

MUTATION IN BRIEF

A Novel Splice-Acceptor Site Mutation (IVS13-2A>T) of Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene Resulting in an RNA Processing Defect with a 74-Nucleotide Deletion in Exon 14 of the mRNA Transcript

Wanna Thongnoppakhun,^{1,2} Nanyawan Rungroj,¹ Prapon Wilairat,² Kriengsak Vareesangthip,³ Chintana Sirinavin,^{1,4} and Pa-thai Yenchitsomanus^{1,5,*}

¹Molecular Genetics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital; ²Department of Biochemistry, Faculty of Science; ³Renal Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital; ⁴Division of Medical Genetics, Department of Medicine, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital; ⁵Medical Molecular Biology Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

*Correspondence to: Pa-thai Yenchitsomanus, Molecular Genetics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital, Mahidol University, 2 Prannok Road, Bangkok 10700, Thailand. Tel and Fax: +1 662 4184793; E-mail: grpye@mahidol.ac.th

Communicated by Mark H. Paulman

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) occurs mainly from mutations of polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene. A novel mutation of the PKD1 gene due to a nucleotide substitution in splice-acceptor site of IVS13 (AG->TG) was identified by analyses of PKD1-cDNA and genomic DNA. The IVS13-2A>T substitution resulted in an inactivation of this splice site and utilization of cryptic splice acceptor site in exon 14, causing a 74-nucleotide deletion of this exon in the PKD1-mRNA transcript. The abnormal transcript was present ectopically in the patients' lymphocytes. The partial deletion of PKD1-mRNA leads to frameshift translation and introduces a termination signal at codon 1075. The truncated protein with about one quarter of the full-length polycystin-1 is most likely inactive. Thus, the effect of this mutation would be 'loss-of-function' type. Allele specific amplification (ASA) was developed to detect the mutation in DNA samples of other family members. The mutation was present in 11 affected but absent in 13 unaffected family members, corresponding to the results of linkage analysis. In addition, it was not observed in DNA samples of 57 unrelated healthy individuals. © 1999 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Polycystic kidney disease 1; PKD1; long RT-PCR; cryptic splice-site; splicing defect; allele specific amplification; ASA; Thailand

Received 29 July 1999; Revised manuscript accepted 19 October 1999.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD; MIM# 173900) is one of the most common human inherited disorders worldwide, characterized by the development of multiple abnormal fluid-filled cysts in the kidneys, leading to end stage renal failure (Daugaard, 1957). At least three genes are responsible for this disease: *PKD1* (MIM# 601313; approved symbol, PKD1) at 16p13.3 (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; Hughes et al., 1995; The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995), *PKD2* at 4q21-23 (Mochizuki et al., 1996), and the still unmapped, *PKD3* (Daoust et al., 1995). Abnormality of *PKD1* is responsible for about 85% of ADPKD (Peters and Sandkuijl, 1992). *PKD1* has the size of about 54 kb consisting of 46 exons and transcribing 14,148-nt mRNA (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; Burn et al., 1995; Hughes et al., 1995; The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995).

The existence of at least three *PKD1* homologs which share over 95% identity with *PKD1* on the same chromosome, has made it difficult to characterize *PKD1* mutations (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). This has also resulted in bias of mutation analysis of *PKD1* in which the majority of mutations identified to date fall within its 3' unique region (HGMD; Human Gene Mutation Database: <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120293.html>). However, the mutations found in this region contribute to only 10-15% of all known cases of PKD1 disease, indicating that most mutations are located in the reiterated region of *PKD1* (Peral et al., 1996). Recently, at least two groups have attempted to identify mutations in the reiterated part of *PKD1* by long-range PCR (LR-PCR) (Watnick et al., 1997; Peral et al., 1997). However, the methods that have been developed could isolate parts of the reiterated sequence of *PKD1*, unable to isolate the sequence beyond exon 15 to the 5' end of the gene. We have recently developed a long RT-PCR method for isolation of the entire coding sequence of *PKD1* from its mRNA transcript (Thongnoppakhun et al., 1999), eliminating the interference from the homologous sequences. In this report, we demonstrate the application of long RT-PCR and LR-PCR methods in identification of *PKD1* mutation in PKD1 patients and report a novel mutation which results in RNA processing defect leading to partial deletion of exon 14 sequence in the *PKD1*-mRNA transcript.

MATERIALS AND METHODS

The PK015 family and linkage study

The proband (IV-6) of the Thai family PK015 (Fig. 2) was firstly referred to see nephrologist with the problems of a mild degree of chronic renal failure (serum creatinine of 4.2 mg/dl), hypertension and gross hematuria. An abdominal ultrasound demonstrated polycystic kidneys and liver. The diagnosis of ADPKD in the patient and other family members was made, based on the demonstration of renal cysts by an abdominal ultrasound (Ravine et al., 1994). Blood samples from the patients and relatives were collected with informed consent. Linkage analysis was performed by detecting 5 polymorphic DNA markers on chromosome 16p including D16S85 (3' HVR) (Reeders et al., 1985), SM7 (Harris et al., 1991), 16AC2.5 (Thompson et al., 1992), SM6 (Peral et al., 1994), and KG8 (Germino et al., 1993).

RNA preparation, long RT-PCR, and nested PCR

The full-length *PKD1*-cDNA was synthesized from RNAs prepared from lymphocytes and then amplified by long PCR, following the protocols as previously described (Thongnoppakhun et al., 1999). The length of PCR product obtained was 13,634 bp. Nested PCRs were carried out by using nested primers (sequences available on request) to generate 9 overlapping fragments of 1,352-1,678 bp by the method as previously described (Thongnoppakhun et al., 1999). A fragment of amplified cDNA (nt 3115-4689) in the region of exons 12-15 (GenBank Accession No. L33243) was digested with either *Bsp*1286 I, *Hinf* I, *Pst* I, or *Taq* I (New England Biolabs and Promega) for detailed analysis of deletion observed. Amplification with additional pair of primers covering nt 3254-3538 in exons 13-15 was also performed.

Direct DNA sequencing

PCR products were purified from agarose gel after electrophoresis by QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) as instructed by the manufacturer. The purified DNAs were sequenced manually by using fmol® DNA Sequencing System (Promega).

Amplification of genomic DNA

To isolate *PKD1*-specific DNA fragment out of the homologous sequences, a LR-PCR for amplification of genomic DNA (18,099 bp) was carried out by using a primer specific to the unique sequence (Ex34B at nt 44438-44409 in exon 34) coupled with a primer annealing to a region in the reiterated sequence (SI3.1F at nt 26340-26369 in exon 13), and then nested PCRs were performed by using internal pairs of primers. The primers were designed from sequence of *PKD1* gene (GenBank Accession No. L39891). The PCR reaction for a long-range amplification in a total volume of 50 µl contained 200 ng genomic DNA, 200 nM of each primer, 200 µM dNTP mixture, 1 unit ELONGASE Enzyme mix, 10% DMSO, and 1.0 mM MgSO₄. The PCR conditions consisted of an initial incubation (hot start) at 95°C for 1 min 30 s, then amplification for 40 cycles at 94°C for 30 s, 61°C for 30 s, 68°C for 20 min, and a final incubation at 70°C for 10 min. The LR-PCR product was diluted up to 1,000 folds depending on its amounts to reduce contamination from genomic DNA and used as template for nested PCRs of the 1,064- and 320-bp products with the primers WT2F/SI3.1B and SI3.2I/SI3.2B, covering the regions of nt 26375-27438 (exon 13-15) and 26717-27036 (IVS 13-14), respectively. Sequences of the nested PCR primers are available on requested. Contamination of homologous sequences has been proven negligible in another similar experiment by the failure to amplify DNA regions outside a LR-PCR product of 12.9 kb, when this product was diluted 1,000 folds and used as template for nested PCRs (data not shown).

Mutation analysis by allele specific amplification (ASA)

Allele specific amplification (ASA), PCR for amplifications of wild-type and mutant alleles with allele-specific primers coupled with a shared primer (Newson et al., 1989), was invented for analysis of the *PKD1* mutation discovered. The wild-type and mutant primers had one different base at their 3' ends, each of which matched to the complementary base at the mutation site in the corresponding allele. Two additional mismatches were also introduced at the third and the ninth nucleotides from the 3'-end of primers to increase discriminating power when they bound across the alleles (Kwok et al., 1990). The sequences of wild-type (13WT) and mutant primers (13MU) are: TTCACTCACTGCGTCCCACCACCCCGCA and TTCACTCACTGCGTCCCACCACCCCGCT (underlined are nucleotides altered to introduce mismatches), respectively. The sequence of shared primer (SI3.2B) is: GTTGGGGAGGAAGGGGGGCACTTGAC.

Each DNA sample was amplified in two separate reactions with a pair of primers for wild-type or mutant allele. A pair of primers (SI7.2F/SI7.2B) amplifying a region of 698-bp in exon 25/intron 26 (nt 38978-39675) of the *PKD1* gene were also added for internal control amplification in both reactions.

RESULTS

Long RT-PCR and nested PCRs of samples from *PKD1* patients

A long RT-PCR method (Thongnoppakhun et al., 1999) was performed to study RNA samples prepared from two patients (IV-3 and IV-4) of PK015 family. The full-length *PKD1* cDNA was fractionated into 9 overlapping fragments by nested PCRs. The presence of products with two different sizes (normal 1,575 bp and a shorter fragment of about 1,500 bp) were observed in both patients' samples, using a primer pair amplifying the region between nt 3115 and 4689 (Fig. 1A and 1B). The shorter fragment might have resulted from a partial deletion in the mRNA transcript from the affected allele of *PKD1* in these patients. Restriction endonuclease mapping analyses of the nested PCR product from one patient (IV-3) in comparison with that of a normal individual, by using *Bsp*1286 I, *Hinf* I, *Pst* I and *Taq* I, were carried out to localize the area of deletion, which was found to locate between the first sites of *Hinf* I and *Bsp*1286 I (nt 3347-3477). A new set of primer pair covering the region of nt 3254-3538 were designed to amplify this region by nested PCR, generating an amplified product of 285 bp in normal samples (Fig. 1A). The samples from the two patients produced both the normal (285 bp) and a shorter (~210 bp) PCR products, as well as a slower migrating band of heteroduplex DNA (Fig. 1C). This data confirmed that there was indeed a deletion in this region of *PKD1* cDNA of both patients. Direct DNA sequencing of the smaller PCR product (~210

bp) from a patient revealed the 74-bp deletion corresponding to nt 3373-3446 in *PKD1* mRNA, the nucleotide positions 1-74 of exon 14 of *PKD1*.

Analysis of genomic DNA

The deletion of 74 nucleotides of exon 14 of the patients *PKD1* mRNA might result from deletion in this region of the gene or from point mutation located near the exon-intron junction producing an abnormally spliced RNA product. A LR-PCR for amplification of *PKD1*-specific sequence, about 18 kb, from genomic DNA was developed to eliminate contamination from sequences of the homologous genes. A pair of nested PCR primers (WT2F and SI3.1B positioned in exons 13 and 15, respectively) amplifying a region covering exon 14 and both flanking introns (1,064 bp) were also used for DNA deletion study in exon 14. The results of DNA analysis in four patients of PK015 family (IV-3, IV-4, IV-11, and V-9) indicated that there was no observable DNA deletion, particularly in the region of exon 14 of *PKD1*.

To identify mutation in exon 14 of *PKD1* precisely, a DNA segment of 320 bp was amplified by using nested PCR primer pair (SI3.2F/SI3.2B) and analysed by DNA sequencing. The result demonstrated a heterozygous A->T substitution at the position 26806 (with respect to the sequence of GenBank Accession No. L39891), which is the first position of the invariable dinucleotides (AG) of the splice acceptor site of intron 13, in *PKD1* of a patient studied. The substitution was confirmed by sequencing of the opposite strand, and it was present in altogether 6 patients examined, most likely to be the *PKD1* causative mutation in this family.

