

**EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION
OF WILD-TYPE AND MUTANT KIDNEY ANION EXCHANGER 1
FUSED WITH FLUORESCENT PROTEIN AND EPITOPE TAG**

WANDEE UDOMCHAIPRASERTKUL

**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 974-04-6836-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การแสดงออกและตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ของโปรตีนแอนไอออนเอ็กซ์เชนเจอร์-วัน ชนิดที่พบในไต ที่ปกติและผิดปกติด้วยโปรตีนเรืองแสงและอีพิโทปแท็ก (EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF WILD-TYPE AND MUTANT KIDNEY ANION EXCHANGER 1 FUSED WITH FLUORESCENT PROTEIN AND EPITOPE TAG)
 วันดี อุคมชัยประเสริฐกุล 4536750 SIIM/M
 วท.ม. (วิทยานิพนธ์)
 คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เพทชาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D., สันสนีย์ น้อยสคราญ, Ph.D.,
 วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D. นัญวรณ รุ่งโรจน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

มิวเตชันของยีน *anion exchanger 1 (AE1)* ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีน anion exchanger 1 ในไต หรือ kAE1 ซึ่งทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนไอออน Cl^- กับ HCO_3^- ในเซลล์ขั้วกรดซึ่งบุท่อส่วนปลายของเนฟรอน (nephron) ในไต มีผลทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรด (distal renal tubular acidosis หรือ dRTA) เป็นเรื่องที่น่าสนใจว่ามิวเตชันของยีน *AE1* นั้นส่วนใหญ่ไม่ได้ทำให้เกิดความผิดปกติในการแลกเปลี่ยนไอออน แต่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ โดยปกติแล้ว มิวเตชันชนิด G701D ทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายทอกลักษณะแบบด้อย ในภาวะที่มีมิวเตชันชนิดนี้ชนิดเดียวแบบโฮโมซัยกอต (homozygous) และในภาวะที่มีมิวเตชันของยีนร่วมกับสองชนิดแบบคอมพาวด์เฮเทโรซัยกอต (compound heterozygous) ซึ่งทั้งสองแบบนี้พบได้บ่อยในคนไทยและในประเทศเพื่อนบ้านแถบใต้ โดยในภาวะที่มีมิวเตชันของยีนเดียวกันสองชนิดของ G701D กับ SAO (compound heterozygous G701D/SAO) พบได้บ่อยในผู้ป่วยไทยและแถบเอเชียอาคเนย์ ซึ่งทำให้เกิดโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายทอกลักษณะแบบด้อย ความผิดปกติของโปรตีน kAE1 ในไต ที่เกิดจากมิวเตชัน G701D และ SAO นั้นแตกต่างกัน โปรตีนผิดปกติชนิด G701D จะทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออนได้ปกติ เมื่อสามารถเคลื่อนที่มาที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งจะเกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดง แต่ในไข่กบ (*Xenopus oocytes*) นั้นจะต้องมีการแสดงออกร่วมของ glycophorin A (GPA) ด้วย แต่สำหรับโปรตีนผิดปกติชนิด SAO นั้นเมื่อศึกษาในเม็ดเลือดแดงและไข่กบ โปรตีนผิดปกติไม่สามารถทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน ถึงแม้ว่าจะสามารถเคลื่อนที่มาที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ก็ตาม ส่วนในเซลล์เพาะเลี้ยงจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีนผิดปกติชนิด G701D และ SAO มีความผิดปกติในการเคลื่อนที่ทำให้โปรตีนค้างอยู่ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม ขณะนี้ยังไม่ทราบว่าจะมีผลอย่างไร เมื่อมีการแสดงออกร่วมกันของโปรตีนผิดปกติชนิด G701D และ SAO ในเซลล์เพาะเลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นการจำลองภาวะที่มีมิวเตชันของยีนเดียวกันสองชนิดของ G701D กับ SAO ในเซลล์ไขของผู้ป่วย ดังนั้นเป้าหมายของงานนี้คือเพื่อศึกษาการแสดงออกและการแสดงออกร่วมกันของโปรตีนผิดปกติชนิด G701D และ SAO ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากไขของผู้ป่วย (HEK293 cells) โดยการติดด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) และ hemagglutinin A (HA) เพื่อติดตามการแสดงออกและที่อยู่ของโปรตีนโดยใช้กล้องคอนโฟลล โดยทำการศึกษาในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนแบบชั่วคราวและถาวร ผลการทดลองพบว่าโปรตีนปกติ โปรตีนผิดปกติชนิด G701D และ SAO ที่ติดด้วย GFP มีการแสดงออกใน HEK293 cells เมื่อศึกษาด้วยวิธี Western blot เมื่อมีการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดพบว่าในขณะที่โปรตีนปกติที่ติดด้วย GFP อยู่ที่เดียวกันกับโปรตีน CD147 ที่ผิวเซลล์นั้น โปรตีนผิดปกติชนิด G701D และ SAO ที่ติดด้วย GFP อยู่ภายในเซลล์ เมื่อมีการแสดงออกร่วมกันของโปรตีน kAE1 ปกติที่ติดด้วย HA กับโปรตีนผิดปกติชนิด G701D หรือ SAO ที่ติดด้วย GFP พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษาที่มีผู้รายงานก่อนหน้านี้ เมื่อมีการแสดงออกร่วมกันของโปรตีนผิดปกติชนิด G701D ที่ติดด้วย GFP และ SAO ที่ติดด้วย HA พบว่าโปรตีนอยู่ในเซลล์และดูเหมือนว่าไม่มีอยู่ที่ผิวเซลล์ ทั้งในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนแบบชั่วคราวและถาวร ซึ่งให้เห็นว่ามีความผิดปกติในการเคลื่อนที่อย่างรุนแรง ซึ่งน่าจะเป็นคำอธิบายสำหรับกลไกระดับอนุของโรคไตผิดปกติในการขับกรดที่มีการถ่ายทอกลักษณะด้อยอันเกิดจากมิวเตชัน G701D กับ SAO ของ *AE1* นั้นเกิดจากความผิดปกติในการเคลื่อนที่ไปผิวเซลล์และอยู่ในเซลล์ของโปรตีนผิดปกติทั้งสองทำให้ปราศจากโปรตีนที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออนที่เซลล์ขั้วกรดซึ่งบุท่อส่วนปลายของเนฟรอนของไต

