

**THE REGULATORY MECHANISM OF ORGANIC ANION  
TRANSPORT VIA ORGANIC ANION TRANSPORTER 3 (OAT3)**

**SUNHAPAS SOODVILAI**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(PHYSIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2005**

**ISBN 974-04-6437-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

## กลไกการควบคุมของการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบผ่านตัวขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ 3 (THE REGULATORY MECHANISM OF ORGANIC ANION TRANSPORT VIA ORGANIC ANION TRANSPORTER 3 (OAT3))

สันทาส สุตวิสัย 4436724 SCPS/D

ปร.ค. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรณัฐ ฉัตรสุทธิพงษ์, Ph.D., สมัยศึก โสภาสรรค์, Ph.D.,  
Stephen H. Wright, Ph. D., William H. Dantzer, M.D., Ph.D.

## บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษากลไกการควบคุมการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบผ่านตัวขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบ 3 (OAT3) พบที่หลอดเลือดส่วนต้นของกระต่าย พบว่าการกระตุ้นโปรตีนไคเนสซี (PKC) ด้วยสาร phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) มีผลยับยั้งการขนส่งเอสโตรเจน (ES) ซึ่งถูกขนส่งโดย OAT3 ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่าย และยังพบว่าสารยับยั้งการทำงานของ PKC (bisindolylmaleimide I) สามารถกลับล้างฤทธิ์ของ PMA ต่อการขนส่ง ES การกระตุ้นการทำงานของ PKC ด้วยสาร phenylephrine ผ่าน receptor ส่งผลต่อการขนส่ง ES คล้ายคลึงกับการกระตุ้น PKC โดยตรงด้วย PMA ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สนับสนุนข้อสรุปที่ว่าการทำงานของ PKC นำไปสู่การยับยั้งการทำงานของ OAT3 ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่าย ในทางตรงกันข้าม epidermal growth factor (EGF) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ MAPK มีผลเพิ่มการขนส่ง ES ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่าย การทดลองนี้ยังพบว่า Prostaglandin E2 (PGE2) และ db-cAMP มีผลเพิ่มการขนส่ง ES ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่ายด้วย และผลของ prostaglandin E2 (PGE2) และ db-cAMP ถูกกลับล้างฤทธิ์ด้วยสารยับยั้งการทำงานของ PKA (H-89) จากข้อมูลนี้สรุปได้ว่า PGE2 และ db-cAMP มีผลต่อการขนส่ง ES ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่ายโดยทำงานผ่าน PKA นอกจากนี้การยับยั้ง cyclooxygenase 1 (COX1) ด้วยสาร SC560 ยังสามารถยับยั้งการขนส่ง ES ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่ายอีกด้วย ผลของ EGF ต่อการขนส่ง ES สามารถถูกยับยั้งโดยสารที่ขัดขวางการทำงานของ PKA หรือ COX1 ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า EGF กระตุ้นการขนส่ง ES โดยผ่านการทำงานของ MAPK ส่งผลให้มีการสร้าง PGE2 เพิ่มขึ้นและตามด้วยการกระตุ้นการทำงานของ PKA นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ tyrosine kinase ด้วยสาร genistein และ phosphatidylinositol3-kinase (PI3-K) ด้วยสาร wortmannin นำไปสู่การยับยั้งการทำงานของ OAT3 ในหลอดเลือดส่วนต้นของกระต่าย จากข้อมูลนี้สรุปได้ว่าทั้ง tyrosine kinase และ PI3-K มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของ OAT3 ในภาวะปกติ และการทำงานของ tyrosine kinase และ PI3-K ยังมีความสัมพันธ์กับ MAPK ในการควบคุมการทำงานของ OAT3 ด้วย โดยในการควบคุมการทำงานของ OAT3 นั้น PI3K จะถูกกระตุ้นก่อนแล้วจึงมีผลกระตุ้น MAPK ในขณะที่ tyrosine kinase จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ OAT3 หลังจากที่ MAPK ได้รับการกระตุ้นแล้ว การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงถึงกลไกการควบคุมการขนส่งสารอินทรีย์ประจุลบโดยผ่าน OAT3 ในหลอดเลือดส่วนต้น

**THE REGULATORY MECHANISM OF ORGANIC ANION TRANSPORT VIA ORGANIC ANION TRANSPORTER 3 (OAT3).**

SUNHAPAS SOODVILAI 4436724 SCPS/D

PH. D (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISORS: VARANUJ CHATSUDTHIPONG, PH.D., SAMAISUKH SOPHASAN, PH.D., WILLIAM H. DANTZLER, PH.D., STEPHEN H. WRIGHT, PH.D.

**ABSTRACT**

The regulatory mechanism of organic anion transport driven by the organic anion transporter 3 (OAT3), a multispecific OAT localized at the basolateral membrane of the renal proximal tubule, was examined using isolated rabbit renal proximal tubules. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a PKC activator, inhibited uptake of estrone sulfate (ES), a prototypic substrate for OAT3, into renal proximal tubule in a concentration- and time-dependent manner. This inhibition was reduced by 100 nM bisindolylmaleimide I (BIM), a specific PKC inhibitor. The  $\alpha$ 1-adrenergic receptor agonist phenylephrine also inhibited ES uptake, and this effect was reduced by BIM. These results suggested that PKC activation downregulates OAT3-mediated organic anion transport. In contrast, epidermal growth factor (EGF), which activated mitogen-activated protein kinase (MAPK) increased ES uptake. Exposing the tubules to prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) or dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) also enhanced ES uptake. Stimulation produced by PGE<sub>2</sub> and db-cAMP was prevented by the PKA inhibitor, H-89, indicating that this stimulation required PKA activation. In addition, inhibition of COX1 (but not COX2) inhibited ES uptake. Furthermore, the stimulatory effect of EGF was eliminated by inhibition of either COX1 or PKA. These data supported the idea that EGF stimulates ES uptake by a process in which MAPK activation results in increased PGE<sub>2</sub> production that in turn activates PKA and subsequently stimulates ES uptake. Inhibition of tyrosine kinase by genistein and phosphatidylinositol3-kinase (PI3K) by wortmannin led to the downregulation of OAT3. These data indicated that under physiological condition OAT3 activity is under the tonic influence by both tyrosine kinase and PI3K. Moreover, these kinases were apparently involved in the MAPK pathway for EGF stimulation of organic anion transport by OAT3 with PI3K acting upstream and tyrosine kinase acting downstream of ERK activation. This study is the first to show the regulatory response of organic anion transport driven by OAT3 in intact renal proximal tubules.

**KEY WORDS: ORGANIC ANION / TRANSPORT/ OAT3 / KIDNEY/  
PROXIMAL TUBULE**

129 P. ISBN 974-04-6437-8