

**INTERACTION, TRAFFICKING AND SUBCELLULAR  
LOCALIZATION OF MUTANT KIDNEY ANION EXCHANGER 1  
(kAE1) PROTEINS IN CULTURED HUMAN EMBRYONIC  
KIDNEY 293 (HEK 293) CELLS**

**NUNGHATHAI SAWASDEE**

**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 974-04-7328-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ปฏิสัมพันธ์การเคลื่อนย้ายและตำแหน่งในเซลล์ของ โปรตีนแอนไอออนเอ็กซ์เชঞ্জเจอร์-วันชนิดที่พบในไตที่ผิดปกติในเซลล์ไตเพาะเลี้ยงเอชไอเค 293 [INTERACTION, TRAFFICKING AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF MUTANT KIDNEY ANION EXCHANGER 1 (kAE1) PROTEINS IN CULTURED HUMAN EMBRYONIC KIDNEY 293 (HEK 293) CELLS]

หนึ่งหทัย สวัสดิ์ 4436225 SIIM/M  
วท.ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เพทวย เย็นจิต โสมนัส, Ph.D., ศันสนีย์ น้อยสคราญ, Ph.D.,  
วารกรณ์ อัครปฐมวงศ์, Ph.D.

### บทคัดย่อ

มิวเตชันของยีน *anion exchanger 1 (AE1)* สามารถทำให้เกิดความผิดปกติที่โปรตีน anion exchanger 1 ชนิดที่พบในไต (หรือ kAE1) และทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรด ที่มีการถ่ายทอดทั้งแบบลักษณะเด่นและแบบลักษณะด้อย โรคไตชนิดนี้เกิดจากความบกพร่องในการขับกรดของเซลล์ที่ส่วนปลายของท่อฝอยในไต มิวเตชันของยีน *AE1* ชนิด G701D มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบลักษณะด้อย พบได้บ่อยในคนไทยและประชากรในเอเชียอาคเนย์ ในภาวะโฮโมไซโกต (homozygote) และมิวเตชันนี้ยังพบเกิดร่วมกับมิวเตชันของยีน *AE1* ชนิด SAO ในภาวะคอมโปสิตเฮเทอโรไซโกต (compound heterozygous *AE1* SAO/G701D) ซึ่งพบครั้งแรกในประเทศไทย อีกด้วย ความผิดปกติของโปรตีน AE1 ที่เกิดจากมิวเตชันชนิด SAO และ G701D นั้นแตกต่างกัน โปรตีนผิดปกติชนิด SAO ไม่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ในเม็ดเลือดแดงและไขกระดูก แม้ว่าโปรตีนนี้จะสามารถเคลื่อนที่มาที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ก็ตาม ส่วนโปรตีนผิดปกติชนิด G701D สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ปกติในเม็ดเลือดแดง แต่ไม่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนและไม่สามารถเคลื่อนที่มาที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ในไขกระดูก อย่างไรก็ตาม ความผิดปกติในการแลกเปลี่ยนไอออนและการแสดงออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีนในไขกระดูก กลับเป็นปกติได้ เมื่อมีการแสดงออกร่วมกับ glycoporphin A (GPA) ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีนผิดปกติชนิด SAO และ G701D ที่มีการแสดงออกแบบเดี่ยว มีความผิดปกติเนื่องจากการค้างค้ำของโปรตีนภายในเซลล์ แสดงถึงความผิดปกติในการเคลื่อนย้ายของโปรตีน แม้ว่าการแสดงออกและการเคลื่อนที่ของโปรตีนผิดปกติชนิด SAO และ G701D จะมีการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ก็ยังไม่มีข้อมูลที่ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนผิดปกติชนิด SAO และ G701D ร่วมกัน เพื่อที่จะให้เข้าใจสถานภาพจำลองของภาวะมิวเตชันแบบคอมโปสิตเฮเทอโรไซโกตของ *AE1* SAO/G701D ที่ทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่ถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ตรวจหาการเคลื่อนย้ายและตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ที่มีการแสดงออกแบบเดี่ยวของโปรตีนผิดปกติชนิด SAO และ G701D และยังศึกษาปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนปกติกับโปรตีนผิดปกติชนิด SAO หรือ G701D โดยเฉพาะปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนผิดปกติชนิด SAO กับ G701D ในเซลล์ไตเพาะเลี้ยงชนิดเอชไอเค 293 อีกด้วย พลาสมิดที่มียีน *AE1* แบบปกติหรือแบบผิดปกติซึ่งติดอยู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ six-histidine (6xHis), hemagglutinin (HA) or Myc ถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการทดลอง โปรตีนชนิดปกติและผิดปกติที่ถูกทำให้มีการแสดงออกในเซลล์ไตเพาะเลี้ยงเอชไอเค 293 สามารถตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี Western blot ได้ เมื่อทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดแบบเดี่ยว พบว่า โปรตีนปกติอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนโปรตีนผิดปกติชนิด SAO และ G701D ค้างอยู่ภายในเซลล์ เมื่อทำให้มีการแสดงออกร่วมกันของโปรตีนปกติกับโปรตีนผิดปกติชนิด SAO หรือ G701D พบว่าโปรตีนเหล่านี้สามารถมีปฏิสัมพันธ์กันและสามารถปรากฏที่เยื่อหุ้มเซลล์ แสดงว่าโปรตีนปกติช่วยทำให้โปรตีนที่ผิดปกติทั้งสองชนิดเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนโปรตีนผิดปกติชนิด SAO และ G701D ที่ทำให้มีการแสดงออกพร้อมกันภายในเซลล์ยังคงมีปฏิสัมพันธ์กัน แต่ค้างอยู่ด้วยกันภายในเซลล์ ซึ่งน่าจะเป็นคำอธิบายถึงกลไกที่ทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย จากมิวเตชันแบบคอมโปสิตเฮเทอโรไซโกตของ *AE1* SAO/G701D ที่พบในประชากรแถบเอเชียอาคเนย์

