บทคัดย่อ

ภาวะไตขับกรดไม่ได้ (classical distal renal tubular acidosis) เป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งในประเทศ ปัจจุบันทราบว่าภาวะไตขับกรดไม่ได้ที่เป็นแต่กำเนิดและมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมนั้น มีสาเหตุจากยีนที่ผิดปรกติอย่างน้อย 4 ชนิด แต่ที่พบบ่อยและมีรายงานในประเทศเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน Anion Exchanger 1 (AE1 หรือ Band 3) ซึ่งกำหนดโครงสร้างของโปรตีนที่ทำการแลกเปลี่ยน HCO_3^- ภายในเซลล์กับ Cl^- ภายนอกทั้งในเซลล์ขับกรดในไตและในเม็ดเลือดแดง นอกจากนั้น AE1 ยังทำหน้าที่ร่วมกับโปรตีนอื่นในการกำหนดรูปทรงของเม็ดเลือดแดงด้วย ดังนั้น การศึกษาหน้าที่ของ AE1 จึงมีความสำคัญเพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์นั้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรคจริง

ในโครงการนี้ คณะผู้ศึกษาได้พัฒนาวิธีศึกษาหน้าที่ และโครงสร้างของโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์ (membrane protein) ขึ้น โดยใช้ระบบการแสดงออกของโปรตีนในไข่กบ (*Xenopus laevis* oocyte expression system) ทำให้สามารถทดสอบหน้าที่และโครงสร้างของโปรตีน AE1 ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ นอกจากนั้น ยังสามารถทดสอบโปรตีนอื่นที่เคยรายงานว่ามีปฏิสัมพันธ์กับ AE1 เช่น glycophorin A (GpA) และ protein 4.2 ผลการศึกษาที่สำคัญที่ได้ในส่วนนี้ คือ 1) ทดสอบยืนยันว่า GpA มีความสำคัญอย่างยิ่งในการทำหน้าที่ของ AE1 G701D ที่พบในผู้ป่วยไตขับกรดไม่ได้ที่มีการถ่ายทอดแบบ recessive, 2) พิสูจน์ว่า protein 4.2 ไม่มีผลสำคัญต่อการทำหน้าที่แลกเปลี่ยนสารของ AE1 ในระบบที่ทำการศึกษา, และ 3) พบว่า AE1 Δ400-408 ยับยั้งการฟื้นหน้าที่ของ AE1 G701D โดย GpA ในลักษณะ dominant negative effect ซึ่งสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงที่ไตและเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยไตขับกรดไม่ได้ร่วมกับ ovalocytosis ที่มีการกลายพันธุ์แบบ compound heterozygosity ของ AE1 Δ400-408 / G701D

การศึกษาอีกส่วนหนึ่ง คือการ clone หา human kanadaptin จากไต ซึ่งสามารถทำได้สำเร็จด้วยวิธี reverse transcription / polymerase chain reaction โดยโปรตีนดังกล่าวถูกรายงานใน mouse ว่ามีปฏิสัมพันธ์กับ AE1ในไต และอาจมีความสำคัญต่อกระบวนการขับกรดในเซลล์ที่ท่อไตส่วนปลาย ผลการวิเคราะห์ลักษณะการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ human kanadaptin พบมีลักษณะพิเศษหลายอย่างที่น่าจะเกี่ยวข้องกับ sorting ของโปรตีนที่ทำปฏิสัมพันธ์ด้วย ซึ่งเมื่อทำการศึกษาในไข่กบ พบว่า kanadaptin ในขนาดสูงสามารถยับยั้งการทำหน้าที่ของโปรตีน AE1 ปรกติ และ AE1-R589H ที่สัมพันธ์กับภาวะไตขับกรดไม่ได้ชนิด autosomal dominant ได้บางส่วน

ABSTRACT

Classical distal renal tubular acidosis (dRTA), one of the major health problems in Thailand, results from urinary acid excretion defects, causing metabolic acidosis, hypokalemic paralysis, metabolic bone disease and nephrocalcinosis / nephrolithiasis. It is currently known that dRTA may be inherited in either autosomal dominant or recessive form, and mutations in at least 4 genes have been identified. Thai patients have recently been shown to have mutations in the anion exchanger 1 (AE1, band 3) gene that seem to be unique. This gene encodes for the Cl^- / HCO_3^- exchanger located at the basolateral membrane of the kidney acid secreting eells and red blood cells. AE1 mutations have also been found in association with many red cell defects including ovalocytosis and spherocytosis but these patients do have normal urinary acidification function. Thus, it is important to know the transport function of mutant AE1 proteins in order to prove their significance as the cause of dRTA.

In this study, we developed the heterologous expression system of *Xenopus laevis* oocyte to study function and structure of AE1 mutant variants associated with dRTA and potential interaction with AE1 associated proteins. The important results include 1) confirmation that glycophorin A (GpA) is crucial for the function of AE1 G701D, mutant found in association with recessive dRTA, 2) co-expression of protein 4.2 does not result in significant change of AE1-mediated anion transport in this system, and 3) AE1 Δ400-408 attenuates the rescued effect of AE1 G701D by GpA in a dominant negative fashion. The latter finding explains the distinct red blood cell and kidney phenotypes in patients with ovalocytosis and recessive dRTA.

Another part of this study is to isolate human kanadaptin, a protein known to interact with kAE1 in mouse, from kidney tissue. By reverse transcription and polymerase chain reaction human kanadaptin cDNA was cloned. The coding sequence predicts a 796 amino acid residue protein with multi-domain structure that shares 80% identity to mouse kanadaptin. Co-expression of high dose kanadaptin results in partial inhibition of anion transport function mediated by both wild-type kidney AE1 and AE1-R589H, a mutant found in association with autosomal dominant dRTA.