Thesis Title Effect of Curcumin on Level and Distribution of TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol -13-acetate) Induced Protein Kinase C Isoenzyme-ε in Human Keratinocytes.

Author Miss Wanida Chearwae

M.S. Biochemistry

Examining committee

Associate Prof. Dr. Pom-ngarm	Limtrakul	Chairman
Associate Prof. Dr. Maitree	Suttajit	Member
Assistant Prof. Dr. Prachya	Kongtawelert	Member
Associate Prof. Dr. Amphawan	Apisariyakul	Member

Abstract

Protein Kinase C is a family of more than 12 isoenzymes of serine/threonine kinase that are central to many signal transduction pathways. Among the PKC isoenzyme only protein kinase -ε has been found to have unique properties in terms of its membrane association, oncogenic potential and substrate specificity. Furthermore, it was found that it exhibited a unique association with golgi function. Therefore, this study is focused on this isoenzyme of PKC. Human keratinocytes were chosen to be the model for this study. It has been revealed in previous studies that human keratinocytes expressed both mRNA and protein of PKC-α, -δ, -ε, -η and -ζ isoenzymes.

The first aim of this study was to determine the biochemical effect of TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) on level and distribution of PKC-α, -δ, and -ε isoenzymes in human keratinocytes by Western blot analysis.

It was found that upon stimulation with 160 nM TPA for 1 and 2 h PKC-α and -ε isoenzymes were translocated from the cytosol to the cell membrane (70 -85 %) by which 2 h were augmented than 1 h. Moreover it was indicated that TPA treatment for 18 h completed down regulation of the PKC-α and -ε. However, cells exposed to 160 nM TPA for 1, 2 and 18 h did not change the subcellular distribution of PKC -δ isoenzymes. Thus, this study is another experimental model that indicated the specificity of PKC isoenzymes in response to agonist and it suggests that in human keratinocyte, PKC-α, and -ε isoenzymes might play pivotal role in signal transduction upon TPA stimulation.

A large body of data has demonstrated that curcumin (diferuloyl methane); a major active component of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) inhibits a variety of biological activities of TPA. However, there was no any evidence reported the effect of curcumin on level and distribution of TPA-induced PKC-ε isoenzymes in human keratinocytes. Therefore the second aim of this study is to further investigate the inhibitory effects of curcumin on a variety of biological activities of TPA. The 80% confluent human keratinocytes ($3x10^6$ cells/ml) were pretreated 1 h with 20, 40 and 50 μM of curcumin followed by 1 h incubation with 160 nM TPA. It was found that 20, 40 and 50 μM curcumin inhibited TPA induced translocation of PKC-ε isoenzyme from the cytosol to the membrane in a dose dependent manner. However curcumin itself did not affect the translocation of PKC-ε isoenzyme. The next study the cells were incubated with 50 μM curcumin for 1 h prior to addition of TPA 2 h, at the same time as the addition of TPA, or 1 h after the addition of TPA 2 h, compared with the control. The result indicated that TPA response was inhibited only when cells were pretreated with curcumin. In the co-treatment or post-treatment of the cells with TPA, curcumin was not affective. Therefore this study is indicated that curcumin inhibits at a step in the signal transduction cascade of PKC- ε isoenzyme activation that occurs before TPA induction or down regulation.

Overall, it could be suggested that curcumin might be a potent candidate for modulation of PKC-ε isoenzyme in active cell proliferation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของเคอร์คิวมินต่อระดับและการกระจายตัวของโปรตีนไคเนสซี ชนิดไอโซเอนไซม์แอพซิลอนในเคอราติโนไซต์จากคน ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยทีพีเอ
ชื่อผู้เขียน	นางสาว วนิดา เจะอาแว
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี
คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. ไมตรี สุทธจิตต์ กรรมการ
	ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ กรรมการ
	รศ. ดร. อัมพวัน อภิสริยะกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

โปรตีนไคเนส ซี เป็นกลุ่ม เซรีนทรีโอนีน ไคเนส ที่มีมากกว่า 12 ไอโซเอนไซม์ และมีบทบาทสำคัญในขบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ในบรรดาไอโซเอนไซม์ทั้งหลายพบว่าโปรตีนไคเนสซีแอพซิลอนเป็นไอโซเอนไซม์ชนิดเดียวที่มีรายงานถึงคุณสมบัติในแง่ของ membrane association, oncogenic potential, และ substrate specificity นอกจากนี้ยังพบว่า มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำงานของ กอลไจ แอปปาราตัส อีกด้วย ดังนั้นผู้ทดลองจึงมีความสนใจศึกษาโปรตีนไคเนสซีไอโซเอนไซม์ชนิดนี้ โดยเลือกทำการศึกษาในเคอร์ราติโนไซต์จากคน ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ในเคอร์ราติโนไซต์จากคนมีการแสดงออก ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนของโปรตีนไคเนสซี α, δ, ε, η และ ζ ไอโซเอนไซม์

