LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

-5 JUN 1999

ROLE OF SPECTRIN PHOSPHORYLATION AND TRANSGLUTAMINASE ON THE PROPERTIES OF THALASSEMIC ERYTHROCYTE MEMBRANE

PORNPIMON METHEENUKUL

With compliments
of
.....

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

ISBN 974-662-033-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
P836ร
1999

310226 e.2

3836507 SCBC / M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORD : THALASSEMIA / SPECTRIN / PHOSPHORYLATION / TRANSGLUTAMINASE / CALCIUM
PORNPIMON METHEENUKUL : ROLE OF SPECTRIN PHOSPHORYLATION AND TRANSGLUTAMINASE IN THE PROPERTIES OF THALASSEMIC ERYTHROCYTE MEMBRANE. THESIS ADVISORS : RUTAIWAN TOHTONG, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., AHNOND BUNYARATVEJ, Ph.D. 99 P. ISBN 974-662-033-9

Thalassemia is a genetic disease of abnormal globin chain synthesis. In thalassemic red cells, one of the globin chains, alpha (α) or beta (β) chain, is reduced, causing the excess globin chains to bind to the membrane, resulting in various pathophysiological changes. One of the hallmarks of thalassemia is increased rigidity (or reduced deformability) of the red cell membrane, the major cause of its premature destruction by the reticuloendothelial system.

Here we determine whether spectrin phosphorylation contributes to the premature destruction of the red blood cells in thalassemic patients. We found that the level of spectrin phosphorylation in the thalassemic red cells was not significantly different from that in normal red cells, suggesting that spectrin phosphorylation is not involved. However, we cannot exclude the possibility that spectrin phosphorylation plays a role but we failed to detect the change, or that phosphorylation of other minor protein(s) may be important.

We also reported the presence of tyrosine phosphorylation in β-spectrin after vanadate treatment. Phosphotyrosine in β-spectrin of β-thalassemia/ Hb E (non-splenectomized) patients was significantly higher than that in normal control ($p < 0.05$), implying an increased phosphatidylserine exposure and increased rate of destruction of thalassemic red cells by macrophage attack.

We also suggested that the reduced deformability of the thalassemic red cells is partly due to increased activity of transglutaminase, an enzyme that covalently cross-links membrane proteins through ε(γ-glutamyl) lysine linkages. We showed that transglutaminase activity in the red cells of both Hb H and H/CS patients was significantly decreased compared to that in normal cells ($p < 0.1$). Interestingly, Immuno Blot analysis shows that the relative amount of transglutaminase present in thalassemic red cells is reduced ($p < 0.05$). However, the enzyme specific activity in splenectomized β-thal/HbE cells was significantly increased compared to that in normal cells ($p < 0.05$), supporting our contention of the possible involvement of transglutaminase in regulating deformability of the thalassemic erythrocytes.

Copyright by Mahidol University

3836507 SCBC / M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

พรพิมล เมธีนุกูล : บทบาทของการเติมหมู่ฟอสเฟตที่สเปคตริน และการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในการควบคุมคุณสมบัติการยืดหยุ่นตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (ROLE OF SPECTRIN PHOSPHORYLATION AND TRANSGLUTAMINASE IN THE PROPERTIES OF THALASSEMIC ERYTHROCYTE MEMBRANE). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., อานนท์ บุณยะรัตเวช, Ph.D. 99 หน้า. ISBN 974-662-033-9

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดปกติในการสร้างสายโกลบิน ทำให้สายโกลบินชนิดหนึ่ง (แอลฟ่า หรือ เบต้า) มีปริมาณลดลง และชนิดที่เกินสามารถไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น คุณสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งที่เปลี่ยนแปลงไปคือ ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงจะลดลง ซึ่งจะนำไปสู่การแตกทำลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นก่อนหมดอายุขัยโดยม้ามและตับ

ในโครงการวิจัยนี้เราได้ศึกษา 2 ปัจจัยซึ่งอาจเป็นตัวการที่ทำให้ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียมีลดลง ก็คือการเติมหมู่ฟอสเฟตที่สเปคตริน และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส

เราพบว่า ระดับของหมู่ฟอสเฟตที่สเปคตรินของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียไม่แตกต่างไปจากเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนปกติ ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่า การเติมหมู่ฟอสเฟตที่สเปคตรินไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับการสูญเสียคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย อย่างไรก็ดี เรามิอาจด่วนสรุปได้ว่า การเติมหมู่ฟอสเฟตที่สเปคตรินไม่ได้มีบทบาทแต่อย่างใด เนื่องจากเรามีข้อจำกัดทางเทคนิคซึ่งอาจทำให้ตรวจสอบไม่ได้ นอกจากนั้น การเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนชนิดอื่นภายในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงก็อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ

นอกจากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ serine และ threonine ของเบต้าสเปคตรินแล้ว เรายังพบว่า มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ของเบต้าสเปคตรินในเม็ดเลือดแดงที่เติม vanadate ก่อนนำมาเตรียม ghost cells โดยเราพบว่า ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β-thal/HbE ที่ยังไม่ได้ตัดม้ามมีระดับเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ของเบต้าสเปคตรินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และระดับเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิด phosphatidylserine exposure และทำให้เกิดการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงก่อนเวลาอันควร

อีกปัจจัยหนึ่งที่เราเสนอแนะคือ การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมโยงโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้พันธะ ε-(γ-glutamyl) lysine เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทั้งชนิด Hb H และ H/CS ถูกกระตุ้นน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.1$) นอกจากนี้เราพบว่า ปริมาณเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียชนิดนี้มีน้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทำให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ที่คำนวณได้มีค่าไม่แตกต่างจาก specific activity ของเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ แต่ค่า specific activity ของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β-thal/HbE ที่ได้ตัดม้ามที่คำนวณได้มีค่าสูงกว่าspecific activity ของเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติอย่างเด่นชัด ($p < 0.05$) และเป็นการสนับสนุนความสำคัญของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในการควบคุมคุณสมบัติยืดหยุ่นตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง

Copyright by Mahidol University