14 JUL 2000

ANALYSIS OF *ANION EXCHANGER 1 (AE1)* GENE IN THAI PATIENTS WITH ENDEMIC DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS (EdRTA)

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

THITIMA TUNGSIRIKUL

ดุษฎีนิพนธ์การ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2000

ISBN 974-663-782-7

COPY RIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
T448a
2000

44798 ค.2

Copyright by Mahidol University

3936703 SIMI/M : MICROBIOLOGY; M.Sc.(MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : ENDEMIC DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS (EdRTA)/ *ANION EXCHANGER 1(AE1)* GENE/ *BAND 3* GENE/ SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP)

THITIMA TUNGSIRIKUL: ANALYSIS OF *ANION EXCHANGER 1* GENE IN THAI PATIENTS WITH ENDEMIC DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS. THESIS ADVISORS: PA-THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., PRIDA MALASIT, M.D., F.R.C.P. (UK) 179 p. ISBN

Endemic distal renal tubular acidosis (EdRTA) is a unique form of distal renal tubular acidosis (dRTA), which is a common health problem in the northeastern region of Thailand. It is characterized by hyperchloremic metabolic acidosis due to the inability of the kidneys to excrete acid to urine, frequently accompanied by generalized muscle weakness, hypokalemia, nephrocalcinosis, and metabolic bone disease. The etiology of EdRTA could be related to either environmental or genetic factors or both. Evidence from past observations shows that many affected individuals were members of the same kindreds, suggesting that the genetic factor alone or in combination with the environmental factor(s) may involve in the pathogenesis of this disease. Although the acid excretion is controlled by several transporter proteins in the type A (acid-secreting) intercalated cells (IC) in the distal and collecting ducts of the kidneys, the defects of Cl^-/HCO_3^- exchanger (kAE1 or band 3), regulating Cl^-/HCO_3^- exchange across the basolateral membrane of type A IC, have recently been found to be associated with both autosomal dominant and autosomal recessive forms of dRTA. *AE1* mutation was therefore hypothesized to be the cause of EdRTA in the northeastern population of Thailand and the study in this thesis was carried out to prove this hypothesis.

Mutations of the *AE1* gene were screened in DNA samples from 10 EdRTA patients from 4 families by radioisotopic polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism (RI PCR-SSCP) technique, and from 7 affected and one unaffected members from a selected EdRTA family by non-RI PCR-SSCP. The analyses were also performed in 11 normal control DNA samples for comparison. From the results of screening of mutations in 18 regions of the *AE1* gene by both RI PCR-SSCP and non-RI PCR-SSCP analyses, mobility shifts were observed in 8 normal control subjects and 14 EdRTA patients in 5 regions including exons 4, 5, 9, 12, and 17. Sequencing analyses were performed in all 5 exons with the mobility shifts in 8 individuals who were selected as representatives of each group.

The results of sequencing analysis showed two nucleotide changes in the non-coding regions (IVS5+27C>T and IVS17+19G>A), two silent mutations (F266F and S438S), and four missense mutations (K56E, D38A, E72D, and G701D). The K56E (band 3 Memphis I) and D38A (band 3 Darmstadt) missense mutations, which were found in normal control subjects and patients, had previously been reported to be *AE1* polymorphisms. E72D is a new *AE1* missense mutation and proposed to be called 'band 3 Siriraj I'. This new mutation is most likely to be a non-disease mutation for the reason that it was present in normal control subjects as well as in only one of the patients resulting in a conservative amino-acid substitution. The G701D (band 3 Bangkok I) missense mutation was found in five patients but not in the normal control subjects. It is a reported disease mutation, which causes autosomal recessive dRTA in children, but its heterozygosity does not result in dRTA. DNA linkage analysis using microsatellite (D17S787) marker mapped close to the *AE1* gene was also carried out in a selected family with several members who were affected by EdRTA. The results of mutation analysis and DNA linkage study did not support the hypothesis that mutation of the *AE1* gene is involved the pathogenesis of EdRTA in the group of the northeastern Thai patients studied.

Copyright by Mahidol University

3936703 SIMI/M : สาขาวิชา: จุลชีววิทยา: วท.ม. (จุลชีววิทยา)

ฐิติมา ตั้งศิริกุล : การวิเคราะห์ยีนเออี-วัน ในผู้ป่วยไทยโรคไตผิดปกติในการขับกรดชนิดที่แพร่หลายในคนอีสาน (ANALYSIS OF *ANION EXCHANGER 1* GENE IN THAI PATIENTS WITH ENDEMIC DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เพทาย เย็นจิตโสมนัส Ph.D., ปรีดา มาลาสิทธิ์ พ.บ., F.R.C.P.(UK). 179 หน้า

