



STUDIES ON THE Ca^{2+} -ATPase OF
THALASSEMIC RED BLOOD CELL MEMBRANES

UDOMPUN KHANSUWAN

๒

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY (Ph.D.)
(BIOCHEMISTRY)

With compliments
of
Faculty of graduate studies, Mahidol university

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

TH
U210
1995

1995

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาการทำงานของเอนไซม์แคลเซียม เอ ที พี เอส ที่อยู่ใน เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีพยาธิสภาพเป็นโรคธาลัสซีเมีย

ผู้วิจัย อุดมภักดิ์ ขาลสุวรรณ

ปริญญา ปรัชญาคุณฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph. D.

ยงยุทธ ยุทธวงศ์ D. Phil.

ประหยัด โกมารทัต Ph. D.

กวี รัตนบรรณางกูร Ph. D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

โรคธาลัสซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม มีความผิดปกติในการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง สาเหตุของโรคเกิดจากมีการสังเคราะห์สายโกลบินอย่างไม่สมดุล มีรายงานว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็นธาลัสซีเมีย มีแคลเซียมไอออนสะสมอยู่ปริมาณมาก ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนปกติมีความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนต่ำมาก ซึ่งการควบคุมทำได้โดย 2 กลไก คือ 1. คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ในการเลือกจำกัดการนำแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ และ 2. การขับแคลเซียมไอออนออกจากเซลล์โดยการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพของเอนไซม์ แคลเซียม เอ ที พี เอส ซึ่งฝังตัวอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์

ความผิดปกติของเอนไซม์ เอ ที พี เอส ที่ทำหน้าที่ปั๊มแคลเซียม แสดงให้เห็นได้โดยการศึกษา คุณสมบัติอาร์เรเนิส, การตอบสนองต่อการกระตุ้น

ของกาลโมดุลลิน และความเข้มข้นของแคลเซียมอออน และการเกิดสารตัวกลาง ฟอสโฟเอนไซม์ พบว่า แคลเซียม เอ ที พี เอส จากเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลาสซีเมีย ทุกชนิดสูญเสียการตอบสนองต่อกาลโมดุลลิน คุณสมบัติอาร์เรเนียสเปลี่ยนไป กล่าวคือ จุดหักอาร์เรเนียสที่ 32 °ซ หายไป และ ค่าพลังงานของการกระตุ้น ปฏิกิริยาลดลง และ ปุ่มแคลเซียมที่ได้จากธาลาสซีเมียทุกชนิด สูญเสียความสามารถในการเกิดฟอสโฟเอนไซม์อีกด้วย ค่าสังเกตเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า การทำงานของ เอ ที พี เอส และ การขนส่งแคลเซียม ซึ่งอยู่ต่างตำแหน่งกันบน โมเลกุลของปุ่มแคลเซียม ได้ถูกแยกขาดออกจากกัน

สาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่ แคลเซียม เอ ที พี เอส ในธาลาสซีเมีย ได้สืบสวนไปยังผลการเกิดภาวะออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระของออกซิเจน จึงได้นำเอาเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ มาทำปฏิกิริยากับสารออกซิเดชันหลายชนิด ได้แก่ เฟินนาซีน เมโทซัลเฟต เฟินนิลไฮดราซีน เทอร์เชียรีบิวทิลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และ แซนธิน ออกซิเดส แล้วจึงศึกษา คุณสมบัติอาร์เรเนียส การตอบสนองต่อคาร์โมดุลลิน และแคลเซียม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากเม็ดเลือดแดงที่ถูกออกซิไดส์ ด้วยอนุมูลอิสระของออกซิเจนมีการเปลี่ยนคุณสมบัติต่างๆดังกล่าว ไปในลักษณะที่คล้ายกับที่พบในโรคธาลาสซีเมีย

นอกจากนี้จากการทดลองยังได้พบว่าอนุมูลอิสระของออกซิเจนมีผลเพิ่มการนำแคลเซียมเข้าสู่เม็ดเลือดแดงอีกด้วย

ในการศึกษานี้ จึงสรุปว่า การสะสมแคลเซียม ในเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลาสซีเมียสามารถเกิดขึ้นได้ ทั้งจากการยับยั้งการทำงานของ แคลเซียม เอ ที พี เอส และการเพิ่มการผ่านของแคลเซียมเข้าเซลล์ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการผลิตอนุมูลอิสระของออกซิเจนขึ้นมาภายในเซลล์อย่างมากมาย ภายหลังจากที่ฮีโมโกลบินตกตะกอนจับบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง

Thesis Title Studies on the Ca^{2+} -ATPase of
Thalassemic Red Blood Cell Membranes
Name Udompun Khansuwan
Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)
Thesis Supervisor Committee
Prapon Wilairat, Ph.D.
Yongyuth Yuthavong, D.Phil.
Prayad Komaratat, Ph.D.
Kavi Ratanabanangkoon, Ph.D.
Date of Graduation 27 May B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Thalassemia is a genetically inherited hemolytic disorder caused by imbalance synthesis of the globin chains. Accumulation of calcium ions has been reported in the thalassemic erythrocytes. Regulation of very low concentration of Ca^{2+} ions in normal human erythrocytes is accomplished by two mechanisms: slow inwards transport of the Ca^{2+} ions by selective permeability of the membrane and high efficiency protrusion of the Ca^{2+} ions by the membrane-bound Ca^{2+} -ATPase.

The abnormalities of the Ca^{2+} pump-ATPase have been elucidated by study of Arrhenius curve, response to calmodulin stimulation, Ca^{2+} -dependency, and the formation of phosphoenzyme intermediate. The Ca^{2+} -ATPase of erythrocytes from all types of thalassemias showed loss of calmodulin response, changes in the Arrhenius properties with the disappearance of the discontinuity at 32°C , a decrease in the value of activation energy at

temperature lower than 32°C, and an increase in the Ca²⁺/calmodulin-independent ATPase activity. The Ca²⁺ pump-ATPase from all types of thalassemias showed loss in the ability to form phosphoenzyme intermediate. These observations suggest an uncoupling of the two activities, ATPase and Ca²⁺-translocation, which locate on different active centers on the plasma membrane Ca²⁺ pump.

The cause of the damages to the thalassemic Ca²⁺-ATPase was investigated by examining the oxidative effects of oxygen free-radicals. Normal erythrocytes were treated with various oxidants (phenazine methosulphate, phenylhydrazine, tert-butylhydroperoxide and xanthine oxidase) and the Arrhenius properties, calmodulin response, and Ca²⁺-dependency were examined. The results showed that the changes in the properties of the enzyme from oxygen free-radical treated erythrocytes were very similar to those observed in thalassemic erythrocytes.

In addition, the effects of oxygen-free radicals to increase in Ca²⁺-permeability have also been observed in experiments on human erythrocytes.

It was concluded in this study that an accumulation of Ca²⁺ions in thalassemic erythrocytes could be caused by both uncoupling of the Ca²⁺ pump and increase in Ca²⁺-permeability. The effects could be the consequences of intracellular overproduction of oxygen free-radicals following precipitation of hemoglobin onto the erythrocyte plasma membrane.