^{CS} โดยใช้ CM-cellulose

Copyright© by Mahidol University

column แล้วจึงนำมาย่อยด้วยทริปซิน และเมื่อเปรียบเทียบ fingerprint ของสายผิดปกติกับ β^A ปรากฏว่าในกรณี β^E ไม่พบเปปไทด์ β^A Tp 3 แต่จะพบเปปไทด์เพิ่มขึ้นอีก 2 ชิ้น คือ β^E Tp 3a และ β^E Tp 3b แสดงว่าเกิดการแทนที่ของกรดกลูตามิคโดยไลซีนที่ตำแหน่ง β^{26} ส่วนกรณี β^{CS} พบว่าเปปไทด์ β^{CS} Tp 5 ผิดปกติไปกล่าวคือมีประจุลบเพิ่มขึ้นและเคลื่อนไปยังขั้วบวกเร็วกว่าเปปไทด์ β^A Tp 5 จากผลการทดลองของการวิเคราะห์กรดอะมิโนและการตัดโดยใช้ $CNBr$ แสดงให้เห็นว่าใน β^{CS} นั้นไกลซีนถูกแทนที่ด้วยกรดแอสปาติคที่ตำแหน่ง 56 แสดงว่าฮีโมโกลบินผิดปกติเป็น HbJ Bangkok สำหรับในผู้ป่วยรายนี้เราสรุปได้ว่าเป็น doubly heterozygous HbJ Bangkok (α_2 $\beta_2^{56\ Gly\text{-}Asp}$) และ HbE (α_2 $\beta_2^{26\ Glu\text{-}Lys}$) เป็นรายงานที่ 2 ในประเทศไทย

ผู้ป่วย D.R. ชายไทยอายุ 36 ปี ป่วยด้วยโรคโลหิตจาง มีลักษณะเลือดคล้ายโรคทาล้สซีเมียแบบไม่รุนแรง ปรากฏว่าตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติซึ่งได้รับมาจากบิดา ฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ HbD.R. นั้นสามารถแยกโดยใช้ DEAE-cellulose column ประมาณได้ว่ามี 10% ของ Hb ทั้งหมด ในขณะที่ส่วนที่เหลือเป็น HbF และต่อมาจึงแยกสายผิดปกติ β^{DR} โดยใช้ CM-cellulose column แล้วจึงนำไปย่อยด้วยทริปซิน และทำ fingerprint เทียบกับสาย β^A ผลปรากฏว่าสายโกลบินที่ผิดปกติ β^{DR} นั้นพบเปปไทด์ δ Tp 5, δ Tp 3, Tp 5 และ δ Tp 13 แต่ไม่พบเปปไทด์ β Tp 2, β Tp 3 และ β Tp 5 แสดงว่าสายโกลบินที่ผิดปกตินั้นเป็นสาย $\delta\beta$ รวมกันแสดงว่าฮีโมโกลบินผิดปกติเป็น Hb Lepore ซึ่งสอดคล้องกับ DNA ของผู้ป่วย 7 Kb XbaI หายไปโดยผู้ป่วยน่าจะรับ $\delta\beta$-thalassemia มาจากมารดา และจากข้อมูลทั้งหมด คาดว่า Hb Lepore คงเป็นชนิด Baltimore หรือ Washington-Boston ไม่ใช่ Hollandia.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title STRUCTURAL STUDIES ON HEMOGLOBIN ß-CHAIN VARIANTS

Name Meena Sarikaputi

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Jisnuson Savasti, Ph.D.

Prapon Wilairat, Ph.D.

Suthat Fucharoen, M.D.

Date of Graduation 8 April 1988

ABSTRACT

This thesis presents the characterization of the primary structure of four different abnormal hemoglobins from three individuals in Thailand.