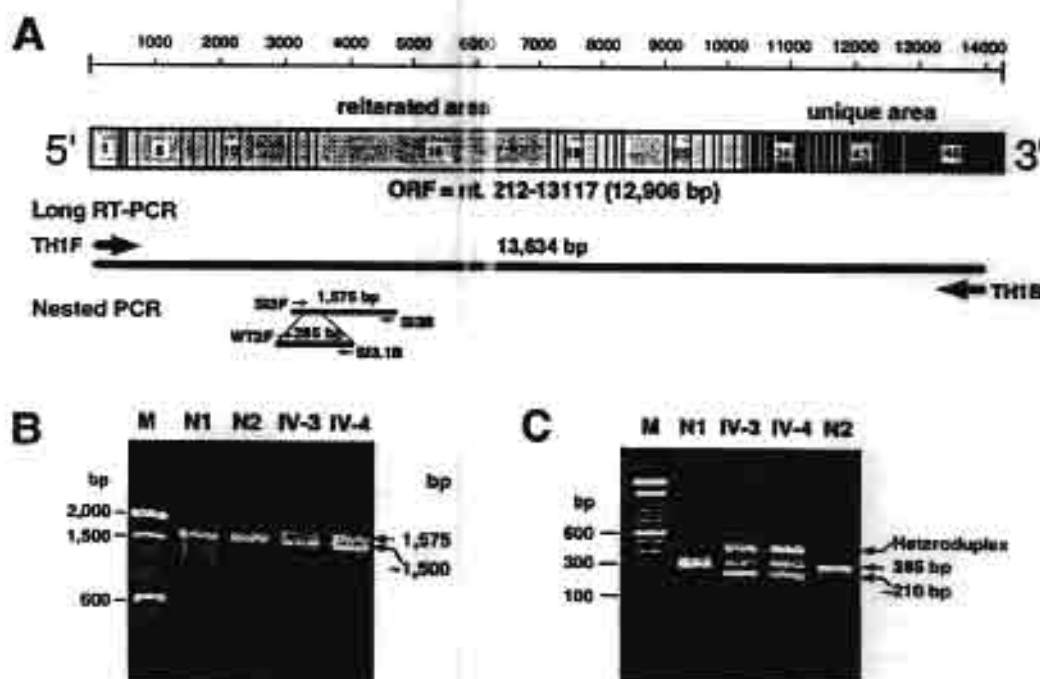


Figure 1 A: Diagrammatic representation of the full-length *PKD1* mRNA (upper), a long RT-PCR product (middle), and nested PCR products (lower). The reiterated region in the *PKD1* mRNA (between exons 1 and 32) is represented by the hatched area and the unique region (between exons 33 and 46) by the blackened area. The relative locations of the primers (TH1F/TH1B, SI3F/SI3B and WT2F/SI3.1B; solid arrows) used for amplifying a long RT-PCR product (long solid horizontal line) and the nested PCR products (short solid horizontal lines) are illustrated. A pair of PCR primers (WT2F/SI3.1B) were made for amplification of 285 bp in the region covering the deleted area (lowest) to confirm the prediction and for further analysis by DNA sequencing. B: Nested PCR products amplified from long *PKD1*-cDNA samples with the SI3F/SI3B primers from two normal individuals (N1 and N2) and from two *PKD1* patients (IV-3 and IV-4) of PK015 family. The normal samples showed one fragment of nested PCR product (1,575 bp) whereas the patients' samples demonstrated two fragments (1,575 and ~1,500 bp). Lane M is 100-bp DNA ladder. C: The nested PCR products amplified with the WT2F/SI3.1B primers in the deleted region from the long *PKD1*-cDNA samples of two normal individuals (N1 and N2) and the two patients (IV-3 and IV-4) of the PK015 family. While the normal

samples had only one fragment of 285 bp, the patients' samples contained two fragments of 285 and ~210 bp, as well as a heteroduplex DNA band. Lane M is 100-bp DNA ladder.

Mutation analysis by allele specific amplification (ASA)

Since the mutation observed in PK015 family did not create or abolish the sites of all known restriction endonucleases, the ASA method was employed to detect the mutation in all available members of this family. The genomic DNA sample from each individual was amplified in two separate reactions, with either a pair of wild-type (13WT/SI3.2B) or mutant (13MU/SI3.2B) primers, together with internal control (SI7.2F/SI7.2B) primers in both reactions. Normal and patient DNA samples consistently produced the internal control PCR product of 698 bp. DNA samples from normal individuals produced PCR products with the size of 259 bp only in the reaction containing the wild-type primer pair, whereas those from affected individuals generated PCR products with the size of 259 bp in both reactions.

Analysis by ASA of 24 members of PK015 family revealed 11 individuals with the *PKD1* mutation and 13 individuals without (Fig. 2). The same results were obtained when the LR-PCR products or the genomic DNA samples were used for the ASA analysis, indicating that the homologous sequences normally did not interfere with the reaction. The mutation linked (Fig. 2) and segregated with haplotype A or its variant (A*) defined by the 5 polymorphic DNA markers. By ASA analysis, the mutation could not be detected in DNA samples obtained from 57 unrelated and healthy subjects.

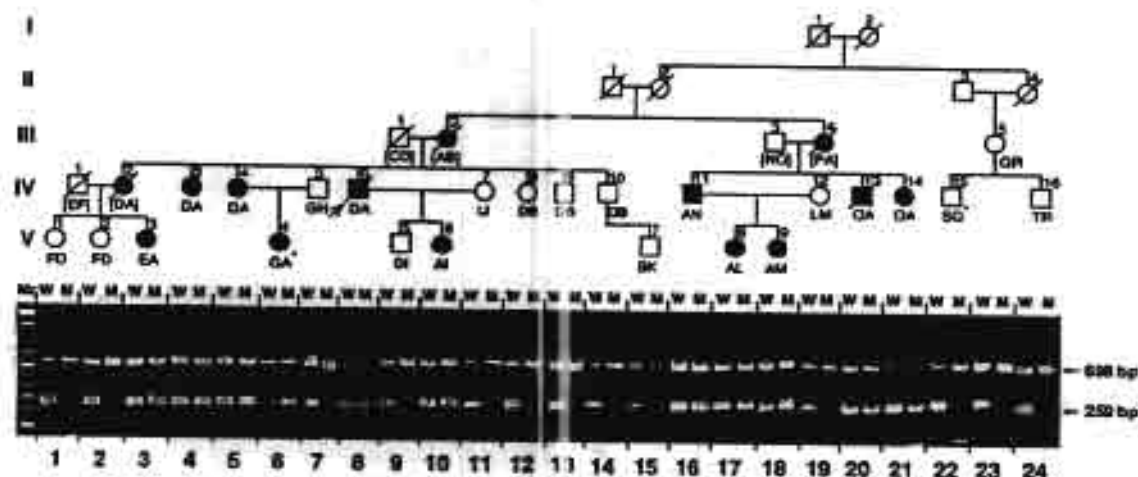


Figure 2 Detection of IVS13-2A>T mutation in *PKD1* by allele specific amplification (ASA) analysis in genomic DNA samples from members of PK015 family. Pedigree of the family is shown and haplotypes (A to T) in *PKD1* region of chromosome 16p13.3 as determined by using 5 polymorphic DNA markers are indicated under the symbols. Filled and blank symbols represent affected and unaffected members, respectively. DNA sample of each member was analyzed both for wild-type (W) allele with 13WT/SI3.2B primers and for mutant (M) allele with 13MU/SI3.2B primers, producing the same PCR-product size of 259 bp. A pair of internal control primers (SI7.2F/SI7.2B) were also added into both reactions, generating the PCR-product size of 698 bp. DNA samples of normal members (nos. 1, 2, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 22, 23, and 24) showed only the product of the wild-type allele (259 bp) but those of affected members (nos. 3, 4, 5, 6, 8, 10, 16, 17, 18, 20, and 21) gave the products of both wild-type and mutant alleles, which had the same size (259 bp). Lane M is 100-bp DNA ladder. The mutant allele linked and segregated with the designated haplotype A (7.2 kb for 3' HVR, 123 bp for KG8, 121 bp for SM6, 169 bp for 16 AC2.5, and 98 bp for SM7) or its variant, A* (4.0 kb for 3' HVR, 123 bp for KG8, 121 bp for SM6, 169 bp for 16 AC2.5, and 98 bp for SM7) with a possible deletion in the 3' HVR region.

DISCUSSION

We have developed a long RT-PCR method for isolation of the entire *PKD1* coding sequence from its mRNA transcript (Thongnoppakhun et al., 1999) and applied it to study mutation of *PKD1* in patients with ADPKD. A 74-bp deletion of exon 14 in a cDNA fragment amplified from the full-length *PKD1*-cDNA (~13.6 kb) was observed in two *PKD1* patients from the same PK015 family. Subsequent sequencing analysis of genomic DNA surrounding

exon 14 region of *PKD1* obtained by LR-PCR and nested PCR procedures revealed that a nucleotide transversion (A→T) had occurred at the position 26806 of *PKD1*. The nucleotide 'A' at this position is the first one in the invariable AG dinucleotide of the splice acceptor site in intron 13. Therefore, this IVS13-2A>T mutation was likely to result in the 74-nt deletion in exon 14 which is brought about by the inactivation of the normal splice acceptor site and utilization of a cryptic splice acceptor site at the nearby AG dinucleotide, located at position 73-74 in exon 14 of the *PKD1* mRNA (Fig. 3A).

When the 3' splice acceptor site is mutated, the effect may be either exon skipping or cryptic splice site utilization. This depends on the presence or absence of the next available legitimate or the next best, albeit illegitimate, splice site in the immediate vicinity (Krawczak et al., 1992). The observed RNA processing defect indicates that the AG dinucleotide at the positions 26880-26881 in exon 14 of *PKD1* is an available cryptic splice acceptor site. In normal splice acceptor sites, a pyrimidine tract is always present preceding the AG dinucleotide (Reed and Maniatis, 1985). A pyrimidine-rich tract, with two purine (GG) substitutions, prior to the AG nucleotide was observed in the cryptic splice acceptor site in exon 14 of *PKD1* (TCCTTCCCGGTTCCAG). The finding that the band intensity of the short cDNA fragment derived from the abnormally spliced mRNA was not reduced compared with that derived from the normally spliced mRNA (Fig. 1B and 1C) indicates that this cryptic splice acceptor site is used as efficiently as the normal splice acceptor site in intron 13. Additionally, the absence of a shorter cDNA fragment lacking entire exon 14 in the same experimental result indicates that exon 14 skipping associated with the IVS13-2A>T mutation did not occur.

Since this abnormal *PKD1*-mRNA was ectopically transcribed in the patients' peripheral blood lymphocytes, it is also highly probably transcribed in the kidneys and in other organs and cells that express polycystin-1. The resulting protein would have a normal amino-acid sequence for the first 1,054 amino acids followed by an abnormal sequence of 20 amino acids introduced by a frameshift (after the nucleotide at position 3373 in codon 1054) before a new stop signal (UGA) at codon 1075 is reached (Fig. 3B). This truncated polycystin-1 lacks the major part of the extracellular domain, all the transmembrane domains, and the cytoplasmic C-terminal portion, which are critical for its predicted function as a signal mediator.

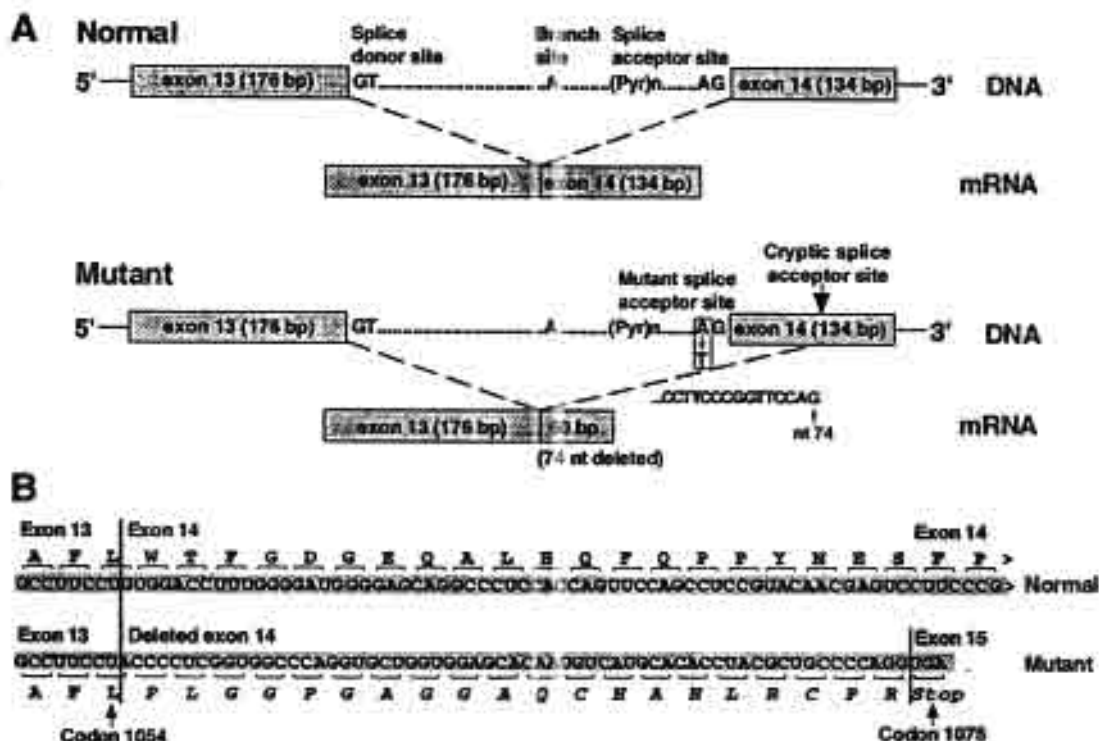


Figure 3 A: Diagram showing normal splicing of intron 13 (upper) and abnormal splicing at a cryptic splice acceptor site in exon 14 (lower) due to IVS13-2A>T mutation in the *PKD1* gene in the patients of PK015 family. The cryptic splice acceptor site has

the sequence of 'CCTTCCC GGTTCCAG', homologous to the native splice acceptor site at the intron 13/exon 14 junction. The abnormal splicing resulted in 74-nt deletion of exon 14, leaving 60 nucleotides of this exon. B: Frameshift in protein translation from the abnormal *PKD1* mRNA transcript with 74-nt deletion. Parts of protein translations from the normal (upper) and abnormal (lower) mRNA transcripts are compared. Frameshifting translation occurs after codon 1054 in the abnormal mRNA transcript, introducing 20 novel amino acids (italic letters), and prematurely terminates at codon 1075.

