INTRACELLULAR TRAFFICKING OF NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS: ROLE OF THE TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN, ADENOMATOUS POLYPOSIS COLI

TULAYA POTAROS 4636670 PYBS/D

Ph.D. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORS: SRICHAN PHORNCHIRASILP, Ph.D.(PHARMACOLOGY), DENNIS B. MCKAY, Ph.D.(PHARMACOLOGY), SUVARA WATTANAPITAYAKUL, Ph.D.(PHARMACOLOGY)

ABSTRACT

Alterations of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) expression have been correlated to several pathological conditions. Although APC, adenomatous polyposis coli, has been demonstrated to participate in neuronal nAChRs expression, the involvement of α3β4 subtype is completely unknown. Hence, the study investigated the effect of APC protein on trafficking of α3β4* subtype in adrenal chromaffin cells (BAC) and in HEK293 cells expressing recombinant bovine α3β4* nAChRs (BMα3β4). First, the presence of APC mRNA and protein in BAC and BMα3β4 was found. Using RT-PCR, cDNA sequences with high homologies (>90%) to human or bovine APC sequence were detected in both cell types. Using Western Blot technique, the presence of 270 KD and 283 KD APC protein in BAC and BMα3β4, respectively, were confirmed. In order to knockdown APC gene, BMα3β4 were then transfected with APC-siRNA overnight and receptor binding assay coupled with receptor alkylation were conducted in these cells at 0, 24 and 48 hours after complete transfection. With 72% transfection efficiency, APC siRNA caused the reduction of APC protein to 52% and 62% of control at 24 and 48 hours, respectively. The total population of nAChRs (Rt) in control and siRNA treated cells remained constant over 48 hours. The intracellular receptors (Ri) in siRNA treated cells were significantly reduced to 72±3% and 68±4% of control at 24 and 48 hours, respectively. Contrarily, a significant increment of surface receptors (Rs) level to 357±21% and 299±34% of control at 24 and 48 hours was observed. The effect of protein synthesis on BMα3β4 trafficking was also studied by treating cells with 10 μg/well puromycin, a protein synthesis inhibitor, overnight. Puromycin treatment caused the dramatic reduction of APC protein, Rt, Ri and Rs to 83±3%, 23±3%, 16±2% and 40±13%, respectively. In conclusion, APC siRNA transfection caused a reduction of APC production within BMα3β4 which led to movement of Ri to cell surface for maintenance of normal Rs expression.

KEY WORDS: α3β4 nAChRs/ RECEPTOR TRAFFICKING/ APC/ siRNA/ PUROMYCIN

169 pp.

บทบาทของโปรตีน APC ต่อการสัญจรภายในเซลของ neuronal nicotinic acetylcholine receptors (INTRACELLULAR TRAFFICKING OF NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS: ROLE OF THE TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN, ADENOMATOUS POLYPOSIS COLI)

ตุลยา โพธารส 4636670 PYBS/D
ปร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์, Ph.D.(Pharmacology), Dennis B. McKay, Ph.D.(Pharmacology), สุวรา วัฒนพิทยกุล, Ph.D.(Pharmacology)

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวรับนิโคตินิกชนิดระบบประสาท (neuronal nAChRs) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดพยาธิสภาพหลายชนิด มีรายงานการศึกษาแสดงถึงความเกี่ยวข้องของโปรตีน APC ต่อการแสดงออกของ neuronal nAChRs แต่ยังไม่มีข้อมูลชัดเจนที่อธิบายความเกี่ยวข้องของโปรตีนนี้กับการสัญจรของ $\alpha 3\beta 4$ nAChRs การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโปรตีน APC ต่อการสัญจรของ $\alpha 3\beta 4$ nAChRs ใน bovine adrenal chromaffin cells (BAC) และเซลล์ BM$\alpha 3\beta 4$ จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า มีโปรตีน APC อยู่ในเซลล์ทั้งสองชนิด จากการศึกษาโดยอาศัยเทคนิค RT-PCR พบว่าในเซลล์ BAC และ BM$\alpha 3\beta 4$ มี cDNA ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงมากกับลำดับเบสของ APC ในวัวและคน (มากกว่าร้อยละ 90) แสดงว่ามี mRNA ของ APCในเซลล์ทั้งสองชนิด ส่วนผลการทดลองโดยใช้ Western Blot พบว่า ในเซลล์ BAC และ BM$\alpha 3\beta 4$ มีโปรตีน APC ขนาด 270 กิโลดาลตันและ 283 กิโลดาลตันตามลำดับ เมื่อ transfect APC-siRNA ในเซลล์ BM$\alpha 3\beta 4$ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อทำลาย APC gene แล้ววัดจำนวนตัวรับของเซลล์ด้วยวิธี receptor binding assay ร่วมกับ receptor alkylation ณ เวลาที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมงภายหลัง transfection อย่างสมบูรณ์ ผลการทดลองพบว่า APC-siRNA ที่มีประสิทธิภาพในการ transfection ร้อยละ 72 สามารถลดระดับของโปรตีน APC เหลือร้อยละ 52 และ 62 ของกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ และในเซลล์ดังกล่าวมีจำนวนตัวรับทั้งหมด (total receptors) ค่อนข้างคงที่ตลอดเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่มีจำนวนตัวรับภายในเซลล์ (intracellular receptors) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เหลือร้อยละ 72±3 และ 68±4 ของกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ แต่จะมีตัวรับที่ผิวเซลล์ (surface receptors) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นร้อยละ 357±21 และ 299±34 ของกลุ่มควบคุมที่เวลาดังกล่าว นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของกระบวนการสร้างโปรตีนต่อการสัญจรของตัวรับนิโคตินิกในเซลล์ BM$\alpha 3\beta 4$ โดยบ่มเซลล์ด้วยพูโรมัยซิน ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้างโปรตีน ผลการทดลองพบว่า พูโรมัยซินทำให้ปริมาณโปรตีน APC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนของตัวรับทั้งหมด, ตัวรับภายในเซลล์ และตัวรับที่ผิวเซลล์ ลดลงเหลือร้อยละ 23±3, 16±2 และ 40±13 ตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า APC-siRNA transfection ทำให้เกิดการลดลงของการสร้างโปรตีน APC ภายในเซลล์ BM$\alpha 3\beta 4$ ซึ่งนำไปสู่การเคลื่อนย้ายตัวรับภายในเซลล์ไปยังผิวเซลล์ เพื่อรักษาระดับปกติของตัวรับที่ผิวเซลล์

169 หน้า