24 JAN 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

# STUDIES ON PLASMA MEMBRANE $CA^{2+}$-ATPASE OF OXIDIZED RED CELLS

NAMPHAUNG PENGPANICHPAKDEE

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2002

TH
N174a
2002
c.2

ISBN-974-04-02448-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

4036417 SCBC/M : MAJOR: BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : $CA^{2+}$-ATPASE / OXIDATION / THALASSEMIA

NAMPHAUNG PENGPANICHPAKDEE: STUDIES ON PLASMA MEMBRANE $CA^{2+}$-ATPASE OF OXIDIZED RED CELLS. THESIS ADVISORS: PRAPON WILAIRAT, Ph.D., PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D. 106 P.
ISBN 974-04-02448-1

In thalassemia, the synthesis of one or more globin chains is defective leading to an imbalance of the globins which causes unmatched chains to attach to the red cell membrane resulting in oxidative damage to the thalassemic erythrocyte membrane. The resultant exposure to reactive oxygen species may lead to a number of membrane changes including lipid peroxidation, protein cross-linking, protein fragmentation and inhibition of ion transporting enzymes. Accumulation of calcium and defective function of the $Ca^{2+}$-ATPase in thalassemic erythrocyte, namely, high activity and loss of response to calmodulin have been reported. Since $Ca^{2+}$-ATPase is responsible for the regulation of calcium homeostasis in red cells, we have studied the effects of the oxidative stress process on erythrocyte plasma membrane $Ca^{2+}$-ATPase in order to mimic the properties of thalassemic enzyme. We have treated normal red blood cell membrane with diamide, tert-butylhydroperoxide and calpain. Activity of $Ca^{2+}$-ATPase was measured by a coupled enzyme method. The results indicated that diamide and tert-butylhydroperoxide inhibited $Ca^{2+}$-ATPase activity, both basal and stimulated with calmodulin, and did not produce $Ca^{2+}$-ATPase activity that resembled the thalassemic condition. Treatment with calpain activated basal $Ca^{2+}$-ATPase activity and abrogated response to calmodulin stimulation, properties that resembled the thalassemic condition. We also studied the effects of combination of calpain and diamide on $Ca^{2+}$-ATPase activity based on the hypothesis that oxidation and proteolysis may have occurred together in thalassemic red cells. We found that diamide treatment resulted in loss of $Ca^{2+}$-ATPase activity of calpain-digested enzyme, both basal and calmodulin-stimulated. Similarly, calpain could not activate diamide-oxidized $Ca^{2+}$-ATPase activity.

Copyright by Mahidol University

4036417 SCBC/M : สาขาวิชา: ชีวเคมี; วท.ม. (ชีวเคมี)

น้ำผึ้ง เพ็งพานิชภักดี : การศึกษา การทำงานของเอ็นไซม์แคลเซียม เอ ที พี เอส ที่อยู่ในเยื่อเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่ถูกออกซิไดซ์ (STUDIES ON PLASMA MEMBRANE $CA^{2+}$-ATPASE OF OXIDIZED RED CELLS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D,พิมพ์ใจ ใจเย็น Ph.D.106 หน้า ISBN 974-04-02448-1

โรคธาลาสซีเมีย มีสาเหตุของโรคเกิดจากการสังเคราะห์สายโกบินขาดไป มีผลทำให้มีความไม่สมดุลย์ของสายโกลบิน ซึ่งเป็นสาเหตุให้สายโกลบินที่ขาดคู่ไปจับเกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงก่อให้เกิดภาวะออกซิเดชั่น ผลของภาวะออกซิเดชั่นทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง เช่น เกิดการออกซิไดร์ไขมัน, การคลอสลิ้งของโปรตีน, การหลุดจากกันของโปรตีน และยังมีรายงานว่ามีการสะสมแคลเซียม และหน้าที่ของแคลเซียมปั๊มเสียไปคือ มีการทำงานมากขึ้นแต่ตอบสนองต่อคาลโมดูลินลดลง เนื่องจากว่าแคลเซียม เอ ที พี เอส มีหน้าที่รับผิดชอบต่อการรักษาสมดุลของแคลเซียมในเม็ดเลือดแดง เราจึงศึกษาผลของการออกซิเดชั่น ที่มีต่อเอนไซม์แคลเซียม เอ ที พี เอส โดยเลียนแบบคุณสมบัติของเอนไซม์ แคลเซียม เอ ที พี เอส ในเม็ดเลือดแดงของโรค ธาลาสซีเมีย เราได้ทำการทดลองโดยการออกซิไดซ์ เยื่อหุ้มเซลล์เของเม็ดเลือดแดงปกติด้วยไดอะไมด์, เทอร์ –บิวทิวไฮโดรเพอรอกไซด์และคาลเพน การทำงานของเอนไซม์แคลเซียม เอ ที พี เอส ตรวจวัดด้วย วีธีปฏิกิริยาควบคู่ จากผลการทดลองพบว่า ไดอะไมด์ และเทอร์-บิวทิวไฮโดรเพอรอกไซด์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอ ที พี เอส ทั้งในภาวะปกติและภาวะที่ดูกกระตุ้นด้วยคาลโมดูลิน ซึ่งแสดงให้เห็นด้วยว่า มีลักษณะไม่คล้ายกับที่พบในโรคธาลาสซีเมีย คาลเพนมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอ ที พี เอส แต่ก็ทำให้การตอบสนองต่อคาลโมดูลินเสียไป การเปลี่ยนคุณสมบัติดังกล่าวไปในลักษณะที่คล้ายกับที่พบในโรคธาลาสซีเมีย

เรายังได้ศึกษาผลของการรวมกันระหว่างไดอะไมด์และคาเพนภายใต้สมมุติฐานที่ว่าการออกซิเดชั่นและการตัดเอนไซด์เกิดขึ้นพร้อมกันได้ในโรค ธาลาสซีเมีย เราพบว่า ไดอะไมด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกตัดทิ้งภาวะปกติและภาวะที่ถูกกระตุ้นเอนไซม์แคลเซียม เอ ที พี เอส ที่ถูกออกซิไดซ์ตาย ไดอะไมด์ได้

Copyright by Mahidol University