Using DNA sequencing, this mutation was found in altogether 6 affected individuals in this family. It was also detected by the ASA method in all 11 available affected members but not in 13 unaffected members. These results corresponded well with linkage analysis using 5 polymorphic DNA markers (Fig. 2). Moreover, the mutation could not be seen in 57 unrelated healthy individuals by using the ASA method. All these evidences support the notion that the *PKD1* mutation identified is the disease-causing gene in this family. The mutation affects *PKD1* by causing 'loss-of-function', which supports the 'two-hit' hypothesis (Qian et al., 1996; Brasier and Henske, 1997) which states that both germline and somatic mutations which would inactivate both alleles of *PKD1* are required.

Application of long RT-PCR and LR-PCR protocols for mutation analysis of *PKD1* in the *PKD1* patients will facilitate mutation discoveries, especially in the reiterated region of the gene. Data on *PKD1* mutation spectrum will help us to gain a better understanding of polycystin-1 function, the molecular pathogenesis of *PKD1*, and phenotypic expression in *PKD1* patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Dr. Prida Malasit, Head, Medical Molecular Biology Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital, Mahidol University, for allowing to use laboratory facilities; staff of Renal Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine-Siriraj Hospital for collection of patients' blood samples; and all the patients and laboratory personnel who donated the blood samples. This work was partly supported by a grant from the Faculty of Medicine-Siriraj Hospital. P.W. is also a senior research scholar of the Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Brasier JL, Henske EP (1997) Loss of the polycystic kidney disease (*PKD1*) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J Clin Invest* 99:194-199.
- Burn TC, Comors TD, Dackowski WR, Petry LR, Van Ransy TJ, Millholland JM, Venet M, Miller G, Hakim RM, Landes GM, Klinger KW, Qian F, Onuchic LF, Wataick T, Germino GJ, Doggett NA (1995) Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (*PKD1*) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 4:575-582.
- Dalgaard OZ (1957) Bilateral polycystic disease of the kidney: a follow-up of two hundred and eighty four patients and their families. *Acta Med Scand* 328:1-255.
- Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S (1995) Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25:733-736.
- Germino GG, Somlo S, Weinstat-Saslow D, Reeders ST (1992) Positional cloning approach to the dominant polycystic kidney disease gene, *PKD1*. *Kidney Int Suppl* 39:S20-S25.
- Harris PC, Thomas S, Ratcliffe PJ, Breuning MH, Coto E, Lopez LC (1991) Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *Lancet* 338:1484-1487.
- Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, Sammillan JL, Garbale V, Harris PC (1995) The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 10:151-160.
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54.
- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenon C, Srinaky JJ (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res* 18:999-1005.
- Mochizuki T, Wu GQ, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai YQ, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJM, Somlo S (1996) *PKD2*, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272:1335-1342.

- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17:2503-2516.
- Peral B, Ward CJ, Sanmillan JL, Thomas S, Stallings RL, Moreno F, Harris PC (1994) Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease I population. *Am J Hum Genet* 54:899-908.
- Peral B, Sanmillan JL, Ong ACM, Gamble V, Ward CJ, Strong C, Harris PC (1996) Screening the 3' region of the polycystic kidney disease I (*PKD1*) gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* 58:86-96.
- Peral B, Gamble V, Strong C, Ong ACM, Sloanestanley I, Zeres K, Winemals CG, Harris PC (1997) Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease I gene (*PKD1*) by a novel approach. *Am J Hum Genet* 60:1399-410.
- Peters DJM, Sandkuyl LA (1992) Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe. In: Breuning MH, Devoto M, Romeo G (eds) *Contributions to nephrology 97: polycystic kidney disease*. Basel, Karger, p 128-139.
- Qian F, Wamick TJ, Onuchic LF, Germino GG (1996) The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87:979-987.
- Ravine D, Gibson RN, Walker RG, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM (1994) Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease I. *Lancet* 343:824-827.
- Reed R, Maniatis T (1985) Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell* 41:95-105.
- Readers ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarman AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ (1985) A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317:542-544.
- The European Polycystic Kidney Disease Consortium (1994) The polycystic kidney disease I gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77:881-94.
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium (1995) Polycystic kidney disease: The complete structure of the *PKD1* gene and its protein. *Cell* 81:289-298.
- Thompson AD, Shen Y, Holman K, Sutherland GR, Callan DF, Richards RI (1992) Isolation and characterization of (AC)_n microsatellite genetic markers from human chromosome 16. *Genomics* 13:402-408.
- Thongnoppakhun W, Wilairat P, Vareesangthip K, Yenchaisri P (1999) Long RT-PCR amplification of the entire coding sequence of the polycystic kidney disease I (*PKD1*) gene. *BioTechniques* 26:126-132.
- Wamick TJ, Piontek KB, Cordal TM, Weber H, Gandolph MA, Qian F, Lens XM, Neumann HPH, Germino GG (1997) An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of *PKD1* is revealed by use of a novel strategy for mutation detection. *Hum Mol Genet* 6:1473-81.

**ABSTRACTS
OF
PRESENTATIONS**

ABSTRACTS

**The 23rd Congress on Science
and Technology of Thailand**

**20th -22nd October 1997
The Lotus Hotel Pang Suan Kaew
Chiangmai**

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย **กวนนิก้า กัวฮา**

สาขาวิชา:

นวต น.ส. นวส ศร. อ. ผศ. รศ. ศ.

การแพทย์ เกษตร

ชีววิทยา วิศวกรรม

ที่ทำงาน **ภาควิชาจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล**

วิทยาศาสตร์ แพทย์-เภสัช

อ. เมือง จ. ชลบุรี

โทร. 236905

แพทย์ อื่นๆ

EFFECTS OF DRUG COMBINATION BETWEEN PYRONARIDINE AND CURRENTLY AVAILABLE ANTIMALARIALS AGAINST *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN VITRO

Kunnika Kuaha and Prapon Wilairat

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University Bangkok 10400, Thailand

The increase in incidence of drug resistant malaria parasites has led to the frequent use of drugs in combination. Pyronaridine is a new antimalarial compound which has been developed and used in China since 1970. Combinations of pyronaridine and 4 currently available antimalarials (chloroquine, quinine, mefloquine and dihydroartemisinin) were assayed against multidrug-resistant (K1) strain of *Plasmodium falciparum* in vitro. The isobolar analysis and the sum of the fractional inhibitory concentration (Σ FIC) were employed for evaluating the inhibitory effect between the various combinations. The results showed that the sum of the fractional inhibitory concentration of each combination was less than 2 which indicated that all combinations of pyronaridine together with the other antimalarials had no antagonistic effect.

การศึกษาของฤทธิ์ยาต้านมาลาเรียที่ผสมกับยาต้านมาลาเรียตัวอื่นที่มีใช้ในปัจจุบันในการยับยั้ง การเจริญเติบโต ของเชื้อมาลาเรียชนิด K1 ในหลอดทดลอง

กวนนิก้า กัวฮา และ ประพนธ์ วิลัยรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

การเพิ่มขึ้นของปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย ทำให้การใช้ยาร่วมกันหลายชนิดในการรักษา โรคมลาเรียมีอัตราที่สูงขึ้น พyronaridine เป็นยาต้านมาลาเรียตัวใหม่ที่ยังไม่เคยใช้ในประทศขณะนี้มาเป็นเวลานาน ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านมาลาเรียที่ผสมกับยาต้านมาลาเรียตัวอื่นที่มีใช้ในปัจจุบัน เช่น คลอโรควิน ควินิน เมโฟลควิน และ ไดไฮโดรอาร์ทีมิซินิน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียชนิด K1 ในหลอดทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์ลักษณะของไอโซโบลในกรณีและ ค่าผลรวมของค่า fractional inhibitory concentration (Σ FIC) ในการทดสอบของยาที่ใช้ร่วมกันในการ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย ผลการทดสอบพบว่าค่าผลรวมของค่า fractional inhibitory concentration ของการใช้ยาร่วมกันแต่ละคู่มีความน้อยกว่า 2 ทุกคู่ และแสดงให้เห็นว่าไม่มีการต้านฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียที่ผสมกันกับ ยาต้านมาลาเรียตัวอื่นที่ 4 ชนิดที่นำมาศึกษา

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

INDEX KEY WORDS : Pyronaridine, Drugs combination, *P. falciparum*

THALASSEMIA AND MALARIA: NEW PARADIGMS FOR OLD DISEASES

Prapon Wilairat
Department of Biochemistry
Faculty of Science, Mahidol University

Hemoglobin Constant Spring (HbCS) is a nondeletional form of α -thalassemia present in 5-8% of the Thai population. It is due to a mutation in the stop codon of $\alpha 2$ -globin gene resulting in α -globin chain which is elongated by 31 amino acids. Instability of α^{CS} -mRNA greatly reduces the production of HbCS. However individuals homozygous for HbCS or those heterozygous with α -thalassemia-1 have more severe pathology when compared with parallel deletional types of α -thalassemia, namely, homozygous α -thalassemia-2 and Hb H (α -thalassemia-1/ α -thalassemia-2). Discovery of membrane-bound α^{CS} -globin chains in HbCS cells, in addition to the expected β -globin chains, accounts for the unusual pathophysiology of HbCS as such cells would manifest the properties of both α - and β -thalassemia.

The ability of the most virulent human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, to develop resistance against nearly all currently used antimalarial drugs has meant that there is an urgent need to develop more compounds. By viewing the parasite as a cancer cell, research was conducted to change the structure of a known anticancer drug, amascrine, and synthesize new compounds which were less toxic against human cell and more selective against the parasite. The best compound to date is 4-[(3,6-diamino-9-acridinyl)amino]benzenesulfonamide which has a high in vitro therapeutic index (1000) and inhibits *P. falciparum* in vitro with an IC_{50} of 20 nM.

แนวคิดใหม่ในการศึกษาโรคธาลัสซีเมียและมาลาเรีย

ประพนธ์ วิไลรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กท 10400

ฮีโมโกลบิน Constant Spring (Hb CS) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีนชนิดอัลฟา 2 โกลบินตรงตำแหน่ง stop codon เป็นผลให้มีการสร้างสายอัลฟาโกลบินยาวขึ้นอีก 31 กรดอะมิโนในฮีโมโกลบินชนิดนี้พบได้ 5-8% ของประชากรไทย จากการศึกษาพบว่าการสร้างสาย α^{CS} -mRNA ในเม็ดเลือดแดงจะลดลง และยังพบว่าในเม็ดเลือดแดงของผู้เป็น homozygote สำหรับ HbCS และ heterozygote ที่มีการกลายพันธุ์แบบ α -thalassemia-1 ยืนร่วมด้วยจะมีพยาธิสภาพรุนแรงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ เป็น homozygous α -thalassemia-2 หรือ Hb H (α -thalassemia-1/ α -thalassemia-2) ซึ่งสาเหตุเกิดจากการมีสาย α^{CS} โกลบินอิสระเกาะบนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงร่วมกับสายบีตาโกลบิน ซึ่งโดยปกติจะพบสายอัลฟาโกลบินบนผนังเซลล์ชนิดบีตาธาลัสซีเมีย ดังนั้นจึงทำให้ Hb CS เซลล์มีความผิดปกติทั้งแบบที่พบใน α - และ β -ธาลัสซีเมีย

โรคมาลาเรียเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญโดยเฉพาะที่เกิดจากเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมฟัลซิพารัม ซึ่งมีความสามารถต่อต้านมาลาเรียเกือบทุกชนิด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการรักษาและพัฒนาสายชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมา เนื่องจากพบว่าเชื้อมาลาเรียมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณเซลล์ได้อย่างรวดเร็วคล้ายกับเซลล์มะเร็ง ดังนั้นได้มีการพัฒนาสารรักษามะเร็งที่มีชื่อว่า amascrine ให้มีหลายอนุพันธ์ โดยมุ่งเป้าหมายว่าเป็นอนุพันธ์ที่มีความสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อมาลาเรียและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์น้อยที่สุด พบว่าอนุพันธ์ที่ดีที่สุดคือ 4-[(3,6-diamino-9-acridinyl)amino]benzenesulfonamide โดยมีค่า in vitro therapeutic index (TI) = 1000 และ IC_{50} ในระดับ 20 nM

INDEX KEY WORDS: thalassemia, hemoglobin, malaria, antimalarial drug

This work was supported by Thailand Research Fund.

ABSTRACTS

**The 2nd International Conference
on Thalassemia in China
Thalassemia in Millennium**

**13th-16th October, 1998
Nanning Guangxi,
The People's Republic of China**

HEMOGLOBIN CONSTANT SPRING: AN ENIGMA UNDERSTOOD?

Prupon Wilairat

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University
Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand*

A hemoglobin (Hb) variant with slow mobility on starch gel-electrophoresis was first noticed by Wasi and co-workers among a few patients with HbH disease and was named Hb Thai, but the hemoglobin was not characterized (1). Similar reports of a slow migrating Hb variant appeared among subjects in Greece, Malaysia, Hong Kong and the USA. Identification of the mutant globin ultimately fell to samples obtained from three Chinese individuals living in Constant Spring, Kingston, Jamaica (2).