Propositus R.K. : A healthy twenty-two year old male with normal hematological parameters was found to have an abnormal hemoglobin migration electrophoretically towards the anode slower than Hb A in electrophoresis under non-denaturing conditions. The non α-chain variant had a cathodal electrophoretic mobility faster than the $ß^A$ chain on cellulose acetate electrophoresis under denaturing conditions. DEAE-cellulose column chromatography was used to prepare the abnormal hemoglobin, which was estimated to be 35% of total hemoglobin. Purification of the abnormal globin chain carried out on CM-cellulose column chromatography. The tryptic peptide map of the abnormal

Copyright by Mahidol University

globin chain, in comparison with that of β^A chain, revealed a more cathodal displacement of peptide β^{RK} Tp13, which had an amino acid composition identical to that of normal β^A Tp13. Since the abnormal peptide β^{RK} Tp13, had additional positive charge, it was concluded that abnormal hemoglobin resulted from a Glu-Gln replacement at position 121 of the β chain. The abnormal hemoglobin was identified as Hb D Punjab ($\alpha_2\beta_2^{121\ Glu-Gln}$).

Proposita C.S. : The hemolysate of an asymptomatic female with a normal hematological profile was shown to be composed of two abnormal bands, Hb E and a fast-moving hemoglobin (Hb C.S.), on cellulose acetate electrophoresis under non-denaturing conditions. Globin separation by cellulose acetate electrophoresis under denaturing conditions indicated that the β^{CS} chain moved towards the cathode more slowly than the β^A chain. Hb E (32%) and Hb C.S (68%) were well separated by DEAE-cellulose column chromatography, after which the purified β^E and β^{CS} globin chains were prepared by CM-cellulose column chromatography and digested with trypsin. In comparison to the β^A chain, the β^E fingerprint showed a lack of peptide β^A Tp3 and the appearance of two extra peptides β^E Tp3a and β^E Tp3b, suggesting the substitution of glutamic acid by lysine at position β26. The β^{CS} fingerprint indicated an abnormality in peptide Tp5, which had more negative charge and moved

Copyright by Mahidol University

towards the anode faster than the corresponding peptide of the β^A chain. The results from both amino acid analysis and CNBr cleavage disclosed that the fast-moving hemoglobin had a ß chain variant with a replacement of glycine by aspartic acid at position 56, characterized as Hb J (Bangkok). It was concluded that the proposita was doubly heterozygous, for Hb J Bangkok ($\alpha_2\beta_2^{56\ Gly-Asp}$) and Hb E ($\alpha_2\beta_2^{26\ Glu-Lys}$), the second such report in Thailand.

Propositus D.R. : A thirty-six year old male with anemia and a moderate thalassemia-like hematological profile was observed to possess an abnormal hemoglobin inherited from his father. The abnormal hemoglobin was detectable by cellulose acetate electrophoresis pH 9.1 as a very faint band moving towards the anode more slowly than Hb A, presumably due to a non α-type variant. Globin typing by cellulose acetate electrophoresis in acid-urea-tris-EDTA-borate buffer, pH6.5 indicated that the abnormal globin chain had a cathodal electrophoretic mobility slightly slower than or equal to the $\beta^{Lepore-Boston}$ chain. The abnormal hemoglobin was isolated in good purity by DEAE-cellulose column chromatography and estimated as 10% of total hemoglobin, while the remainder was Hb F in a very large amount. The purified abnormal globin chain, prepared by CM-cellulose column chromatography, was digested with trypsin and fingerprinted in comparison to the β^A chain. Peptide mapping studies of

Copyright by Mahidol University

the abnormal globin chain showed the presence of peptides δTp2, δTp3, δTp5 and βTp13, and loss of peptides βTp2, βTp3 and βTp5, implying that the abnormal globin chain was a δβ fused globin chain or Hb Lepore. Peptide mapping of the aminoethylated chain followed by amino acid analysis showed that the β^{PR} chain contained peptides δTp10 and βTp12b. This indicates that the Hb Lepore was of the Washington-Boston type. The existence of a fusion δβ globin gene was confirmed by the finding of a deletion of 7 kb XbaI fragment on analysis of the propositus DNA, which also revealed that the propositus should have δβ-thalassemia inherited from his mother.

Copyright by Mahidol University