

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROTEIN BINDING TO  
ANION EXCHANGER 1 (AE1) IN HUMAN KIDNEY**

**THITIMA KESKANOKWONG**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การแยกและการค้นหาโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ โปรตีนแอนไอออนเอ็กซ์เชนเจอร์-วันไนไตของมนุษย์  
(ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROTEIN BINDING TO ANION EXCHANGER 1 (AE1) IN HUMAN KIDNEY)

ฐิติมา เกศกนกวงศ์ 4536651 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D., เพทชาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D., สกกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., วิฑูรย์ ธีระโสภณ, Ph.D., ลีลี่ เอื้อวิไลจิตร, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

โปรตีน kidney anion exchanger 1 (kAE1) ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนคลอไรด์กับไบคาร์บอเนตที่ basolateral membrane ของเซลล์ขั้บกรดในไต โปรตีนนี้เป็น isoform ของ erythroid anion exchanger 1 (eAE1) โดยมีกรดอะมิโน 65 ตัวที่ปลายอะมิโนน้อยกว่า eAE1 ซึ่งอาจมีผลทำให้โปรตีนทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์ต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน มีเวดจ์ของยีน AE1 มีหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคไตผิดปกติในการขั้บกรด ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน AE1 จากผลของมีเวดจ์ อาจนำไปสู่ความผิดปกติของการขนส่งโปรตีน หรือการเคลื่อนย้ายของ kAE1 ไปยังตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม การศึกษาต่อมาพบว่าทั้งปลายอะมิโน และปลายคาร์บอกซี ของ AE1 เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการขนส่งและการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังตำแหน่งที่ถูกต้อง ปัจจุบันยังไม่พบ โปรตีนที่จับกับปลายอะมิโนของ kAE1 (NkAE1) ตลอดจนความเข้าใจกลไกการขนส่ง kAE1 โดยผ่านโปรตีนตัวอื่นในเซลล์ของไตมนุษย์ยังไม่มีความรู้มากนัก วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ การค้นหาโปรตีนที่จับกับ NkAE1 ด้วยวิธี yeast two-hybrid จากนั้นคัดเลือกโปรตีนที่ได้ คือ integrin-linked kinase (ILK), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase และ pantophysin นำมาวิเคราะห์ในรายละเอียดเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์กับ kAE1 ด้วยวิธี co-immunoprecipitation, affinity co-purification และ immunofluorescence staining ในเซลล์เพาะเลี้ยง HEK 293 ผลการวิเคราะห์ยืนยันความจำเพาะของการจับของโปรตีนทั้งสามกับ NkAE1 แต่การศึกษาด้วยวิธี cell surface biotinylation แสดงให้เห็นว่าเฉพาะ ILK ที่เพิ่มการแสดงออกของ kAE1 ที่ผิวเซลล์ นอกจากนี้ ILK ยังทำให้มีการเพิ่มการแลกเปลี่ยนไอออนของ kAE1 อย่างชัดเจน ทำให้ได้ข้อสรุปว่า ILK น่าจะมีบทบาทต่อการขนส่ง kAE1 โดยใช้ calponin homology (CH) domain ของ kAE1 ในการจับกับปลายคาร์บอกซีของ ILK ในขณะที่ ankyrin repeats, PH domain และ ผลของ phosphorylation ของ ILK ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังพบว่า ILK สามารถจับกับ eAE1 ได้ แสดงว่ากรดอะมิโน 65 ตัวที่ปลายด้านอะมิโนของ eAE1 ไม่มีผลต่อการมีอันตรกิริยาของโครงสร้างของ eAE1 ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะในส่วนของ CH domain การศึกษานี้บ่งชี้ว่าการจับกันของ kAE1 และ ILK เป็นส่วนของกลุ่มโปรตีนที่ประกอบด้วย kAE1 ILK paxillin และ actopaxin โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ILK เป็นตัวเชื่อมที่สำคัญระหว่าง kAE1 กับ cytoskeleton โดยผ่าน actin ที่สามารถจับกับกลุ่มโปรตีนนี้ได้ ซึ่งทำให้การคงอยู่ของ kAE1 ที่ plasma membrane มีเสถียรภาพเป็นผลให้มีการแสดงออกของ kAE1 ที่ผิวเซลล์ในระดับที่สูงขึ้น

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROTEIN BINDING TO ANION EXCHANGER 1 (AE1) IN HUMAN KIDNEY**

THITIMA KESKANOKWONG 4536651 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., PA-THAI YENCHIT SOMANUS, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., WITON TIRASOPHON, Ph.D., LILY EURWILAICHITR, Ph.D.

**ABSTRACT**

Kidney anion exchanger 1 (kAE1) mediates  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange at the basolateral membrane of kidney  $\alpha$ -intercalated cells. It is an isoform of erythroid AE1 (eAE1) and lacks 65 amino acids at its amino terminus. This may cause some structural changes and altered protein-protein interaction in kAE1. Several mutations in the AE1 gene have been found and associated with Distal Renal Tubular Acidosis (dRTA). The proposed mechanism of the dRTA is involved in defects of protein trafficking or mis-targeting to an appropriate site of the  $\alpha$ -intercalated cells. Both the C- and N-termini of kAE1 are required for correct basolateral localization of proteins in polarized epithelial cells. However, the human proteins interacting with the N-terminus have not been identified. Therefore, this study aimed to identify proteins interacting with NkAE1 that may be involved in the kAE1 trafficking. Yeast two-hybrid screening revealed interactions with several proteins including integrin-linked kinase (ILK), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and pantophysin (PPH). Interaction between kAE1 and the selected proteins was demonstrated in the co-expression experiments including co-immunoprecipitation, affinity co-purification and immunofluorescence staining in human embryonic kidney (HEK 293) cells. Interestingly, cell surface biotinylation results showed that ILK, but not GAPDH and pantophysin, promoted cell surface expression of kAE1. ILK also enhanced  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  transport activity of kAE1 in line with the observed increase of cell surface expression. Mapping analysis revealed that kAE1 interacts with the C-terminus of ILK through the kAE1 calponin homology (CH) domain. In addition, the ankyrin repeats, PH domain and kinase activity of ILK were not required for binding ability to kAE1 and cell surface expression of kAE1. ILK also interacted with eAE1 suggesting that lack of the 65 amino acids of kAE1 would not alter the folded structure of CH domain in eAE1. However, overexpression of ILK did not significantly increase cell surface expression of eAE1 when compared with that of kAE1 in which ILK might play a role in an isoform specific manner as a key protein to increase the level of kAE1 on the cell surface of the kidney cells. Further investigation found that ILK promotes kAE1 expression at the cell surface in HEK 293 cells by forming kAE1-ILK-paxillin-actopaxin complex links kAE1 to the actin cytoskeleton. This study presents data demonstrating that ILK provides a linkage between kAE1 and the underlying actin cytoskeleton to stabilize kAE1 at the plasma membrane, resulting in the higher level of cell surface expression.

**KEY WORDS:** kAE1 / PROTEIN TRAFFICKING / YEAST TWO-HYBRID / ILK / CH DOMAIN

186 pp.