

**ANALYSIS OF GENES ENCODING SUBUNITS OF HYDROGEN-  
POTASSIUM ATPase (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) IN NORTHEASTERN THAI  
PATIENTS WITH DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND  
HYPOKALEMIA**

**ARAYA JINTAVIWAT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2006**

**ISBN 974-04-7935-9**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนส่วนประกอบของ Hydrogen-Potassium ATPase ( $H^+/K^+$ -ATPase) ในผู้ป่วยอีสานโรคไตผิดปกติในการขับกรดและมีระดับโปแตสเซียมในเลือดต่ำ  
[ANALYSIS OF GENES ENCODING SUBUNITS OF HYDROGEN-POTASSIUM ATPase ( $H^+/K^+$ -ATPase) IN NORTHEASTERN THAI PATIENTS WITH DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND HYPOKALEMIA]

อารยา จินตวิวัฒน์ 4636408 SIIM/M  
วท.ม. วิทยาคูมคุ้มกัน

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: แพทย์ เย็นจิต โสมนัส, Ph.D., วรณา ทองนพคุณ, Ph.D., นัญวรรณ รุ่งโรจน์, Ph.D, วิศิษฐ์ ทองบุญเกิด, MD.

### บทคัดย่อ

โรคไตและโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของไต ซึ่งทำให้เกิดภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ โดยเฉพาะโรคไตผิดปกติในการขับกรดของท่อไตส่วนปลายชนิดที่มีความรุนแรงมาก (distal renal tubular acidosis; dRTA) และชนิดที่มีความรุนแรงน้อย (acidification defect; AD) พบได้บ่อยในประชากรภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แม้ว่ามีความพยายามในการศึกษาความผิดปกติของตัวส่งผ่านอิออนรวมถึงโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของสมดุลกรด-เบสในร่างกายหลายชนิดก็ตาม พยาธิกำเนิดของโรคในประชากรภูมิภาคนี้ ก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด  $H^+/K^+$ -ATPase เป็นตัวส่งผ่านอิออนที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาภาวะสมดุลโปแตสเซียม รวมถึงภาวะที่ร่างกายมีการสังเคราะห์ของกรด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าความบกพร่องของ  $H^+/K^+$ -ATPase น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคไตผิดปกติในการขับกรดของท่อไตส่วนปลายชนิดที่มีความรุนแรงมาก และชนิดที่มีความรุนแรงน้อย ร่วมกับภาวะการมีระดับโปแตสเซียมในเลือดต่ำ ในประชากรภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ยีน *ATP4A*, *ATP12A*, และ *ATP4B* ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนองค์ประกอบชนิด  $\alpha$ -gastric,  $\alpha$ -nongastric และ  $\beta$ -subunit ของโปรตีน  $H^+/K^+$ -ATPase ตามลำดับ ได้ถูกนำมาศึกษาในประชากรภูมิภาคนี้ที่เป็นโรคทั้งสองชนิด ร่วมกับภาวะการมีระดับโปแตสเซียมในเลือดต่ำ โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และ denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) และการวิเคราะห์ลำดับของนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจร่องหาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 ยีนนี้ มิวเตชัน และ single nucleotide polymorphism (SNPs) ที่พบ จะถูกประเมินความสำคัญในการเป็นสาเหตุของโรคโดยการตรวจสอบชนิดและตำแหน่งของมิวเตชันและ SNPs ที่พบ พร้อมทั้งความสัมพันธ์ต่อการเกิดของโรคในกลุ่มผู้ป่วย และภายในครอบครัวของผู้ป่วย ผลการวิเคราะห์ในผู้ป่วย dRTA ร่วมกับภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ 10 ราย ผู้ป่วย AD 5 ราย และในกลุ่มคนปกติ 7 รายโดยวิธี PCR และ DHPLC พบว่ามีมิวเตชันเอเอ็นเอ 19 ใน 48 ซีน แสดงแบบแผนของ DHPLC elution profile มากกว่า 1 แบบ เมื่อนำมาศึกษาโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (SNPs) ที่เคยมีการรายงานมาก่อน 14 ชนิดและชนิดใหม่ 5 ชนิด โดย SNPs ที่พบ 4 ชนิด มีแบบแผนของ DHPLC elution profile ที่เหมือนกันเฉพาะในกลุ่มคนไข้ และไม่พบในกลุ่มคนปกติ เมื่อนำมาวิเคราะห์ในครอบครัวผู้ป่วย พบว่า SNPs ทั้ง 4 ชนิด ไม่มีการถ่ายทอดไปกับโรคในครอบครัวผู้ป่วย ซึ่งบ่งชี้ว่า SNPs ดังกล่าวไม่น่าจะเป็นสาเหตุในการเกิดโรค ผลการศึกษาจึงไม่พบมิวเตชันของทั้ง 3 ยีนนี้ที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคของในกลุ่มผู้ป่วยโรคที่ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการเป็นสาเหตุของโรค dRTA และ AD ในประชากรภาคอีสานของไทย ยังไม่สามารถตัดทิ้งได้อย่างสิ้นเชิง สิ่งที่ต้องดำเนินการต่อไปในอนาคต คือ การศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากและใช้วิธีการศึกษาแบบอื่น เช่น วิธี genome-wide association เพื่อพิสูจน์หน้าที่ของยีนเหล่านี้รวมทั้งยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่อไป

