PROTEOME ANALYSIS OF ALTERED PROTEIN EXPRESSION IN DISTAL RENAL TUBULAR EPITHELIAL CELLS DURING POTASSIUM DEPLETION

NARDTAYA AUSAKUNPIPAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์ท่อไตส่วนปลายในภาวะขาดโปแตสเซียมโดยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (PROTEOME ANALYSIS OF ALTERED PROTEIN EXPRESSION IN DISTAL RENAL TUBULAR EPITHELIAL CELLS DURING POTASSIUM DEPLETION)

ณาตยา เอื้อสกุลพิพัฒน์ 4737624 SIIM/M
วท.ม. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิศิษฏ์ ทองบุญเกิด, พ.บ., ว.ว. (อายุรศาสตร์โรคไต);
ปรีดา มาลาสิทธิ์, พ.บ., อ.ว. (อายุรศาสตร์โรคไต)

บทคัดย่อ

โรคไตที่เกิดจากภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ หรือ hypokalemic nephropathy เป็นโรคที่รู้จักกันมานาน แต่กลไกการเกิดพยาธิสภาพยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าท่อไตเป็นส่วนที่ได้รับผลกระทบจากการเกิดภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ เมื่อรักษาโดยการให้โปแตสเซียมแล้วสามารถทำให้ไตกลับมาทำงานได้เป็นปกติ ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นถึงการหาโปรตีนที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเกิดภาวะโปแตสเซียมต่ำทั้งในระยะเฉียบพลันและเรื้อรังในเซลล์บุท่อไตส่วนปลาย นอกจากนี้ยังศึกษาถึงการกลับคืนสู่ปริมาณปกติของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับโปแตสเซียม เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ การแยกโปรตีนของเซลล์ท่อบุไตส่วนปลายโดยวิธีโปรตีโอมิกส์เพื่อเปรียบเทียบหาโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณโปแตสเซียมปกติ กับอาหารที่มีโปแตสเซียมต่ำ และไม่มีโปแตสเซียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับระยะเฉียบพลันและ 10 วันสำหรับระยะเรื้อรัง จากนั้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโปแตสเซียมต่ำ และไม่มีโปแตสเซียม ทั้งในระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง จะถูกนำมาเลี้ยงต่อในอาหารที่มีปริมาณโปแตสเซียมปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 10 วันตามลำดับ พบว่ามีโปรตีนจำนวน 130 จุดที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการเกิดภาวะโปแตสเซียมทั้งในระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจำนวน 8 จุดในกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโปแตสเซียมต่ำเทียบกับโปแตสเซียมปกติ ,โปรตีนจำนวน 101 จุดในกลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโปแตสเซียมปกติเทียบกับไม่มีโปแตสเซียม, และโปรตีนจำนวน 21 จุดในการเปรียบเทียบของทั้ง 2 กลุ่มข้างต้น สิ่งที่น่าสนใจคือมีโปรตีนจำนวน 24 จุดจาก 130 จุดที่สามารถกลับมามีปริมาณโปรตีนเท่ากับภาวะโปแตสเซียมปกติหลังจากได้รับโปแตสเซียมกลับคืน เมื่อใช้เทคนิค Q-TOF mass spectrometry (MS) และ/หรือ tandem mass spectrometry (MS/MS) สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 101 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มต่างๆดังนี้ metabolic enzymes, signaling proteins, stress-regulatory proteins, plasma proteins, transport proteins, cytoskeleton proteins, translation/transcription factors, Ca^{2+}-binding proteins และโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการเน้นย้ำถึงประโยชน์ของเทคนิคโปรตีโอมิกส์ ที่ใช้ในการหากลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคได้ในระดับโมเลกุล ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดแนวทางใหม่ในการศึกษาวิจัยโรค hypokalemic nephropathy
127 หน้า

PROTEOME ANALYSIS OF ALTERED PROTEIN EXPRESSION IN DISTAL RENAL TUBULAR EPITHELIAL CELLS DURING POTASSIUM DEPLETION

NARDTAYA AUSAKUNPIPAT 4737624 SIIM/M

M.Sc.(IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS: VISITH THONGBOONKERD, M.D., F.R.C.P.T.;
PRIDA MALASIT, M.D., F.R.C.P.

ABSTRACT

Renal involvement of prolonged K^+ deficiency or hypokalemic nephropathy has been characterized for a half of a century. However, its molecular mechanisms remain unclear. Previous studies have demonstrated that the main intrarenal structure that is involved during K^+ depletion is the renal tubule and that kidney dysfunction may be reversible after K^+ repletion therapy. Therefore, this study focused on the identification of altered cellular proteins in distal renal tubular cells affected by acute and chronic K^+ depletion and their reversibility after K^+ repletion. A gel-based, differential proteomics study of cellular proteins derived from distal renal tubular epithelial cells grown in normal-K^+ (NK), low-K^+ (LK) and K^+-depleted (KD) media for 24 h and 10 d, respectively, was performed. Another set of cells grown in LK and KD media were switched and maintained in NK medium to determine the reversibility of altered proteins to their basal levels after K^+ repletion for 24 h and 10 d, for acute and chronic K^+ insufficiency, respectively. A total of 130 protein spots had significantly altered levels during acute and chronic K^+ depletion. Only 8 protein spots were differentially expressed between the LK and NK group, 101 protein spots were differentially expressed between the KD and NK condition, and 21 protein spots were differentially expressed between these two groups. Interestingly, of these 130 spots, 25 of them could be completely recovered to baseline levels after K^+ repletion. These 130 protein spots representing 101 unique proteins were successfully identified by quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometry (MS) and/or tandem mass spectrometry (MS/MS) including metabolic enzymes, signaling proteins, stress-regulatory proteins, plasma proteins, transport proteins, cytoskeleton proteins, translation/transcription factors, Ca^{2+}-binding proteins and miscellaneous. These findings underscore the utility of proteomics for unraveling pathogenic mechanisms of diseases at the molecular level and may lead to a new roadmap for research on hypokalemic nephropathy.

KEY WORDS: DISTAL TUBULES/ HYPOKALEMIC NEPHROPATHY/
PROTEOME/PROTEOMICS/POTASSIUM DEPLETION/
HYPOKALEMIA

127 pp.