MOLECULAR DEFECT OF ANION EXCHANGER 1 IN AUTOSOMAL RECESSIVE DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND INTERACTION BETWEEN HUMAN KANADAPTIN AND ANION EXCHANGER 1

SARANYA KITTANAKOM

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

ISBN 974-04-5834-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ความผิดปกติระดับอณูของโปรตีนแอนไอออนเอ็กซ์เช็งเจอร์-วัน ในโรคไตผิดปกติในการขับกรดชนิดที่มีการถ่ายทอดโรคแบบลักษณะด้อย และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนคานาแดปตินกับแอนไอออนเอ็กซ์เช็งเจอร์-วัน
(MOLECULAR DEFECT OF ANION EXCHANGER 1 IN AUTOSOMAL RECESSIVE DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND INTERACTION BETWEEN HUMAN KANADAPTIN AND ANION EXCHANGER 1)

ศรัณยา กิจธนาคม 4136537 SIIM/D

ปร.ด. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เพทาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D., วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D., เกรียงศักดิ์ วารีแสงทิพย์, M.D., Ph.D., สมเกียรติ วสุวัฏฏกุล, M.D, พัชรีย์ วิชยานุวัติ, M.D., Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคไตผิดปกติในการขับกรด (distal renal tubular acidosis) เกิดจากความผิดปกติในการขับกรดที่ท่อส่วนปลายของเนปฟรอน (nephron) ทำให้มีภาวะกรดคั่งในร่างกาย มักพบร่วมกับภาวะโปแตสเซียมในร่างกายต่ำ ความผิดปกติของกระดูก มีหินปูนและนิ่วในไต โรคนี้อาจจะเกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือพันธุกรรม โรคไตผิดปกติในการขับกรดที่เกิดจากพันธุกรรม มีการถ่ายทอดทั้งแบบลักษณะเด่นและลักษณะด้อย เป็นที่น่าสนใจว่ามิวเตชั่นของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนแอนไอออนเอ็กซ์เช็งเจอร์-วัน (anion exchanger 1 หรือ AE1) ในเม็ดเลือดแดง (eAE1) และในไต (kAE1) ทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายทอดทั้งแบบลักษณะเด่นและลักษณะด้อย แต่กลไกในระดับอณูของโรคนี้ยังไม่เป็นเข้าใจอย่างสมบูรณ์ ความผิดปกติของโปรตีนจากมิวเตชั่นที่ถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น (เช่น R589H) ยังคงมีการทำงานได้ปกติหรือลดลงเล็กน้อย แต่มีความผิดปกติในการขนส่งโปรตีนภายในเซลล์ การถ่ายทอดแบบลักษณะเด่นเกิดจากผลลบเด่น (dominant negative effect) เมื่อมีการรวมกับโปรตีนปกติทำให้โปรตีนปกติ เกิดความผิดปกติในการขนส่งด้วย แม้ว่าโปรตีนผิดปกติจากมิวเตชั่นที่ถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย (เช่น G701D) ก็ยังคงทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแอนไอออนได้ปกติและมีความผิดปกติในการขนส่งเช่นกัน กลไกระดับอณูที่ทำให้โรคถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยก็ยังไม่ใครทราบ ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้ คือ การสร้างความเข้าใจในกลไกระดับอณูของโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายแบบลักษณะด้อยอันเกิดจากมิวเตชั่นของยีนเออี-วัน (*AE1*) มิวเตชั่นใหม่ของยีนเออี-วันทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 773 จาก serine เป็น proline (S773P) ซึ่งรายงานในครอบครัวไทยที่ทำให้เกิดโรคที่มีการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ในภาวะที่มีมิวเตชั่นของยีนเดียวกันสองชนิด (compound heterozygous S773P/G701D) ได้นำมาทำการศึกษาในด้านการสังเคราะห์โปรตีน การจับกับโปรตีนอื่น การขนส่งภายในเซลล์ และตำแหน่งที่โปรตีนปรากฏ ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตมนุษย์ (HEK 293) ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนผิดปกติมีการแสดงออกน้อย และมีการทำลายอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนปกติ โปรตีนผิดปกติมีการม้วนพับ (folding) ที่ไม่ถูกต้องและถูกนำไปทำลายยังโปรตีเอโซม (proteasome) โปรตีนเคเออี-วัน (kAE1) ผิดปกติทั้งชนิด S773P และ G701D มีการขนส่งไปยังผิวเซลล์ที่ผิดปกติ ทั้งในเซลล์ชนิด HEK 293 และ LLC-PK1 อย่างไรก็ตาม โปรตีนผิดปกติชนิด S773P สามารถจับคู่กับโปรตีนอื่นได้ เช่นเดียวกับโปรตีนปกติ คู่ระหว่างโปรตีนปกติกับโปรตีนผิดปกติชนิด S773P หรือชนิด G701D นั้น ตรงกันข้ามกับโปรตีนผิดปกติชนิด R589H จากมิวเตชั่นที่มีการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น คือยังสามารถขนส่งไปที่ผิวของเซลล์ได้ ความแตกต่างนี้น่าจะเป็นคำอธิบายของกลไกระดับอณูของโรคไตผิดปกติในการขับกรดชนิดที่มีการถ่ายถอดแบบลักษณะด้อย ซึ่งค้นพบเป็นครั้งแรกในการศึกษานี้