Hb Constant Spring (CS) contains an elongated α -globin chain due to a point mutation in the termination codon (TAA \rightarrow CAA) of the α_2 -globin allele, resulting in insertion of glutamine in position 142 and translation of 31 additional amino acids before an inframe termination codon is read. Red cells of heterozygous ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) and homozygous ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$) individuals contain very low amounts of HbCS (less than 10%) so that α^{CS} -gene can be considered as being equivalent to α^{CS} -thalassaemia-2(3). The explanation is that α^{CS} -globin mRNA is unstable presumably due to the intrusion of ribosomes into the 3' untranslated region (UTR) of mRNA and thereby displacing 3'UTR-binding proteins which confer protection against ribonuclease degradation (4,5).

However when α^{CS} -gene is inherited together with α -thalassaemia-1, such Hb H/CS individuals present a more severe pathology than those with the classical Hb H disease (6). Furthermore, homozygous Hb CS subjects have clinical symptoms which would not have been expected in the equivalent homozygous α^{CS} -thalassaemia-2 state. Thus the presence even of a small amount of Hb CS is deleterious to red cells.

Based on the consideration that the extended form of α^{CS} -globin may interfere with its association with β -globin chains, and thus making such unmatched α^{CS} -globin molecules more likely to precipitate onto the plasma membrane cytoplasmic surface, we therefore examined Hb H/CS and Hb CS/CS red cells for the presence of membrane-bound globin chains (7). SDS polyacrylamide gel-electrophoresis of membrane preparations revealed the presence of a protein band with molecular size slightly greater than normal globin and this band reacted with rabbit anti-human α -globin antibodies in a Western blot assay. The identity of this membrane-bound protein as being α^{CS} -globin was further verified by comparing its ratio of biosynthetically [3 H]-labeled proline/[14 C]-labeled lysine (11:11) with that of normal globin chain (7:11). A similar finding was reported by Schrier and co-workers (8) who in addition showed that both membrane-bound α^{CS} - and β -globin chains are oxidized and that membrane alterations induced by α^{CS} -globin chains are more akin to

those induced by β -globin chains than those induced by α -globin chains that accumulate in the β -thalassemias. It is unclear whether membrane-bound α^{CS} -globin originates from binding of unmatched α^{CS} -globin chain or of cationic Hb CS to the negative cytoplasmic surface of the red cell bilayer.

Hb H/CS cells are more hydrated than Hb H cells, and the possibility exists that membrane derangement in Hb CS-containing red cells results in loss of activation of K-Cl cotransport system which is responsible for dehydration of thalassemic cells (9). Hypo-osmolarity induced K-efflux of Hb H/CS (6.7 ± 3.0 nmole/1010 cell/hr, $n = 6$) and Hb H cells (7.3 ± 0.6 nmole/1010 cell/hr, $n = 4$) were increased compared with normal red cells (1.5 ± 0.5 nmole/1010 cell/hr, $n = 6$), but there was no significant difference between the two types of Hb H cells (10). When the thalassemic red cells were fractionated according to density, increased K-efflux were measured in both light and heavy fractions, with 3-4 times more activity associated with the light fraction, suggesting that dense dehydrated cells in α -thalassemia may not be due to activation of the K-Cl cotransport system alone. How Hb CS "normalizes" cell volume remains unexplained.

Acknowledgements

Supported by Prajadhipok-Rambhai Barni Foundation, CEC grant TS3*-CT92-0081, and National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science, Technology and Environment, Thailand. PW is a Senior Research Scholar of The Thailand Research Fund.

References

1. Wasi P et al. *Br Med J* 1967; iv: 29.
2. Milner PF, Clegg JB, Weatherall DJ. *Lancet* 1971; i: 729.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. *Phil Trans R Soc Lond B Biol* 1975; 271: 411.
4. Hunt DM et al. *Br J Haematol* 1982; 51: 405.
5. Liebhaber SA et al. *Molecular Biology of Gene Switching* (Stamatoyannopoulos G ed) Intercept Ltd, Andover, UK, 1995; p 375.
6. Fucharoen S et al. *Birth Defects* 1987; 23 (5A): 309.
7. Peerapittayamongkol C, Bemini LF, Wilairat P. *J Sci Soc Thailand* 1996; 22: 117.
8. Schrier SL et al. *Blood* 1997; 89: 1762.
9. Olivieri O et al. *Blood* 1994; 84: 315.
10. Sacier N. M.Sc. Thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 1998.

QUANTITATION OF β -GLOBIN mRNA IN β -THALASSEMIA/HEMOGLOBIN E

*Yowalee Watanapokasin, Pravee Winichagoon, Prapon Willairit, Suthat Fucharoen
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinadarinwirot University, Thalassemia
Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Department
of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand*

Thalassemia is a widespread genetic disease. By the year 2000, 7% of the world's population will carry a globin chain mutation. β -thalassemia is a very heterogeneous disorder due to the inactivation of the β -globin genes. Point mutation and small deletion or insertion in the nucleotide sequences are the main molecular defect responsible for most β -thalassemia. The inability to synthesis β -globin results in globin chain imbalance leading to the formation of excess unmatched α -globin chains. It is, however, not clear whether the level of β -globin mRNA is also reduced. Using real time PCR detection system for quantitation of α/β globin mRNA ratio in different genotypes of Thai β -thalassemia subjects was performed. The α/β globin mRNA ratios obtained in 8 subjects were as follows: β^A/β^A (1 case) 1.04, and $\beta^{A \Delta 41}/\beta^A$ (1 case) 2.72-4.89, β^{E}/β^E (1 case) 3.74, $\beta^{E \Delta 17}/\beta^E$ (1 case) 2.05 and $\beta^A/\beta^{E \Delta 17}$ (1 case) 1.14. These results support the contention that the imbalance of protein synthesis in β -thalassemia reflects both impairment of translation and reduced β -globin mRNA content.

This work is supported by The Thailand Research Fund and The National Research Council of Thailand.

ABSTRACTS

**The 8th Federation of Asian
and Oceanian Biochemists and
Molecular Biologists Congress**

**22nd-26th November, 1998
Istana Hotel, Kuala Lumpur
Malaysia**

***Plasmodium falciparum* DNA TOPOISOMERASES:
TARGETS FOR NOVEL ANTIMALARIALS**

P. Wilairat, K. Kuaha, N. Tepsiri, P. Petmitr, D.P. Figgitt¹, S.A. Gammage², S.J. Wojcik¹,
F.K. Ralph¹ and W.A. Denny²

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

¹School of Biological Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand and ²Cancer Research
Laboratory, School of Medicine, University of Auckland, Auckland, New Zealand.

There is an urgent need to discover new antimalarial drugs using a more systematic and rational basis than has been done in the past. DNA topoisomerases are a class of enzymes which catalyze changes to the helical winding of DNA. A series of derivatives of amsacrine [4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-*m*-ansidine], an antitumor drug and inhibitor of mammalian topoisomerase II, were synthesized and tested for their activities against the multi-drug resistant K1 line of *P. falciparum*. The most potent derivative, 3,6-diNH₂-1'-SO₂NH₂-9-anilinoacridine, had an IC₅₀ = 20 nM with an *in vitro* therapeutic index (IVTI) of 1000 relative to Jurgat cell, and inhibited decatenation of parasite topoisomerase II at 6 μM and above. However, the compound was ineffective in *P. berghei*-infected mice. Derivatives of the AT-rich DNA minor groove binding compound, --[4-[4-[4(N-methylquinolinium)-amino] benzamido] anilino]-N-methylpyridine, were also prepared and tested for their antimalarial properties. The most active compounds were those with substitutions in the quinoline ring (IC₅₀ = 20 nM; IVTI = 1000) and inhibited both *P. falciparum* topoisomerase I and II at approximately 25 μM and above.

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund)

C1
**CLEAVAGE OF DNA INCUDED BY 9-
INOACRIDINE INHIBITORS OF
TOPOISOMERASE II IN MALARIA
PARASITE *PLASMODIUM FALCIPARUM***

S. A. Parakkitanon and P. Wilairat

*Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Due to resistance to most of antimalarial drugs by *P. falciparum*, the most virulent strain of human malaria parasites, development of new effective antimalarial drugs is urgently needed. Derivates of 9-anilinoacridine, an antitumor drug, have been shown to inhibit *P. falciparum* growth in culture, and to inhibit parasite DNA topoisomerase II activity *in vitro*. Using KCl/SDS precipitation assay to detect the presence of protein-DNA complexes within parasite cells, an indicator of DNA topoisomerase II inactivation, derivatives containing 3,6-diNH₂ substitutions with 1'-electron donating (NMe₂, CH₂NMe₂, NHSO₂Me, OH, OMe), or 1'-electron withdrawing (SO₂NH₂) groups produced protein-DNA complexes. However, pyronaridine, 9-anilino-aza-acridine antimalarial drug, did not produce protein-DNA complexes although it could inhibit *P. falciparum* DNA topoisomerase II activity *in vitro*. During topoisomerase II-mediated DNA-protein complex formation, the enzyme forms a covalent link with the 5'-phosphate of DNA producing a free 3'-hydroxyl end. Terminal deoxynucleotidyl transferase was used to label to 3'-terminal of fragmented DNA *in situ* (TUNEL technique). Derivates of 9-anilinoacridines which produced DNA-protein complexes as determined by KCl/SDS method also produced significantly higher TUNEL+ cells compared to control. Pyronaridine failed to stimulate an increase in TUNEL+ cells.

PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.

ABSTRACTS

**Joint International Tropical
Medicine Meeting 1998**

**20th -21st August, 1998
Faculty of Tropical Medicine,
Mahidol University
Bangkok**

DNA TOPOISOMERASES AS TARGETS OF NOVEL ANTIMALARIALS

Prapón Wilairat¹, Saranya Auparakkitanon¹, Kunnika Kuaha¹, Nisana Tepsiri¹, Porntip Petmitr², David P Figgitt³, Swarna A Gammage⁴, Stanley J Wojcik³, Raymond K Ralph³, William A Denny⁴

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³School of Biological Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand

⁴Cancer Research Laboratory, School of Medicine, University of Auckland, New Zealand

The rapid appearance of resistance to currently used antimalarials by the most virulent human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, requires an urgent need to develop new drugs directed against defined parasite targets, a strategy which had not been followed in the past. DNA topoisomerases are a class of enzymes which catalyze changes to the helical winding of DNA necessary during replication, transcription, recombination and repair. A series of derivatives of amsacrine (4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-*m*-ansidine), an antitumor drug and inhibitor of mammalian topoisomerase II, were synthesized and tested for their activities against the multi-drug resistant K1 line of *P. falciparum*. The most potent derivative (3,6-NH₂, 1'-SO₂NH₂) had an IC₅₀ = 20 nM with an *in vitro* therapeutic index of 1000 relative to Jurkat cell, and inhibited decatenation of parasite topoisomerase II at 6 μM and above. Using KCl/SDS precipitation assay to detect the presence of protein-DNA complexes within parasite cells, an indicator of DNA topoisomerase II inactivation, derivatives containing 3,6-diNH₂ substitutions with 1'-electron donating (NMe₂, CH₂NMe₂, NHSO Me, OH, OMe), or 1'-electron withdrawing (SO₂NH₂) groups produced protein-DNA complexes. During topoisomerase II-mediated DNA-protein complex formation, the enzyme forms a covalent link with the 5'-phosphate of DNA producing a free 3'-hydroxyl end. Terminal deoxynucleotidyl transferase was used to label to 3'- termini of fragmented DNA *in situ* (TUNEL technique). Derivatives of 9-

anilinoacridines which produced DNA protein complexes as determined by KCl/SDS-method also produced significantly higher TUNEL⁺ cells compared to control. In addition, derivatives of the DNA minor groove binding compound, 4-[4-[4-(N-methylquinolinium)-amino]benzamido]anilino]-N-methylpyridine, were also synthesized and tested for their antimalarial properties. The most active compounds were those with substitutions in the quinoline ring (IC₅₀ = 20 nM; IVTI = 1000) and inhibited both parasite topoisomerase I and II at approximately 25 μM and above. \leq

Supported by UNDP/World Bank/WHO TDR Programme, Netherlands Minister for Development Cooperation, Health Research Council of New Zealand, and New Zealand Lottery Grants Board. PW is a Senior Research Scholar of The Thailand Research Fund.

STUDIES OF FLUOROQUINOLONE AND ANTIMALARIAL DRUG COMBINATIONS AGAINST *P. FALCIPARUM* IN VITRO

Sunan Nakornchai, Phattanapong Konthaiang

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Topoisomerase is the enzyme which alter topology of DNA by breaking and rejoining phosphodiester bond of DNA. Bacterial topoisomerase II or DNA gyrase catalyzes interconversion between closed circular DNA and supercoiled DNA. Topoisomerase II also play an important role in decatenation of closed circular DNA and unknotting of DNA. Topoisomerase II involved in DNA replication and transcription. Fluoroquinolone has previously been reported to be effective against bacterial DNA topoisomerase II.

The antimalarial activity of several fluoroquinolones *in vitro* against chloroquine resistant *P. falciparum* was evaluated by measuring ³H-hypoxanthine incorporation into the parasites. Fluoroquinolones inhibited growth of parasites with the EC₅₀ of 10⁻⁵ M.