INTERACTION, TRAFFICKING AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF  
MUTANT KIDNEY ANION EXCHANGER 1 (kAE1) PROTEINS IN CULTURED  
HUMAN EMBRYONIC KIDNEY 293 (HEK 293) CELLS

NUNGHATHAI SAWASDEE 4436225 SIIM/M  
M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS: PA-THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., SANSANEE  
NOISAKRAN, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D.

**ABSTRACT**

Mutations in *anion exchanger 1 (AE1)* gene may lead to defects in kAE1 protein that result in autosomal dominant (AD) and autosomal recessive (AR) distal renal tubular acidosis (dRTA), a kidney disease characterized by a defect in acid secretion of  $\alpha$ -intercalated cells located in the distal renal tubular region. The recessive *AE1* G701D mutation is frequently observed in Thai and Southeast Asian populations in homozygous condition (G701D/G701D), and also found in the form of compound heterozygote with Southeast Asian ovalocytosis (SAO) mutation (SAO/G701D), which was first identified in Thailand. The defects of kAE1 SAO and kAE1 G701D mutants have been shown to be different. The erythroid isoform of AE1 (eAE1) SAO shows an impaired anion transport activity in red cells and *Xenopus* oocytes, although it can be inserted into the plasma membrane. eAE1 G701D exhibits normal transport function in the red cells whereas eAE1 and kAE1 G701D lack transport activity and cell surface expression in oocytes, which can be corrected and rescued by co-expression with glycophorin A (GPA). In cultured mammalian cells, individually expressed kAE1 SAO and kAE1 G701D are retained intracellularly, showing trafficking defect. Although expression and trafficking of kAE1 SAO and G701D have been individually studied in cultured mammalian cells, no data exists on the study of co-expression between kAE1 SAO and G701D. To understand the situation that mimics compound heterozygous *AE1* SAO/G701D condition resulting in AR dRTA, this study examined the trafficking and subcellular localization of the expressed and co-expressed versions kAE1, of wild-type kAE1, kAE1 SAO and G701D, and also studied the interactions between wild-type kAE1 and kAE1 SAO, wild-type kAE1 and kAE1 G701D, and kAE1 SAO and kAE1 G701D in transiently transfected human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells. Plasmids containing either wild-type or mutant *kAE1* genes all fused with the sequence of either six-histidine (6xHis), hemagglutinin (HA) or Myc epitope tag were constructed to be used in experiments. The wild-type and mutant kAE1 proteins fused with the epitope tags were expressed in HEK 293 cells, as detected by Western-blot method. When they were individually expressed, the wild-type kAE1 was localized at the cell surface, while the mutant kAE1 SAO and kAE1 G701D were intracellularly retained. Co-expressions of wild-type kAE1 with either kAE1 SAO or G701D demonstrated that they could interact to form heterodimers, and that the wild-type kAE1 could rescue the two mutant kAE1 to be expressed on the cell surface. The co-expression of kAE1 SAO and G701D showed that they could also interact but were intracellularly retained. This would most likely be a molecular mechanism of AR dRTA, associated with compound heterozygous *AE1* SAO/G701D mutation in the patients, especially in the Southeast Asian populations.

KEY WORDS: ANION EXCHANGER 1 (AE1) / DISTAL RENAL TUBULAR  
ACIDOSIS (dRTA) / COMPOUND HETEROZYGOTE /  
SUBCELLULAR LOCALIZATION / PROTEIN TRAFFICKING

117 P. ISBN 974-04-7328-8