Endemic distal renal tubular acidosis (EdRTA) เป็นความผิดปกติในการขับกรดของท่อส่วนปลายของ nephron ซึ่งมีลักษณะจำเพาะ พบได้บ่อยและเป็นปัญหาสาธารณสุขของประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โรคนี้มีภาวะที่ร่างกายมีการคั่งของกรดเนื่องจากไตไม่สามารถขับกรดออกทางปัสสาวะได้ และมักพบอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง โปแตสเซียมในเลือดต่ำ มีหินปูนหรือนิ่วในไต และความผิดปกติของกระดูก โรคนี้อาจมีสาเหตุจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและ/หรือปัจจัยทางพันธุกรรม จากหลักฐานของผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยหลายคนมาจากครอบครัวเดียวกัน แสดงว่าพันธุกรรมหรือพันธุกรรมร่วมกับสิ่งแวดล้อมอาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องในเชิงเป็นสาเหตุของโรคนี้ แม้ว่าการขับกรดจะถูกควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดในเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ขับกรดในท่อส่วนปลายของ nephron ความผิดปกติของโปรตีน AE1 หรือ band 3 ซึ่งทำหน้าที่แลกเปลี่ยน Cl^- และ HCO_3^- ผ่าน basolateral membrane ของเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ขับกรดได้มีการค้นพบเมื่อเร็วๆ นี้ว่า มีความสัมพันธ์กับโรค dRTA ทั้งชนิดที่ถ่ายทอดแบบ autosomal dominant และ autosomal recessive ดังนั้นจึงได้มีการตั้งสมมติฐานว่ามิวเตชั่นของยีน *AE1* น่าจะเป็นสาเหตุของโรค EdRTA ในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และงานวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้จึงทำการศึกษาเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว

การตรวจกรองมิวเตชั่นของยีน *AE1* ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วย 10 รายจาก 4 ครอบครัว กระทำโดยวิธี radioisotopic polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism (RI PCR-SSCP) และในผู้ป่วย 7 รายและญาติที่ไม่เป็นโรค 1 รายจากครอบครัว EdRTA โดยวิธี non-RI PCR-SSCP พร้อมทั้งทำการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอจากกลุ่มคนปกติจำนวน 11 รายเพื่อเปรียบเทียบ จากผลการตรวจกรองมิวเตชั่นทั้งโดยวิธี RI PCR-SSCPและ non-RI PCR-SSCP ในยีน *AE1* ทั้ง 18 บริเวณ (regions) พบว่ามี mobility shift ในคนปกติ 8 รายและผู้ป่วย 14 ราย ใน 5 บริเวณได้แก่ exon 4, 5, 9, 12 และ 17 ดีเอ็นเอที่พบว่ามี mobility shift ทั้ง 5 บริเวณซึ่งเลือกมาเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพียง 8 รายได้นำมาทำการศึกษาโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในหลายตำแหน่งได้แก่ การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ non-coding 2 แห่ง (IVS5+27C>T และ IVS17+19G>A) มิวเตชั่นชนิดที่ไม่เปลี่ยนกรดอะมิโน 2 ชนิด (F266F และ S438S) และมิวเตชั่นชนิดที่เปลี่ยนกรดอะมิโน 4 ชนิด (K56E, D38A, E72D และ G701D) K56E และ D38A เป็น *AE1* polymorphism ที่เคยมีรายงานมาก่อนมีชื่อเรียกว่า band 3 Memphis I และ Darmstadt ตามลำดับ ส่วน E72D เป็นมิวเตชั่นใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนจึงเสนอให้เรียกว่า "band 3 Siriraj I" มิวเตชั่นชนิดนี้ไม่น่าจะเป็นสาเหตุของโรค ด้วยเหตุผลที่พบมิวเตชั่นชนิดนี้ทั้งในคนปกติและผู้ป่วย และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จึงไม่น่าจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีน มิวเตชั่นชนิด G701D หรือ band 3 Bangkok I พบในผู้ป่วย 5 รายโดยไม่พบในคนปกติ มิวเตชั่นนี้เคยรายงานว่าเป็นสาเหตุของ autosomal recessive dRTA ในเด็ก แต่ในภาวะ heterozygote มิวเตชั่นชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดโรค dRTA นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษา DNA linkage โดยใช้ microsatellite marker ชนิด D17S787 ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *AE1* ในครอบครัวของผู้ป่วย 1 ครอบครัวซึ่งมีสมาชิกหลายคนเป็น EdRTA ผลการวิเคราะห์มิวเตชั่นและการศึกษา DNA linkage ไม่สนับสนุนทฤษฎีที่ว่ามิวเตชั่นของยีน *AE1* เกี่ยวข้องในเชิงเป็นสาเหตุของโรค EdRTA ในกลุ่มผู้ป่วยจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งได้นำมาทำการศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้

Copyright by Mahidol University