วัตถุประสงค์แรกของการศึกษานี้คือ ตรวจสอบผลทางชีวภาพของ TPA ต่อระดับและการกระจายตัวของโปรตีนไคเนส α, δ และ ε ไอโซเอนไซม์ ในเคอร์ราติโนไซต์จากคน ด้วยวิธีการ Western blot

จากการศึกษาพบว่า การกระตุ้นด้วย TPA 160 nM เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนย้ายของโปรตีนไคเนสซี α และ ε (~70-85 %) จากส่วนของไซโตพลาสซึม

ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยที่ 2 ชั่วโมงให้ผลที่ชัดเจนกว่า 1 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่า เกิดการควบคุมเชิงลบขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามไม่พบว่า การกระตุ้นด้วย TPA 160 nM เป็นเวลา 1, 2 และ 18 ชั่วโมง จะมีผลต่อการกระจายตัวระดับเซลล์ของโปรตีนไคเนสซี δ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงเป็นอีกการทดลองหนึ่งที่ชี้ให้เห็นถึง ความจำเพาะของโปรตีนไคเนส ซี ไอโซเอนไซม์ในการตอบสนองต่อตัวกระตุ้น และชี้ให้เห็นว่าในเคอร์ราติโนไซต์จากคน โปรตีนไคเนสซี α, และ ε อาจมีบทบาทสำคัญในการควบคุมขบวนการส่งสัญญาณที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลมากมายที่แสดงให้เห็นถึงผลในการยับยั้งฤทธิ์ทางชีวภาพอันเกิดจากการกระตุ้นของ TPA โดยเคอร์คิวมิน (diferuloyl methane) ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักและสำคัญของขมิ้นเหลือง (*Curcuma longa* Linn.) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานใดที่กล่าวถึงผลของเคอร์คิวมินต่อระดับและการกระจายตัวของโปรตีนไคเนสซีชนิด - ε ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย TPA ในเคอร์ราติโนไซต์จากคน ดังนั้นวัตถุประสงค์ข้อที่สองของการศึกษาครั้งนี้คือการมุ่งตรวจสอบผลดังกล่าว เคอร์ราติโนไซต์ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 80% ($3x10^6$ เซลล์/มล) ได้ถูกนำมาบ่มด้วยเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 50 μM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำเซลล์มาทดสอบด้วย TPA 160 nM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 50 μM สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายของโปรตีนไคเนสซีชนิด - ε จากไซโตพลาสึมไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยการยับยั้งเป็นไปในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น อย่างไรก็ตามเคอร์คิวมินเพียงอย่างเดียวไม่มีผลกระตุ้นหรือยับยั้งการเคลื่อนย้ายของโปรตีนไคเนสซีชนิด - ε แต่อย่างใด การทดลองต่อไปได้นำเซลล์มาบ่มด้วยเคอร์คิวมิน 50 μM ในระยะเวลาต่างๆกันคือ ก่อนกระตุ้น กระตุ้นพร้อมกัน และหลังกระตุ้นด้วย TPA จากการทดลองพบว่าการบ่มด้วยเคอร์คิวมินก่อนการกระตุ้นเท่านั้น ที่จะสามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายของโปรตีนไคเนสซีชนิด -ε จากไซโตพลาสึมไปยังเมมเบรนได้, การบ่มพร้อมกันหรือหลังไม่มีผลดังกล่าว ดังนั้นจากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่าเคอร์คิวมินส่งสัญญาณยับยั้งฤทธิ์ของ TPA ในขบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ในขั้นตอนก่อนที่ TPA จะส่งสัญญาณกระตุ้นหรือส่งสัญญาณให้เกิดการควบคุมเชิงลบกับโปรตีนไคเนสซีชนิด -ε

กล่าวโดยสรุปแล้ว การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า เคอร์คิวมินเป็นสารตัวหนึ่งที่อาจสามารถควบคุมสภาวการณ์ของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วอันเป็นผลจากการกระตุ้นโปรตีนไคเนสซีชนิด -ε ได้