**ANALYSIS OF GENES ENCODING SUBUNITS OF HYDROGEN-POTASSIUM ATPase (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) IN NORTHEASTERN THAI PATIENTS WITH DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND HYPOKALEMIA**

ARAYA JINTAVIWAT 4636408 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS: PA-THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D.,  
WANNA THONGNOPPAKUN, Ph.D., NANYAWAN RUNGROJ, Ph.D.,  
VISITH THONGBOONKERD, M.D., F.R.C.P.T.**ABSTRACT**

Kidney and kidney related disorders in association with hypokalemia especially distal renal tubular acidosis (dRTA) and acidification defect (AD) are frequently observed in northeastern (NE) Thai population. Although attempts have been made to identify molecular defects of several transporters and proteins that may be involved in abnormal acid-base balance, the pathogenesis of these disorders in the NE Thai population have not been elucidated. H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a transporter that plays a critical role in maintenance of potassium homeostasis in association with acid-base balance. It is thus proposed that defect of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is involved in pathogenesis of dRTA and AD associated with hypokalemia in the NE Thai population. *ATP4A*, *ATP12A*, and *ATP4B* genes encoding gastric  $\alpha$ -, nongastric  $\alpha$ -, and  $\beta$ -subunits of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase were analyzed in the NE Thai patients with dRTA or AD with hypokalemia by polymerase chain reaction (PCR) and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) followed by DNA sequencing to screen nucleotide variations in these genes. The possible mutations and single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified were then evaluated for significance in causing the disease by examination of their alteration types and locations and their association with the disease in the patient group and within the families. In the analysis of 10 patients with dRTA and 5 patients with AD with hypokalemia, and 7 normal controls by PCR and DHPLC, 19 of 48 amplified fragments showed multiple elution DHPLC profiles, which were further analyzed by DNA sequencing. Fourteen known and five novel SNPs were identified. Four SNPs represented by four specific DHPLC profiles were observed only in the patient group but not in the control group. However, these four SNPs did not co-segregate with the disease when they were analyzed in the affected families, indicating that they were unlikely to be disease causing mutations. There was no disease causing mutation identified in *ATP4A*, *ATP12A*, and *ATP4B* encoding subunits of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the group of patients with dRTA or AD studied. However, the role of these genes in causing dRTA and AD in the NE Thai population could not absolutely be ruled out. Further study with a larger number of patients and controls, and with other approaches such as genome-wide association, are required to prove the role of these or other genes in pathogenesis of the disease.

**KEY WORDS : DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS (dRTA)/ HYDROGEN-POTASSIUM ATPase (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase)/ HYPOKALEMIA/ MUTATION**

125 P. ISBN 974-04-7935-9