When drug combinations of fluoroquinolone (norfloxacin, ofloxacin or ciprofloxacin) with antimalarial drug (quinine, mefloquine, artesunate or pyronaridine) were studied, quinine showed additive effect with norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin. Mefloquine showed the additive effect in combination with norfloxacin or ciprofloxacin whereas combination of mefloquine and ofloxacin showed synergistic effect. Combination of all fluoroquinolones with artesunate or pyronaridine resulted antagonism.

The effectiveness of fluoroquinolones on topoisomerase II activity was determined from the decatenation of kinetoplast DNA by partially purified topoisomerase II of *P. falciparum*. All fluoroquinolones did not inhibited the decatenation activity of the parasite topoisomerase at 10⁻⁵ M. *In*

situ topoisomerase II activity of parasites determined by Tunnel technique was also not sensitive to fluoroquinolones.


Supported by the Thailand Research Fund

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL DNA POLYMERASE FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Pornpip Petmitr¹, Srisucha Chawprem¹, Prapon Wilairat²

¹Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, and

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

This is the first study on the purification of mitochondrial DNA polymerase from *Plasmodium falciparum* by using FPLC. The mitochondria of *P. falciparum* was isolated from mature trophozoite stage by differential centrifugation. Mitochondrial DNA polymerase was partially purified and characterized by using various specific inhibitors. Aphidicolin-resistant and N-ethylmaleimide-sensitive DNA polymerase activity was detected from purified mitochondria of *P. falciparum*. The characteristics of mitochondrial DNA polymerase was similar to those of other eukaryotic DNA polymerase γ except for its high resistance to ddTTP ($IC_{50} > 400$ mM). In addition, mitochondrial DNA polymerase γ was also resistant to nucleotide analogues such as (S)-1-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] adenine diphosphate (HPMPApp) and 9-[2-(phosphonylmethoxy) ethyl] adenine diphosphate (PMEApp) ($IC_{50} > 1$ mM) whereas γ -like DNA polymerase of *P. falciparum* cellular extract was previously reported as HPMPApp-sensitive enzyme ($IC_{50} = 1 \mu M$). The different sensitivity of these inhibitors of mitochondrial DNA polymerase from *P. falciparum* and other eukaryotic DNA polymerases indicated that mitochondrial DNA polymerase γ can possibly act as a novel target for chemotherapy of malaria in the future. 

This work was supported by The Thailand Research Fund

ABSTRACTS

**The 24th Congress on Science
and Technology of Thailand**

**19th -21st October, 1998
Queen Sirikit National Convention Center
Bangkok**

ชื่อ-สกุล ผู้มีใบงานวิจัย ประพนธ์ วิไลรัตน์

นาย น.ส. นาง ดร. อ. พ.ศ. ร.ศ. ศ.

S-05

ที่ส่งงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพหลโยธิน 6 พญาไท กทม.10400

โทร. 2481358 ต่อ 6310

RED BLOOD CELL MEMBRANE IN THALASSEMIA

Prapon Wilairat

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Reduction of α -globin synthesis in α -thalassemia causes a relative overproduction of β -hemoglobin chains which form the homotetramer β_4 or Hb H. Conversely, α -hemoglobin chains accumulate as a result of a decrease in β -globin production in β -thalassemia. However, α -hemoglobin chains cannot form homotetramers and these unmatched chains bind to the cytoplasmic surface of the red cell plasma membrane. Hb H is also found on the membrane of α -thalassemic red cells. The impact of these membrane-bound globin chains is to give rise to oxidative damage to both the lipid and protein components. Oxidation at the red cell membrane is probably the result of free radicals generated by iron, heme or hemichromes. The abnormal red cell shapes and reduced deformabilities of thalassemic red cells point to defects in the membrane cytoskeleton. The exact nature of membrane damage depends on the type of membrane-bound globin chains. Cation imbalance in thalassemic red cells can be attributed to oxidative damage to red cell membrane ion transport systems. Notwithstanding the exact molecular modifications that have occurred on the cytoplasmic side of the thalassemic plasma membrane, these perturbations are transferred across the bilayer to manifest as alterations to the outer surface. Changes that have been identified include loss of sialic acid, co-clustering of the glycophorins, binding of autoantibodies directed against α -galactosyl residues as well as neoantigens of band 3, and externalization of phosphatidylserine. Autoantibodies have been shown to be present on the surface of erythroblasts in α - and β -thalassemia indicating that they may be involved in the ineffective erythropoiesis encountered in both syndromes. Recently, C3 and cytolytic C5b-9 complement components have been detected on the surface of circulating red cells from β -thalassemia/Hb E subjects. All of these phenomena contribute to the creation of signals for enhanced removal of thalassemic red blood cells by the body's reticuloendothelial system, thereby leading to the anemia of thalassemia.

เยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ประพนธ์ วิไลรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพหลโยธิน 6 กทม.10400

การสร้างโปรตีนฮีโมโกลบินลดลงในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะทำให้โปรตีนเบตาโกลบินส่วนเกินจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มสี่สาย (homotetramers β_4) หรือเรียกว่าฮีโมโกลบินเอช (HbH) ขณะที่ในภาวะธาลัสซีเมียจะมีการสร้างฮีโมโกลบินเบตาโกลบินลดลงและพบว่าสายโปรตีนเบตาโกลบินส่วนเกินจะสะสม แม้ว่าโปรตีนฮีโมโกลบินเหล่านี้จะสามารถรวมตัวเป็นกลุ่มได้ แต่ก็สามารถจะไปจับกับบริเวณเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงด้านในได้ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะไปจับกับเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเช่นกัน การที่โปรตีนโกลบินเหล่านี้ไปจับกับเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงจะทำให้เกิด oxidative damage ต่อทั้งโปรตีนและไขมันของ เยื่อเซลล์ การเกิด oxidative ที่บริเวณเยื่อเซลล์เกิดเนื่องจากการปล่อยอนุมูลอิสระ (free radicals) โดยเหล็ก, ฮีโม (heme) หรือ เฮมิโครม (hemichrome) การที่เม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีรูปร่างผิดปกติและมีความยืดหยุ่นน้อยลง บ่งบอกถึงความผิดปกติใน cytoskeleton ของเยื่อเซลล์ การทำลายเยื่อเซลล์จะเกิดขึ้นได้หรือไม่อย่างไรขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนโกลบินที่เกาะที่เยื่อเซลล์ นอกจากนี้การรวมตัวของฮีโมโกลบินเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียยังเป็นสาเหตุของการเกิด oxidative damage ต่อระบบการขนส่งอิเล็กตรอนของเยื่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะเกิดขึ้นบนผิวเยื่อเซลล์ก็ตาม แต่ก็สามารถส่งผลกระทบต่อภายในได้ทั้งด้านเยื่อเซลล์โดยอ้อม การเปลี่ยนแปลงที่โคพอลิเมอร์ของโปรตีน band 3 และ glycophorins, การจับของแอนติบอดี (X-galactosyl residues, การแสดงแอนติเจนใหม่ (neoantigen) ของโปรตีน band 3 และรวมทั้งการที่ phosphatidylserine ออกไปปรากฏที่ด้านนอกของเยื่อเซลล์ แอนติบอดีที่ก่อภาวะ (autoantibody) สามารถจับกับเม็ดเลือดแดงตัวธาลัสซีเมียที่ในวัยทารกได้ ซึ่งมีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไขกระดูกในไตทั้งของทารก เมื่อเจริญวัยก็มีการพบ C3 และองค์ประกอบของ complement คือ C5b-9 ปรากฏอยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดงที่ได้นำมาจากเม็ดเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียในวัยผู้ใหญ่ (beta-thalassemia/HbE) ทั้งหมดนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นการสร้างความผิดปกติต่อส่วนเม็ดเลือดแดงที่ติดกับที่ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยระบบ reticuloendothelial system ในร่างกายซึ่งนำไปสู่การเกิดการฉีกที่ต่างกันในธาลัสซีเมีย

INDEX KEY WORDS: thalassaemia, membrane-bound globin chains, oxidative damage

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย มัจฉา มาตาทิพย์

เขียนที่ □ น.ส. □ น.วิ □ พ. □ อ. □ ผ.ศ. □ ร.ศ. □ ก.

S-17

ที่ทำงาน หน่วยอนุชีววิทยาภาควิชาแพทยศาสตร์ สิริราชวิทยาลัย ชั้น 5

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล กรุงเทพฯ 10700 โทร. 418-4732, 419-8257

INVESTIGATIONS INTO THE PATHOGENIC MECHANISMS RESPONSIBLE FOR THE INCREASED SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS IN THALASSEMIC PATIENTS

Prida Malaisri¹, Prapat Suriyaphol¹, Prapen Wilairat², Suthat Fucharoen³, Sucharit Bhakdi⁴

¹Medical Molecular Biology Unit, Office of Research & Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok.

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

³Haematology Unit, Department of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok

⁴Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Mainz University, Germany

Thalassemic patients, particularly those who have been splenectomized, are more susceptible to repeated infections and showed abnormalities in the platelet and coagulation functions. Acquired complement deficiency has been reported and might be one of the important factors for increased susceptibility to infection. However, no clear explanation has been offered for the mechanisms leading to hypocomplementemia, abnormal platelets, and coagulation system in thalassemia. The primary defect in thalassemia is the reduction of globin chain synthesis, which leads to the abnormalities of RBCs. Many biochemical and structural defects are found in thalassemic RBCs, including depletion of cytoplasmic ATP, oxidative damage to the membrane and complement activation on the surfaces. It is known that RBC with such defects will shed parts of their membranes in the form of small vesicles.

Our investigations centered on the search for mechanisms that lead to the defects listed above, in particular whether red cell vesicles exist *in vivo*. We have successfully shown that red cell vesicles were indeed present in the patients' plasma. The vesicles were spherical or oval in shape, with an average size of 0.3 µm. They were devoid of spectrin, a major erythrocytic cytoskeletal protein, and exposed phosphatidylserine on their surface. The vesicles possess procoagulant activity and efficiently activate the complement system via the alternative pathway.

These findings could serve as linkages between the defective hemoglobin synthesis, red cell perturbation and a group of clinical complications found in thalassemia. The fact that significant amounts of red cell vesicles has been found to be constantly generated *in vivo*, and the vesicles are functionally active in complement activation, and consumption of coagulation factors suggests that they represent important factors responsible for the complications described.

งานวิจัยเรื่องกลไกทางพยาธิของภาวะการติดเชื้อบ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ปริดา มาตาทิพย์¹, ประภาพร สุริยภล¹, ประพนธ์ วิลัยรัต², สุทธิชัย ฟูเจริญ³, สุชาติ ภักดี⁴

¹หน่วยอนุชีววิทยาภาควิชาแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

³หน่วยโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

⁴สถาบันอนุชีววิทยาภาควิชาการแพทย์และอนามัย มหาวิทยาลัยไมซ์ ประเทศเยอรมนี

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยเฉพาะผู้ที่ได้รับการตัดม้ามแล้วจะมีโอกาสติดเชื้อบ่อยและมักพบว่ามีความผิดปกติของเกร็ดเลือดและระบบการแข็งตัวของเลือด มีรายงานว่าระดับโปรตีนของระบบคอมพลีเมนต์ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียต่ำกว่าปกติซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อบ่อย ปัจจุบันยังไม่มีการอธิบายที่ชัดเจนสำหรับกลไกที่นำไปสู่การเกิดโปรตีนของระบบคอมพลีเมนต์ต่ำและความผิดปกติของระบบเกร็ดเลือดและการแข็งตัวของเลือดในธาลัสซีเมีย สาเหตุเบื้องต้นของธาลัสซีเมียเกิดจากการสังเคราะห์สายโปรตีนโกลบินลดลง ซึ่งเป็นผลให้เกิดความผิดปกติขึ้นกับเม็ดเลือดแดง มีการหลั่งอนุภาคขนาดเล็กที่เกาะโคเวอจันและกระบวนการชีวเคมีในเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียเช่น ปริมาณ ATP ในเซลล์ลดลง, เมมเบรนเสียหายจากกระบวนการออกซิเดชัน และมีการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์บนผิวเม็ดเลือดแดง มีงานวิจัยที่ศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติในภาวะดังกล่าว เมมเบรนส่วนต่างๆและเซลล์ของมันเป็นเม็ดเลือด ๑ (เรียกว่าเวสิเคิล)

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมุ่งหาความสัมพันธ์กับการมีพลาสมาโปรตีนความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงในธาลัสซีเมียกับการเกิดโปรตีนของระบบต่าง ๆ ส่วนต้นไม้อาจจะเกิดจากกลไกที่เป็นลักษณะสำคัญ คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการหาความสัมพันธ์ปริมาณเวสิเคิลของเม็ดเลือดแดงในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เวสิเคิลเหล่านี้มีรูปร่างกลมหรือรี มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.3 ไมโครเมตร เวสิเคิลไม่มีโปรตีนสเปกทินซึ่งเป็นโปรตีนที่เกาะกับสำคัญของเม็ดเลือดแดง และมีต่อสภาพผิวที่วางปรากฏอยู่ผิว เวสิเคิลเหล่านี้มีฤทธิ์กระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดและยังสามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ได้ทางวิถีอัลเทอร์เนทีฟ

ความรู้นี้มาจากการศึกษาทิวทัศน์ที่สามารถนำมาซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติในการสังเคราะห์โปรตีนโกลบินในอาการทางคลินิกกับพลาสมาธาลัสซีเมีย คณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าเวสิเคิลที่อยู่ในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียสามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ทำให้อัตราการใช้โปรตีนของระบบคอมพลีเมนต์ และยังสามารถกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดอีกด้วย ดังนั้นเวสิเคิลจึงอาจจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เชื่อมความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงกับระบบคอมพลีเมนต์และระบบการแข็งตัวของเลือดในธาลัสซีเมีย

INDEX KEY WORDS: VESICLES, THALASSEMIA, PATHOGENESIS, INFECTION, COMPLEMENT

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย สุภิญญา อุทัยสง่า

สาขาวิชา:

 น.บ. น.ส. น.ว. ดร. อ. ผศ. รศ. ศ. กายภาพ จิตวิทยา

ตำแหน่ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

 แพทย์ กวี-วรรณศิลป์

โทร. 2460063 ต่อ 6303

 เศรษฐ. วิศวกรรม วิทย์-สุขภาพ ทั่วไปSTUDIES ON DRUG COMBINATIONS AGAINST *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN VITRO.