EXPRESSION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF WILD-TYPE AND MUTANT KIDNEY ANION EXCHANGER 1 FUSED WITH FLUORESCENT PROTEIN AND EPI TOPE TAG

WANDEE UDOMCHAIPRASERTKUL 4536750 SIIM/M

M. Sc. (IMMUNOLOGY)

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

NOISAKRAN, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., NANYAWAN RUNGROJ, Ph.D.

ABSTRACT

Mutations of *anion exchanger 1 (AE1)* encoding kidney anion exchanger 1 (kAE1) that exchanges $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ at basolateral membrane of kidney α -intercalated cells can result in distal renal tubular acidosis (dRTA). Interestingly, almost all *AE1* mutations do not cause abnormal anion transport function but usually result in impaired kAE1 trafficking to the cell membrane. *AE1* G701D is a common missense mutation causing autosomal recessive (AR) dRTA in homozygous or compound heterozygous condition, frequently observed in Thai and Southeast Asian populations. A compound heterozygous *AE1* G701D/SAO mutation is often found in Thai and other Southeast Asian patients with AR dRTA and ovalocytosis. The defects of mutant kAE1 proteins encoded from *AE1* G701D and SAO mutations are distinct. kAE1 G701D is functional if it can traffic to the cell surface, which occurs in red cells but this will depend on the presence of glycophorin A (GPA) in *Xenopus* oocytes. kAE1 SAO is, however, functionally inactive although it can traffic normally to the surface of both red cells and oocytes. In cultured mammalian cells, the individually expressed kAE1 G701D and kAE1 SAO showed trafficking defect with predominantly intracellular retention. However, it is not known what would happen if kAE1 G701D and kAE1 SAO are co-expressed in cultured mammalian cells, which mimic the compound heterozygous *AE1* G701D/SAO condition in human kidney cells. This study thus aimed to investigate the expression and co-expression of kAE1 SAO and kAE1 G701D in HEK293 cells by using green fluorescent protein (GFP) fusion and hemagglutinin A (HA) tagging to follow their expression and localization by confocal microscopy in both transiently and stably expressing cells. GFP-kAE1, GFP-kAE1 G701D, and GFP-kAE1 SAO fusion proteins were found to be expressed in HEK293 cells when they were initially analyzed by Western blot method. While GFP-kAE1 was co-localized with a surface marker-CD147, GFP-kAE1 G701D and GFP-kAE1 SAO were intracellularly retained when they were individually expressed. Co-expression of kAE1-HA with either GFP-kAE1 G701D or GFP-kAE1 SAO could rescue cell surface expression of both mutant proteins, consistent with previous observations. In co-expression of GFP-kAE1 G701D with kAE1 SAO-HA, both mutant proteins were intracellularly retained and seemingly without cell surface expression in both transiently and stably expressing HEK293 cells, indicating their severely impaired trafficking. This is most likely the explanation for the molecular mechanism of AR dRTA associated with compound heterozygous *AE1* G701D/SAO condition in patients for whom the trafficking impairment and intracellular retention of these kAE1 mutant proteins lead to the absence of functional kAE1 at the basolateral membrane of kidney α -intercalated cells.

KEY WORDS : KIDNEY ANION EXCHANGER 1(KAE1)/
DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS (DRTA)/
GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)/
SOUTHEAST ASIAN OVALOCYTOSIS (SAO)/
COMPOUND HETEROZYGOUS *AE1* G701D/SAO CONDITION.

130 P. ISBN 974-04-6836-5