

ABSTRACT

Project Code : TRG5380010

Project Title : Roles of proteins involving in anion exchanger 1 trafficking in human kidney cells

Investigator : Dr. Mutita Junking Mahidol University

E-mail Address : mjunking@yahoo.com, mutita.jun@mahidol.ac.th

Project Period : June 2010 – May 2012

Distal renal tubular acidosis (dRTA) is a kidney disease characterized by defect of acid secretion by the α -intercalated cells of the cortical collecting duct of the distal nephron. Development of dRTA is result from impaired trafficking of kidney anion exchanger 1 (kAE1), a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger at the basolateral membrane of α -intercalated cells. The trafficking route of kAE1 from its biosynthesis site to the basolateral membrane has not been well characterized. We have recently reported that AP-1 μ 1A, a subunit of AP-1A adaptor complex involving in sorting of the cargo proteins, interacts with the C-terminus of kAE1. In this study, role of basolateral-related sorting proteins including adaptor protein complexes, clathrin, and protein kinase D on kAE1 localization were determined using RNA interference (RNAi) in polarized MDCK cells. Suppression of AP-1A, AP-3, AP-4, and clathrin reduced membranous kAE1. The interaction between kAE1 and sorting proteins was observed by co-immunoprecipitation and yellow fluorescent protein-based protein fragment complementation assay (YFP-PCA) in HEK 293T cells. Moreover, co-localization between kAE1 and sorting proteins was investigated by immunofluorescence staining in human kidney tissues. To gain a better understanding into normal kAE1 trafficking, further studies would be carries out in polarized kidney cell lines to examine next steps of trafficking involving transportation along cytoplasm, tethering, and fusion of kAE1 to membrane. The investigation of normal trafficking of human kAE1 will provide a new perception into a molecular mechanism associated with the pathogenesis of dRTA.

Keywords : kidney anion exchanger 1, distal renal tubular acidosis, protein trafficking, sorting protein

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5380010

ชื่อโครงการ : การศึกษาบทบาทของโปรตีนที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายโปรตีนแอนไอออน
เอ็กเชนเจอร์-วัน ในเซลล์ไตของมนุษย์

ชื่อนักวิจัย : ดร. มุทิตา จุกกิง มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : mjunking@yahoo.com, mutita.jun@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : มิถุนายน 2553 - พฤษภาคม 2555

โรคไตผิดปกติในการขับกรด (distal renal tubular acidosis) ที่ทำให้ผู้ป่วยโรคนี้มีความเป็นกรดในร่างกาย เนื่องจากไตไม่สามารถขับกรดออกทางปัสสาวะได้ เกิดจากการขนส่งหรือการเคลื่อนย้ายโปรตีนแอนไอออนเอ็กเชนเจอร์-วันชนิดที่พบในไต (kidney anion exchanger 1; kAE1) ที่ปกติจะเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณอื่นของเซลล์ (basolateral membrane) เกิดความผิดปกติโดยเคลื่อนไปยังบริเวณอื่นของเซลล์ ทำให้โปรตีน kAE1 ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการแลกเปลี่ยนคลอไรด์และไบคาร์บอเนต ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) เข้าออกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ตามปกติ ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของโรคไตผิดปกติในการขับกรด ปัจจุบันกลไกการเคลื่อนย้ายของโปรตีน kAE1 ในภาวะปกติที่จะเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณอื่นของเยื่อหุ้มของเซลล์หลังจากที่มีการสังเคราะห์โปรตีนออกมาแล้วนั้น ยังไม่มีคำอธิบายหรือการศึกษาที่ชัดเจนว่าใช้กลไกใด และมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งชนิดใดบ้างที่เกี่ยวข้อง ในช่วงที่ผ่านมาคณะผู้วิจัย ได้มีการรายงานพบโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีนอื่นไปยังส่วนฐานของเยื่อหุ้มเซลล์คือ Adaptor-related protein complex 1 μA (AP-1 μA) สามารถจับได้กับบริเวณปลายคาร์บอกซีของโปรตีน kAE1 และมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายโปรตีน kAE1 ไปยังบริเวณที่ถูกต้อง อย่างไรก็ตามโปรตีน AP-1 μA ไม่ได้เป็นโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่ขนส่งโปรตีน kAE1 ไปเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากเมื่อลดการแสดงออกของโปรตีน AP-1 μA แล้ว ยังมีโปรตีน kAE1 บางส่วนที่ยังสามารถเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ได้ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบบทบาทของโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งชนิดอื่นๆ นอกจากโปรตีน AP-1 μA ที่มีการรายงานว่าสามารถขนส่งโปรตีนอื่นไปยังส่วนฐานของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยผู้วิจัยได้ลดการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวด้วยเทคนิค RNA interference และพบว่า มีโปรตีนอีก 3 ชนิด นอกจาก AP-1 μA มีผลต่อการเคลื่อนย้ายโปรตีน kAE1 ไปยังส่วนฐานของเยื่อหุ้มเซลล์เพาะเลี้ยงไตสุนัขที่ทำให้เกิดขั้ว (polarized MDCK cells) ได้แก่ โปรตีน AP-3, AP-4 และ Clathrin ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ได้มีการศึกษาปฏิสัมพันธ์กับระหว่างโปรตีนเหล่านี้กับโปรตีน kAE1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงไตมนุษย์ (HEK 293T cells) ด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation และ yellow fluorescent protein-based protein fragment complementation assay (YFP-PCA) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า AP-3, AP-4 และ Clathrin มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน kAE1 และยังพบว่า

โปรตีนเหล่านี้มีการแสดงออกที่ตำแหน่งหรือบริเวณเดียวกันกับโปรตีน KAE1 ภายในเซลล์ของตัวอย่างชิ้นเนื้อจากไตมนุษย์จากการศึกษาด้วยเทคนิควิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence) ข้อมูลที่ได้เป็นการยืนยันผลที่ได้จากการวิจัยแบบ *in vitro* study และจะเป็นข้อมูลเพื่อใช้ศึกษาให้ทราบถึงบทบาทของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน KAE1 และทราบถึงกลไกหรือกระบวนการในการเคลื่อนย้ายโปรตีน KAE1 ในเซลล์ไตของมนุษย์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทำให้เข้าใจกลไกการเกิดโรค การพัฒนาเทคโนโลยีในการศึกษาการเคลื่อนย้ายและหน้าที่ของโปรตีน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆ ต่อไปในอนาคต

คำหลัก : โปรตีนแอนไอออนแอ็กเซนเจอร์-วัน โรคไตผิดปกติในการขับกรด กระบวนการเคลื่อนย้ายโปรตีน โปรตีนขนส่ง