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเคเออี-วันของมนุษย์กับคานาแดปติน (kanadaptin) ซึ่งเคยมีรายงานในหนูว่าสามารถจับกับส่วนปลายด้านอะมิโนของโปรตีนเคเออี-วัน ได้นำมาศึกษาในเซลล์ไตของมนุษย์ (HEK 293) เพื่อทดสอบว่าโปรตีนคานาแดปตินมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการขนส่งเคเออี-วันหรือไม่ ผลการศึกษาปรากฏว่าคานาแดปตินพบส่วนมากในนิวเคลียสของเซลล์ ในขณะที่เคเออี-วันพบภายในและที่ผิวเซลล์ อีกทั้งยังพบว่าคานาแดปตินของมนุษย์ไม่มีปฏิสัมพันธ์เคเออี-วันหรืออีเออี-วัน ดังนั้นความผิดปกติของคานาแดปตินและปฏิสัมพันธ์กับเคเออี-วัน ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคไตผิดปกติในการขับกรด

171 หน้า ISBN 974-04-5834-3

MOLECULAR DEFECT OF ANION EXCHANGER 1 IN AUTOSOMAL RECESSIVE DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND INTERACTION BETWEEN HUMAN KANADAPTIN AND ANION EXCHANGER 1

SARANYA KITTANAKOM 4136537 SIIM/D

Ph.D. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISOR: PA-THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., KRIENGSAK VAREESANGTHIP, M.D., Ph.D., SOMKIAT VASUVATTAKUL, M.D., PATCHAREE WICHYANUWAT, M.D., Ph.D.

ABSTRACT

Distal renal tubular acidosis (dRTA) is a kidney disease characterized by a defect in acid secretion of distal nephron resulting in metabolic acidosis, which is usually associated with hypokalemia, metabolic bone disease, nephrolithiasis or nephrocalcinosis. This disease can result from either acquired or genetic conditions. dRTA caused by genetic defect is inherited in either autosomal dominant (AD) or autosomal recessive (AR) fashion. Interestingly, mutations of anion exchanger 1 (*AE1*) gene, encoding erythroid (eAE1) and kidney (kAE1) anion exchanger 1 proteins, have been found to result in both AD and AR dRTA but their underlying molecular mechanisms are not completely understood. The mutant proteins of *AE1* dominant mutations (e.g. R589H) maintain normal or slightly decreased anion exchange function but exhibit intracellular trafficking defect. Their dominant characteristics are demonstrated by dominant negative effect when they heterodimerize and cause impaired trafficking of the kAE1 wild-type protein. Although some recessive kAE1 mutant protein (e.g. G701D) similarly retains normal anion exchange function and exhibits a protein trafficking defect, its molecular mechanism resulting in AR dRTA is still unknown. Thus, the purpose of this study was to characterize the molecular mechanism of AR dRTA caused by *AE1* mutations. A novel *AE1* (S773P) mutation reported in a Thai family with AR dRTA in a compound heterozygous (S773P/G701D) condition was studied by examination of its biosynthesis, protein binding, intracellular trafficking, and localization in transiently transfected human embryonic kidney (HEK) 293 cells. The results showed that kAE1 S773P-mutant protein exhibits lower expression and more rapid turnover compared to the kAE1 wild-type protein. kAE1 S773P is not properly folded and is processed for degradation by the proteasome. Both kAE1 S773P and G701D exhibited defective trafficking to the cell surface of both HEK 293 and non-polarized LLC-PK1 cells. However, kAE1 S773P could form dimers like the wild-type kAE1 and could heterodimerize with either kAE1 wild-type or kAE1 G701D. Heterodimers of wild-type kAE1 with recessive kAE1 S773P or G701D, in contrast to the dominant kAE1 R589H mutant, were delivered to the plasma membrane. This would be a molecular mechanism responsible for AR dRTA assocated with AE1 mutations which is firstly described in this study.

The interaction between human kAE1 and kanadaptin, a chaperone firstly reported in mice as interacting with the amino-terminus of kAE1, was also studied in transfected HEK 293 cells to investigate whether it is involved in the trafficking of kAE1. It was found that human kanadaptin was localized predominantly to the nucleus, whereas kAE1 was present intracellularly and at the plasma membrane. No interaction between human kanadaptin and kAE1 or eAE1 could be detected in co-transfected cells either by co-immunoprecipitation or by 6x histidine-tagged co-purification. Thus, defects in kanadaptin and its interaction with kAE1 are unlikely to be involved in the pathogenesis of dRTA.

KEY WORDS: BAND 3 PROTEIN/dRTA/MOLECULAR MECHANISM/PROTEIN TRAFFICKING/PROTEIN INTERACTION

171 pp. ISBN 974-04-5834-3