Sugunya Uthaisang and Praporn Wilairat

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Malaria is the most widespread of the parasitic diseases facing humankind today and the situation is worsening. This is caused by the spread of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* which is the most virulent strain of human malaria parasites. Drug combinations have been used to increase the efficacy of treatment, to prevent or delay the emergence of drug resistance, and *in vitro* to understand the mode of action of drugs. In this study, an exogenous oxidant agent, hydrogen peroxide (H_2O_2) which can cause oxidative damage to malaria parasite, was used in combinations with protein synthesis inhibitors (cycloheximide, tetracycline, and chloramphenicol). All of the combinations were synergistic, but a marked synergism was observed with a combination of hydrogen peroxide and chloramphenicol. This suggests that cycloheximide and tetracycline may act by inhibiting *de novo* biosynthesis of antioxidant enzymes (such as catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px)) of malaria parasites, whereas chloramphenicol when used in combination with H_2O_2 may act through a different mechanism.

การศึกษาของการใช้ยาร่วมกัน ต่อเชื้อพลาสมาเดียม *Plasmodium falciparum* ในหลอดทดลอง
สุภิญญา อุทัยสง่า และ ประพนธ์ วิไลรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

มาลาเรียเป็นโรคระบาดที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขต่อประชากรโลก ทั้งนี้เนื่องมาจากการแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* ซึ่งคือยาค้านมาลาเรียหลายชนิด การใช้ยาร่วมกันถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา ป้องกัน หรือ เพื่อชะลอการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย อีกทั้งช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาค้ำย จากการศึกษาพบว่า เมื่อนำสาร oxidant (hydrogen peroxide) มาทดสอบร่วมกับยาในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน (cycloheximide tetracycline และ chloramphenicol) พบว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียร่วมกับโดยที่ hydrogen peroxide ร่วมกับ chloramphenicol ให้ผลต้านเชื้อมาลาเรียดีที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cycloheximide และ tetracycline อาจยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จาก oxidative damage ในขณะที่ chloramphenicol อาจออกฤทธิ์แตกต่างออกไปเมื่อนำมาใช้ร่วมกับ hydrogen peroxide

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

INDEX KEY WORDS: drug combination, *Plasmodium falciparum*, hydrogen peroxide, chloramphenicol

ชื่อ-สกุล ผู้รับรางวัลวิจัย พัฒนพงศ์ สนเที่ยง

 น.บ. น.ส. นาง พ.ร. อ. ผ.ศ. ร.ศ. อ.ร.

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระรามหก กทม. 10400

โทร.2461358-62 ต่อ 6302

สาขาวิชา:

 การแพทย์ ชีวภาพ
 เภสัช ชีวเคมี-เภสัช
 เภสัช วิชวะ-เทคโนโลยี
 วิทยาศาสตร์ อื่นๆ

STUDIES ON COMBINATION OF FLUOROQUINOLONE AND ANTIMALARIAL DRUGS AGAINST CHLOROQUINE RESISTANT *P.FALCIPARUM* IN VITRO

Sunan Nakomchai and Phattanasong Konthaiang

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

The antimalarial activity of several fluoroquinolones *in vitro* against chloroquine resistant *P.falciparum* was evaluated by measuring ³H-hypoxanthine incorporation into the parasites. Fluoroquinolones inhibited growth of parasites with the EC₅₀ of 10⁻⁵ M

When drug combinations of fluoroquinolones (norfloxacin, ofloxacin or ciprofloxacin) with antimalarial drug (quinine, mefloquine, pyronaridine and artesunate) were studied, quinine showed additive effect with norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin. Mefloquine showed the additive effect in combination with norfloxacin or ciprofloxacin whereas combination of mefloquine and ofloxacin showed synergistic effect. Combination of all fluoroquinolones with pyronaridine and artesunate resulted antagonism.

The effectiveness of fluoroquinolones on topoisomerase II activity was determined from the decatenation of lunetoplast DNA by partially purified topoisomerase II of *P.falciparum*. All fluoroquinolones did not inhibited the decatenation activity of the parasite topoisomerase at 10⁻³ M *In situ* topoisomerase II activity of parasites determined by Tunei technique was also not sensitive to fluoroquinolones.

การใช้ Fluoroquinolone ร่วมกับยากำจัดมาลาเรียในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย

สุนันท์ นครชัย และ พัฒนพงศ์ สนเที่ยง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การศึกษานี้มีผลของ fluoroquinolone ต่อการฆ่าเชื้อมาลาเรีย *P.falciparum* *in vitro* พบว่า fluoroquinolone ฆ่าเชื้อมาลาเรียได้โดยมีค่า EC₅₀=10⁻⁵M

จากการศึกษานี้มีผลของการใช้ fluoroquinolone (norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin) ร่วมกับยากำจัดมาลาเรียในการฆ่าเชื้อพาราเซต ผลที่ได้คือ เมื่อใช้ quinine ร่วมกับ norfloxacin, ofloxacin หรือ ciprofloxacin จะได้ additive effect เมื่อใช้ mefloquine ร่วมกับ norfloxacin หรือ ciprofloxacin จะได้ additive effect แต่ถ้าใช้ mefloquine ร่วมกับ ofloxacin จะได้ synergistic effect เมื่อศึกษานี้มีผลของยากำจัดมาลาเรียชนิดอื่น เช่น pyronaridine หรือ artesunate ร่วมกับ fluoroquinolone จะได้ antagonistic effect

Fluoroquinolone ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียแต่ไม่มีผลต่อ topoisomerase II ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้าง DNA

(ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย)

INDEX KEY WORDS: malaria, antimalarial drugs, fluoroquinolone

ชื่อ-สกุล ผู้รับมอบงานวิจัย จุรีณี เจริญธัญญา

สาขาวิชา:

 นว. น.ศ. นว. ต. อ. ม.ศ. ว.ศ. ศ. เกษตร จักษุ แพทย์ ทรัพยากร-มนุษย์

ที่ตั้งงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

 เกษตร วิศวกรรม

โทร. 245-8863 ต่อ 8302

 วิทยาศาสตร์ อื่นๆROLE OF α -THALASSEMIC ERYTHROCYTES IN INACTIVATING ARTEMISININ.Juree Charontecraboon¹, Sumalee Kamchonwongpaisan², Prapon Wilairat¹ and Yongyuth Yuthavong²¹Department of Biochemistry, faculty of Science, Mahidol university.²National Science and Technology Development Agency.

In vitro studies have demonstrated resistance to artemisinin by *Plasmodium falciparum*-infecting α -thalassemic erythrocytes compared with those infecting normal ones. Higher accumulation of artemisinin in α -thal cells compared with normal ones has been reported to be due to higher binding of drug to Hb H (β_4) in variant cell than HbA. In this report, the other mechanisms that described the resistance were studied. The phenomenon of artemisinin inactivation by α -thalassemic cells was then found. In detail, the α -thalassemic cells were incubated with ¹⁴C-artemisinin and it was demonstrated that the efficiency of outside drug decreased greater than normal red blood cells. Moreover the radioactive artemisinin was inactivated by both α -thalassemic lysate and membrane.

บทบาทของเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียต่อการหมักฤทธิ์ของยาอาร์ทีมิซินิน

จุรีณี เจริญธัญญา¹ สุมาลี กำจางวงศ์ไพศาล² ประพนธ์ วิไลรัตน์¹ และ ยงยุทธ ยุทธวงศ์²¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล²สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

มีรายงานการทดสอบยาอาร์ทีมิซินินในห้องปฏิบัติการพบว่า มีการต่อต้านยารชนิดนี้ในการฆ่าเชื้อมาลาเรียพลาสมาเคียมฟัลซิพารัม สายพันธุ์ที่คัดลอกมาตลอดโรควิน ที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย เมื่อเทียบกับเชื้อชนิดเดียวกันที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงปกติ ซึ่งเหตุผลหนึ่งที่ยังขาดจากการนี้ คือ การที่เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียสามารถสะสมยารชนิดนี้ได้สูงกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ในรายงานนี้ได้แสดงให้เห็นว่า มีการทำลายประสิทธิภาพของยาอาร์ทีมิซินินเมื่ออยู่รวมกันกับเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียได้มากกว่าเม็ดเลือดแดงธรรมดา ซึ่งจะนำมาใช้อธิบาย การที่ยาอาร์ทีมิซินินต่อเจ้าบ้านในห้องปฏิบัติการได้ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของเยื่อหุ้มและไซโตพลาสมของเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียก็มีผลต่อการหมักประสิทธิภาพของยารชนิดนี้ด้วย

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

INDEX KEY WORDS: artemisinin, *Plasmodium falciparum*, α -thalassemic erythrocyte.

ชื่อ-สกุล ผู้รับรางวัลวิจัย ปีที่ รางวัล

 น.บ. น.ส. น.พ. ศ. อ. พ.ศ. พ. อ.

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400

โทร. 2460363-74 ต่อ 6303

สาขาวิชา:

 การแพทย์ วิทยาศาสตร์
 แพทย์ วิทยาศาสตร์-สุขภาพ
 เภสัช วิทยาศาสตร์
 วิทยาศาสตร์ อื่นๆ

SULFATE UPTAKE OF THE ERYTHROCYTES FROM THE PATIENTS WITH AUTOSOMAL RECESSIVE DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS AND SOUTHEAST ASIAN OVALOCYTOSIS

Somkiat Vasuvattakul¹, Pa-thai Yenchitomanus², Prayong Vachvanichsanong³, Pati Thiruwani³, Chareon Kaiwacharachai⁴, Vichai Laosombal⁴, Prida Malee⁴, Prapon Wilaat⁴ and Sumsalee Nimmanit⁴

¹ Renal Unit and ² Medical Molecular Biology Unit, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

³ Department of Pediatric and ⁴ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Songklanakarin University.

⁵ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Two patients with autosomal recessive distal renal tubular acidosis (dRTA) and Southeast Asian ovalocytosis (SAO) were identified and characterized the mutations in AE1 gene. The mutations occurred in exon 4, 11 and 17. The mutation in exon 4 was the homozygous band 3 Memphis (L56E). The mutations in exon 11 and 17 were heterozygous band 3 SAO and G701D respectively; and the linkage analysis with the parents showed that these mutations occurred in different alleles. The SO_4^{2-} uptake of the erythrocytes from the patients were equal to that of the SAO parents, thus the pathogenesis mechanism of dRTA cannot be accounted by the reduced SO_4^{2-} uptake.

การรับซัลเฟตเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคไตชนิดท่อไตกรดแบบด้อยซึ่งพบร่วมกับเซาท์อีสตาเซียนโอวาโลไซโตซิส

สมเกียรติ วสุวัตกุล¹ แพทย์ เภสัชโสมณัส² ประสงค์ เวรวิชิตพงษ์³ ปติ ธีรวานี³ เจริญ เกียรติวิโรจน์⁴ วิชัย เหล่าสมดี⁴ ปรีดา มาลาสิทธิ์⁴ ประพนธ์ วิไลรัตน์⁴ และ สุมาลี นิมนานิต⁴

¹ หน่วยโรคไตและ ² หน่วยอนุชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

³ ภาควิชากุมารศาสตร์และ ⁴ ภาควิชาอายุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

⁵ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน AE1 ในผู้ป่วยโรคไตชนิดท่อไตกรดแบบด้อยซึ่งพบร่วมกับเซาท์อีสตาเซียนโอวาโลไซโตซิสจำนวน 2 รายพบว่ามีการกลายพันธุ์ในเอ็กซอน 4, 11 และ 17 โดยที่การกลายพันธุ์ในเอ็กซอน 4 เป็นแบบ Band 3 Memphis ทั้ง 2 ราย ในขณะที่การกลายพันธุ์ในเอ็กซอน 11 และ 17 เป็นแบบ Band 3 SAO และ G701D ตามลำดับซึ่งสัมพันธ์กับคนละร่างโดยมีพ่อแม่เป็นพาหุพา การที่ผู้ป่วยโรคไตชนิดท่อไตกรดแบบด้อยซึ่งพบร่วมกับเซาท์อีสตาเซียนโอวาโลไซโตซิส ซึ่งแสดงว่าวิธีการวัดการรับซัลเฟตเข้าเซลล์เม็ดเลือดแดงนี้ไม่สามารถวัดปริมาณการเกิดพยาธิสภาพในโรคไตชนิดท่อไตกรดแบบด้อย

INDEX KEY WORDS: distal renal tubular acidosis, Southeast Asian ovalocytosis, SO_4^{2-} uptake

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย นพรัตน์ แซ่ชื่อ

 น.บ. น.ส. น.ว. ค.ร. อ. ศ.ร. ร.ท. ศ.

