Abstract

Project Code: TRG5780294

Project Title: Quantitative peptidomics of renal tubular epithelial cells under TGF-β1 microenvironment using mass spectrometry-based approach

Investigator: Rattiyaporn Kanlaya (Ph.D.), Medical Proteomics Unit, Mahidol University

E-mail Address: r.kanlaya@gmail.com

Project Period: 2 years

TGF-β1 is well-recognized as a key fibrotic factor mediated epithelial mesenchymal transition (EMT) and tissue fibrosis including kidney. Many signaling pathways regarding its action have been extensively investigated. However, no such effort has been performed to elucidate its contribution to EMT by regulating of proteolytic cleavage and subsequent endogenous peptide dynamic. Here we reported for the first time the quantitative peptidomics of renal proximal tubular epithelial cells undergone TGF-β1-induced EMT. The acquired mesenchymal characteristics were initially confirmed by the morphological change from cobblestone-like into fibroblast-like cells, the increased mesenchymal protein vimentin, and the decreased epithelial protein ZO-1. Most, but not all of the endogenous peptides decreased in their expression with only few of them was increased and unchanged when compared to the controlled cells. The peptides were derived from forty-three precursor proteins mainly observed in the cytoplasm, plasma membrane, nucleus, and mitochondria, respectively. Most of the peptides was derived from the internal part with some were corresponded to C-terminal parts of the precursor proteins. Interestingly, majority of the peptides was not derived from short-lived proteins and analysis of P1 position revealed a frequency for hydrophobic residues. It is likely that these peptides were fostered by proteasome activity. To deciphering the contribution of proteasome in endogenous peptide generation by MG132 treatment, it was confirmed our hypothesis that most of the endogenous peptides generated under TGF-β1 was resulting from the proteasome. Our findings also suggest that TGF-β1 may exert inhibitory effect on proteasome during induction of EMT. In addition, the present study provides the novel aspect of TGF-β1 signaling that has never been reported before.

Keywords: Epithelial mesenchymal transition, Peptidomics, Proteasome, Renal fibrosis, TGF- β1

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780294

ชื่อโครงการ: การศึกษาเชิงปริมาณของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ท่อไตภายใต้สภาวะที่มี TGF-β1 ด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมตรี

ชื่อนักวิจัย: ดร.รัตติยาภรณ์ กัลยา สังกัดหน่วยโปรตีโอมิกส์ทางการแพทย์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : r.kanlaya@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ:2 ปี

TGF-β1 เป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Epithelial mesenchymal transition (EMT) และการเกิดพังผืดของอวัยวะต่าง ๆ รวมถึงไตด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของ TGF-β1 ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของสารนี้ผ่านกระบวนการย่อยโปรตีน (Proteolytic cleavage) และเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากการตัดโปรตีนซึ่งอาจส่งผลส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ EMT ในเซลล์ท่อไตได้ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเชิงปริมาณของการสร้างเปปไทด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ(Endogenous peptide) ในเซลล์ท่อไตเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิด EMT ด้วย TGF-β1 โดยเทคนิคแมสสเปคโตรเมตรี ผลการศึกษาพบว่า TGF-β1 สามารถกระตุ้นเซลล์ท่อไตให้เกิดกระบวนการ EMT ได้ โดยยืนยันได้จากการที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก Epithelial cell เป็น Fibroblast-like cell รวมทั้งมีการสร้างโปรตีน ZO-1 ซึ่งใช้บ่งชี้สภาวะของ Epithelial cell ที่ลดลง และสร้างโปรตีน vimentin ซึ่งใช้บ่งชี้สภาวะ EMT ที่เพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาปริมาณของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติที่สกัดได้จากสภาวะดังกล่าวพบว่า เปปไทด์โดยส่วนมากมีปริมาณลดลง และมีจำนวนน้อยที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ที่สกัดได้จากเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยเปปไทด์เหล่านี้ถูกตัดมาจากโปรตีน 43 ชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในไซโตพลาสซึม พลาสมาเมมเบรน นิวเคลียส และไมโตคอนเดรียตามลำดับ ซึ่งเปปไทด์โดยส่วนมากถูกตัดออกมาจากส่วนกลางของโปรตีน และมีบางเปปไทด์ที่ถูกตัดออกมาจากด้าน C-terminus ของโปรตีน นอกจากนี้พบว่าโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มีครึ่งชีวิตยาวและมีความเสถียร เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งการตัดของเปปไทด์พบว่ามีกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วที่ตำแหน่ง P1 เป็นจำนวนมากซึ่งอาจบ่งชี้ว่าเปปไทด์เหล่านี้ถูกตัดออกมาโปรตีนโดยการทำงานของ proteasome จึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวด้วยการใช้ตัวยับยั้งการทำงานของ proteasome พบว่าผลเป็นไปตามที่คาดไว้คือเซลล์สร้างปริมาณเปปไทด์ได้ลดลงเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ proteasome จึงสรุปว่าเมื่อเซลล์ท่อไตถูกเหนี่ยวนำด้วย TGF-β1 ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการ EMT จะเกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติภายในเซลล์ โดยส่งผลให้การสร้างเปปไทด์โดยส่วนมากมีปริมาณลดลงและเปปไทด์เหล่านี้ถูกตัดมาจากโปรตีนโดยการทำงานของ proteasome นอกจากนี้ผลการทดลองยังสนับสนุนว่า TGF-β1 อาจจะมีผลยับยั้งการทำงานของ proteasome ได้อีกด้วย

คำหลัก :การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ท่อไต,การเกิดพังผืดในไต, Peptidomics, Proteasome, TGF-β1