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อ. พระรามเทว พิญาโร กรุงเทพ 10400 โทร. 246-0063 ext. 6303

สาขาวิชา:

 สาขาแพ ชีวภาพ
 แพทย์ พรีพรี-นวดศาสตร์
 สาขาส วิทยาศาสตร์
 วิทยาศาสตร์ อื่นๆ

MEMBRANE STUDIES OF THALASSEMIC RED CELLS : SULFHYDRYL CONTENT AND K-Cl CO-TRANSPORT

Nopparat Saer¹ and Prapon Wilairat¹¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Hemoglobin Constant Spring (CS) is an abnormal hemoglobin. α^{CS} -Globin results from mutation of the terminal codon (TAA \rightarrow CAA) located on α 2-globin gene. Hemoglobin CS red cells contain α^{CS} -globin bound to membrane and this causes more damage to membrane than in α -thalassemia (hemoglobin H disease). Sulfhydryl content of membrane proteins was studied as an indicator of oxidative damage. The results show sulfhydryl content of spectrin and protein 4.1 in hemoglobin H/CS and hemoglobin H red cell membranes were reduced when compared to a normal control. Another property of hemoglobin H/CS red cells is that they are less dehydrated than in hemoglobin H and β -thalassemic red cells. K-Cl co-transport studies show higher activity in all three cell types.

การศึกษาปริมาณ Sulfhydryl content และ K-Cl co-transport บนผิวของเม็ดเลือดแดงของ คนไข้ธาลัสซีเมีย

นพรัตน์ แซ่ชื่อ¹ และ ประพนธ์ วิลัยรัตน์¹¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงเป็นฮีโมโกลบินที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งหยุด บนอินที่สร้างสายอัลฟา-โกลบิน จากการศึกษาสามารถแยกสายโกลบินของฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงได้จากผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดนี้ ในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณ sulfhydryl ของโปรตีนบนผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินชนิดนี้มีปริมาณลดลง ซึ่งบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบนผนังเซลล์จากสภาวะที่เซลล์ถูก oxidized และได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราขนส่งไปและออกซิเจนระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าอัตราขนส่งไปและออกซิเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเม็ดเลือดแดงคอนสแตนต์สปริง ร่วมกับฮีโมโกลบินเฮกซ์และในฮีโมโกลบินเฮกซ์ และพบอัตราขนส่งสูงสุดในตัว-ธาลัสซีเมียร่วมกับฮีโมโกลบินฮี

INDEX KEY WORDS: Sulfhydryl content / K-Cl cotransport / thalassemic red cell membrane

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย นงลักษณ์ ศรีวิลัยเจริญ

น.บ. น.ส. นาง พ. อ. ผ. ร. ศ. อ. น.

ตำแหน่ง ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพหลโยธิน 6 กรุงเทพมหานคร 10400 โทร. 2460363-74 ต่อ 6303

สาขาวิชา:

สาธารณสุข จักษุวิทยา
 แพทย์ พยาบาล-แม่และเด็ก
 เภสัช โสตศอนาสิก
 วิจัย-ศึกษา อื่นๆ

STUDIES ON TELOMERASE OF THE HUMAN MALARIA PARASITE, *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Nonglak Sriwilaijaron¹, Songsak Petmir² and Prapon Wilairat¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

²Department of Tropical Nutrition and Food Science, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Telomeres are the end of linear eukaryotic chromosomes which necessary for normal cell viability. While normal cell seem gradually to lose telomeric repeats, telomere length is kept constant in germline and immortal cells by expressing telomerase. In this study, we was detectable telomerase activity of *P. falciparum*, isolated from parasitized erythrocyte cells using CHAPS lysis buffer, by using telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay. The parasite telomerase was associated with developmental stage of the malaria parasites, in which trophozoite and schizont extracts were more activity than ring extract. In addition, the activity sensitive to low concentration of ribonuclease (RNase) A, among of four ddNTPs, ddGTP was the most potent parasite telomerase inhibitor *in vitro*. These data suggested the parasite telomerase may be a novel target for malaria therapy.

การศึกษาของเอนไซม์ TELOMERASE ของเชื้อมาลาเรีย *PLASMODIUM FALCIPARUM*

นงลักษณ์ ศรีวิลัยเจริญ¹, พรศักดิ์ เพชรมิตร² และ ประพนธ์ วิลัยรัตน์¹

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

²ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและวิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

Telomere เป็นโครงสร้างที่ปลายโครโมโซมของยูคาริโอตซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ขณะที่ telomere ของเซลล์ปกติสั้นลง แต่ในเซลล์สืบพันธุ์และเซลล์อมตะพบว่ามีความยาวคงที่โดยการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในการศึกษาที่สามารถตรวจพบเอนไซม์ telomerase ของเชื้อ *P. falciparum* (ซึ่งแยกได้จากเม็ดเลือดแดง ที่คลี่เชื้อโดย CHAPS lysis buffer) โดย TRAP assay พบว่าการทำงานของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของเชื้อ โดยระยะ trophozoite และ schizont มี telomerase activity สูงกว่าระยะ ring และนอกจากเอนไซม์นี้จะ sensitive ต่อ RNase A แล้ว พบว่าถูกยับยั้งได้โดย ddNTPs ซึ่ง ddGTP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า parasite telomerase อาจเป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษาโรคมาลาเรีย

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

INDEX KEY WORDS: telomere, telomerase, *Plasmodium falciparum*

ชื่อ-สกุล ผู้รับทุนวิจัย

ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์

สาขาวิชา:

มคอ. ม.ส. มท. มว. อ. มค. มช. ศ.

กายภาพ จักษุวิทยา
 แพทย์ วิทยา-เวชศาสตร์
 เภสัช วิทยาศาสตร์
 วิทยาศาสตร์ ทั่วไป

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

INACTIVATION OF DIHYDROARTEMISININ BY α -THALASSEMIC ERYTHROCYTES

Phantip Wattanaviboon¹, Prapon Wilairat² and Yongsuth Yuthavong³

¹ Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, ² Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, ³ National Science and Technology Development Agency

Relative ineffectiveness of artemisinin and its derivatives against *Plasmodium falciparum* infecting α -thalassemic erythrocytes, both α -thalassaemia1/ α -thalassaemia2 and α -thalassaemia/Hb Constant Spring, was previously reported to be due to higher drug accumulation in these variant erythrocytes as compared with genetically normal erythrocytes. Furthermore, greater drug binding affinity and capacity of hemoglobin H over hemoglobin A accounted to this resistance. In this study, we also found that α -thalassemic erythrocytes accumulated radiolabelled dihydroartemisinin (DHART) higher than β -thalassaemia/hemoglobin E (Hb E) erythrocytes as well as the normal cells. DHART accumulation capacities of normal and α -thalassemic erythrocytes depended on the drug concentration in medium with maximal difference at 1 nM level, which is the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) level of this drug, and the accumulation showed saturation at 100 μ M. Besides drug accumulation and drug-hemoglobin H binding, inactivation of DHART after passing through the α -thalassemic erythrocytes, but not for normal and β -thalassemic/Hb E erythrocytes, was also observed. The IC₅₀ value of DHART in medium increased from 0.7 \pm 0.2 nM before incubating with α -thalassemic erythrocytes to 5.1 \pm 3.0 nM after incubation. There was an evidence indicated that hemoglobin H accounted in the lost of drug activity. Since relative increment of IC₅₀ value of DHART was found to depend on Hb H concentration added in parasite culture. The presence of inactive form of the drug resulted in prolonged exposure of the parasite to sub-optimal concentration of active drug which could lead to the induction of drug resistance in the future.

การที่ยาออกฤทธิ์ไอโซโครอร์ทีมีซิมีนมีผลเป็นพิษต่อเซลล์พาราซิโตซัว

ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์¹ ประพนธ์ วิลัยรัตน์² ยองสุท ยุทธวงศ์³

¹ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ² ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ³ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สาเหตุการที่ออกฤทธิ์ไอโซโครอร์ทีมีซิมีนและอนุพันธ์ไอโซโครอร์ทีมีซินมีพิษต่อเซลล์พาราซิโตซัวในเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติชนิด α -thalassaemia1/ α -thalassaemia2 และ α -thalassaemia/Hb Constant Spring มีรายงานเบื้องต้นว่าเกิดจากการที่เซลล์ชนิดนี้สามารถสะสมยาได้มากกว่าเซลล์ปกติร่วมกับความสามารถในการจับยาของฮีโมโกลบิน เฮก ในการศึกษากลับกันพบว่า เม็ดเลือดแดงของพาราซิโตซัวที่ติดเชื้อสามารถสะสมยาไอโซโครอร์ทีมีซิมีน (อนุพันธ์หนึ่งของออกฤทธิ์ไอโซโครอร์ทีมีซิน) ได้สูงกว่าเม็ดเลือดแดงพาราซิโตซัวที่ติดเชื้อร่วมกับเม็ดเลือดแดงปกติ ความสามารถในการสะสมยาของเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติและออกฤทธิ์ไอโซโครอร์ทีมีซินขึ้นกับความเข้มข้นของยาในเม็ดเลือด โดยความสามารถในการสะสมยาของเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 ชนิดต่างกันมากที่สุดที่ความเข้มข้นของยา 1 นาโนโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับยาที่สามารถฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ 50% (50% inhibitory concentration, IC₅₀) และการสะสมยาเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของยา 100 นาโนโมลาร์ อีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลให้เกิดการเสื่อมฤทธิ์ของยาไอโซโครอร์ทีมีซินในเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติคือ การที่ยาถูกทำลายจนหมดที่เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติ ค่า IC₅₀ ของยาไอโซโครอร์ทีมีซิมีนในเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติที่รวมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติ (0.7 \pm 0.2 นาโนโมลาร์) เพิ่มขึ้นเป็น 5.1 \pm 3.0 นาโนโมลาร์ ซึ่งการพบ ไอโซโครอร์ทีมีซินในเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายออกฤทธิ์ของยาจากการเพิ่มขึ้นของค่า IC₅₀ ขึ้นกับความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน เฮก ที่เติมลงไปในเม็ดเลือดที่ติดเชื้อมาลาเรีย การทำลายยาส่งผลให้ระดับยาที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาเลเรียมีระดับต่ำกว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงอาจทำให้เกิดการเสื่อมฤทธิ์ของยาในอนาพา

INDEX KEY WORDS: dihydroartemisinin, thalassaemia

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย พรพิมณ เมธิ์ภูง

□ นบ □ น.ส. □ นว □ ดร. □ อ. □ ผศ. □ รศ. □ ศ.

ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400 โทร. 2460063 ต่อ 4308

สาขาวิชา

□ กายภาพ □ ชีวภาพ
■ แพทย์ □ ศัลยกรรม
□ เกษตร □ วิทยาศาสตร์
□ วิศวกรรม □ อื่นๆ**POSSIBLE INVOLVEMENT OF TRANSGLUTAMINASE IN THE REDUCTION OF THALASSEMIC ERYTHROCYTE DEFORMABILITY**Pompimon Methienukul, Prapon Witairat and Rutaiwan Tohtong
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Thalassemia is a genetic disease of abnormal globin chain synthesis. In thalassemic red cells, one of the globin chains, alpha (α) or beta (β) chain, is reduced, causing the excess globin chains to bind to the membrane, resulting in various pathophysiological changes. One of the hallmarks of thalassemia is increased rigidity (or reduced deformability) of the red cell membrane, the major cause of its premature destruction by the reticuloendothelial system.

In this report, we suggest that the reduced deformability of the thalassemic red cells is partly due to an increase in transglutaminase activity, an enzyme that covalently cross-links membrane proteins through ϵ (γ -glutamyl) lysine linkage. Using ^{14}C -Putrescine incorporation assay, we showed that transglutaminase activity in the erythrocytes of splenectomized β -thal/HbE patients is significantly enhanced compared to that of normal cells ($p < 0.05$). Interestingly, Western Blot analysis shows that the relative amount of transglutaminase present in thalassemic erythrocyte is reduced ($p < 0.05$), enhancing the enzyme specific activity in these cells, and, thus, our contention of the possible involvement of transglutaminase in regulating the deformability property of the thalassemic erythrocytes.

บทนำของงานวิจัยที่รวมเอกสารมีนสในการควบคุมคุณสมบัติการยึดหยุ่นตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

พรพิมณ เมธิ์ภูง ประพนธ์ วิไลรัตน์ และ รุทัยวรรณ โต๊ะทอง

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากความคิดปกติในการสร้างสายโกลบิน ทำให้สายโกลบินชนิดหนึ่ง (แอลฟา หรือ เบต้า) มีปริมาณลดลง และชนิดที่เกินสามารถไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ก่อให้เกิดพยาธิสภาพในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น คุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เปลี่ยนแปลงไปคือ ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงจะลดลง ซึ่งจะนำไปสู่การแตกทำลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นก่อนหมดอายุขัยโดยมีสาเหตุคือ

ในรายงานฉบับนี้ เราเสนอแนะว่า มีปัจจัยหนึ่งที่อาจเป็นตัวการที่ทำให้ความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียลดลงก็คือ การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมโยงโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้พันธะ ϵ (γ -glutamyl) lysine จากการทดลองโดยใช้ ^{14}C -Putrescine incorporation เราได้แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β -thal/HbE ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค Western Blot เราพบว่าปริมาณเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียชนิดนี้มีปริมาณน้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ค่า specific activity ของเอนไซม์ที่คำนวณได้นี้มีค่าสูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติอย่างเด่นชัด และเป็นการทำงานควบคุมความสำคัญของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในการควบคุมคุณสมบัติการยึดหยุ่นตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง

INDEX KEY WORDS: thalassemia, transglutaminase, deformability, ^{14}C -Putrescine

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

ABSTRACTS

**20th Scientific Meeting of
Pharmacological and Therapeutic
Society of Thailand**

12th – 13th February, 1998

Bangkok

PRELIMINARY STUDY OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES INHIBITION OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* MALARIA

Wirat Nimitsantiwong, Wilai Noopakdee, and Prapon Wilairat*

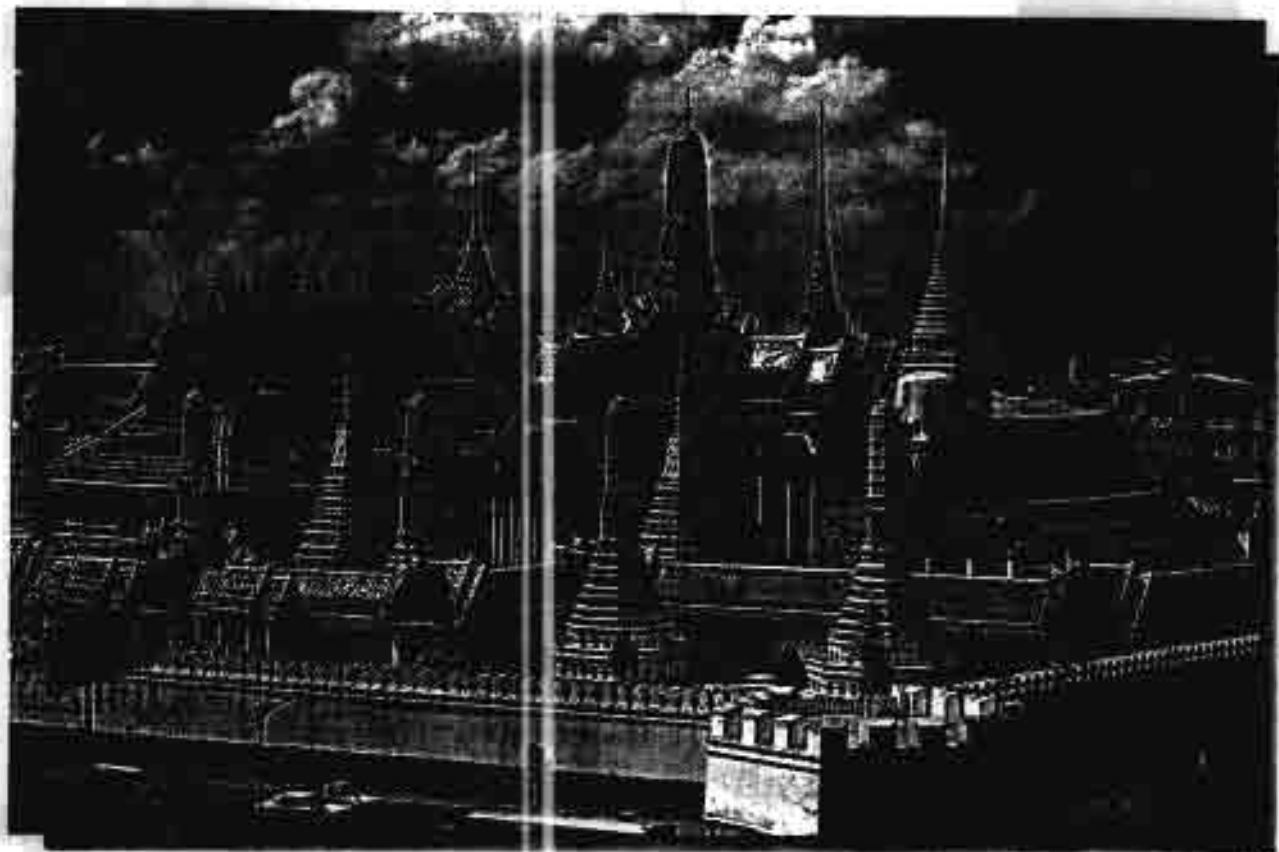
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Street,
Bangkok 10400, Thailand

Currently treatment of malaria caused by infection of *P. falciparum* has been found to be less effective due to ability of parasite to develop resistance to almost all antimalarial drugs. The search for new compounds is needed to control the disease. Use of antisense oligonucleotides to inhibit specific mRNA synthesis and translation of proteins involves in the growth of parasites may represent alternative strategy for developing antimalarial drug. We designed four antisense oligonucleotides against *Plasmodium* topoisomerase II mRNA and their antimalarial activities were tested against *P. falciparum* K1 strain (chloroquine and pyrimethamine-resistant strain) in culture. The parasites were exposed to antisense oligonucleotides over 48 hours and growth was determined by microscopic examination and (³H) hypoxanthine incorporation. Our preliminary results from microscopice examination showed that all ODN at high concentration (10 μM) inhibited growth of parasites in a target independent manner. At low concentration (.01-0.1 μ M) however, two antisense ODNs significantly inhibited growth of parasites compared with a ODN control containing 9 mismatches. Results from hypoxanthine incorporation can not be used directly for the inhibition of the growth of parasites since ODNs stimulated hypoxanthine uptake compared with untreated controls

This work was supported by a grant from Thailand Research Fund granted to Prof. Dr. Prapon Wilairat.



**THE 7th INTERNATIONAL CONFERENCE ON THALASSAEMIA
AND THE HAEMOGLOBINOPATHIES**
THE 9th THALASSAEMIA PARENT AND THALASSAEMICS INTERNATIONAL CONFERENCE



PROGRAM & ABSTRACTS

31 MAY - 4 JUNE 1999
BANGKOK, THAILAND

THALASSEMIC RED CELL MEMBRANE DISORDERS

Prapon Wilairat

*Department of Biochemistry
Faculty Of Science, Mahidol University
Rama 6 Road, Bangkok, Thailand*

Thalassemia is a hereditary anemia caused by mutations in the globin gene complex resulting in an imbalance in globin synthesis. Unmatched globin chains are less stable than Hb A and bind to the cytoplasmic surface of the red cell membrane where they produce oxidative damage, the nature of which depends on the type of membrane-bound partially oxidized globin chains. A case in point is the recent discovery in Hb Constant Spring (CS) red cells of the presence on the membrane of a CS globin in addition to the expected β -globin chains. Oxidation at the red cell membrane is probably the result of free radicals generated by iron, heme or hemichromes which can affect both lipid and protein components.

Cation imbalance in thalassemic red cells can be attributed to oxidative damage to red cell membrane ion transport. K-Cl cotransport and Na-Li countertransport activities are increased but Na-K-Cl cotransport is reduced. Na-K pump is increased in severe α thalassemia and in β -thalassemia cells. Surprisingly plasma membrane Ca-ATPase activity is increased in thalassemic red cells, and it may be uncoupled from cation transport.

Disruption to the asymmetric organization of phospholipids in the red cell membrane bilayer allowing phosphatidylserine to be exposed on the outer surface provides an explanation for enhanced erythrophagocytosis and for the thrombotic episodes and cardiopulmonary anomalies frequently observed in β -thalassemic patients. A slower rate of phospholipid translocation across the bilayer has been suggested as also contributing to this phenomenon.

Severity of β -thalassemia is attributed to instability of unmatched α globin chains which cannot form homotetramers unlike the situation of excess β -globin chains in a thalassemia which combine to produce Hb H. Laser confocal microscopy has revealed abnormal assembly of membrane proteins in erythroid progenitors of patients with β -thalassemia major which would likely contribute to intramedullary lysis. It is not clear to what extent cell death is the result of apoptosis or phagocytosis of the abnormal erythroid precursor cells.

Thalassemic patients are not only anemic but are constantly subjected to oxidative stress. Levels of the lipid antioxidant vitamin E are low but can be raised with oral supplementation which can ameliorate lipid damage to red cells, but probably not that of the proteins.

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund)

ANALYSIS OF mRNA IN β -THALASSEMIA/Hb E BY REAL TIME PCR DETECTION

Yuwadee Watanapokasin¹, Pranee Winichagoon², Suthat Fucharoen³, Prapon Wilairat³
¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, ²Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, ³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) has been widely used to quantitate different types of mRNA. However, the method still requires post-PCR manipulation which is labor- and time-intensive. Therefore, in this study, real time RT-PCR has been conducted to quantitate the α/β globin mRNA in β -thalassemia/Hb E patients as compare to normal control. Since patients with β -thalassemia/Hb E show remarkable variability in severity, thus, the α/β mRNA was determined. The result is shown in figure 1 supporting that the imbalanced protein synthesis in β -thalassemia reflects both impairment of reduced β -globin chain mRNA and translation.

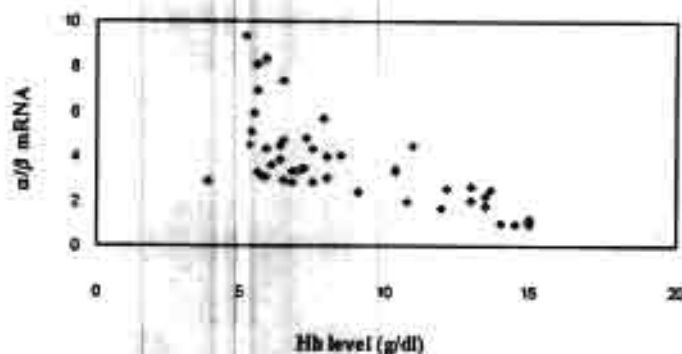


Fig.1 Comparison of Hb levels and α/β mRNA in β -thalassemia/Hb E patients compared to normal controls

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund.)

GENOTYPE-PHENOTYPE INTERACTION IN β -THALASSEMIA : EXPERIENCE IN THAILAND

*P. Winichagoon, Y. Watanapokasin, P. Wilairat, Ping Chen, Gui-fang Long,
N. Siritanaratkul, P. Wasi, S. Fucharoen*

*Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Department
of Biochemistry, Faculty of Science and Department of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University,*

*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand and Hemoglobin
Laboratory, Department of Pediatric, Guangxi University of Medical Sciences, Nanning, P.R. China*

Beta thalassemia is a very heterogeneous disorder due to variations in inactivation mechanism of the β -globin genes. Point mutations and small deletions or insertions in the nucleotide sequence are the main molecular defects responsible for most β -thalassemia. Homozygous β -thalassemia and β -thalassemia/Hb E are major β -thalassemic syndromes in S.E. Asia. In spite of seemingly identical genotypes, severity of β -thalassemic patients can vary greatly. Heterogeneity in the clinical manifestation of β -thalassemic diseases may occur from the nature of β -globin gene mutation, α -thalassemia gene interaction and difference in the amount of Hb F production which is partly associated with a specific β -globin haplotype.

A total of 144 β -thalassemia patients, 116 Thai and 28 Chinese from Nanning, were divided into mild, intermediate and severe cases according to clinical data and hemoglobin concentration. Clinical data included the age onset of presentation, age at first blood transfusion, requirement of blood transfusion, hepatosplenomegaly and growth development. Using these criteria 46 patients who had Hb \geq 7.5 g/dl had a mild clinical symptom: 8 were $\beta^+\beta^+$ -thalassemia or β^+ -thalassemia/Hb E and 38 patients were $\beta^0\beta^+$ -thalassemia or β^0 -thalassemia/Hb E, 17 of whom also had coinheritance of α -thalassemia genes. Of the 43 patients with severe clinical symptom, 26 were $\beta^0\beta^0$ -thalassemia, 5 $\beta^0\beta^+$ -thalassemia and 12 β^0 -thalassemia/HbE. Coinheritance of α -thalassemia was found in 8 cases of $\beta^0\beta^0$ -thalassemia but it did not ameliorate the severity of the disease (Table 1).

Table 1. Summary of genetic factors that may determine the severity of β -thalassemia disease

Clinical symptom Genetic Factors	Homozygous β -thalassemia			β -Thalassemia/Hb E		
	Mild	Intermedia	Severe	Mild	Intermedia	Severe
Total subjects (No.)	16	11	31	30	44	12
β^+ -Thal/ β^+ -thal (Hb E)	4	0	0	4	0	0
β^0 -Thal/ β^+ -thal (Hb E)	12	4	5	26	44	12
β^0 -Thal/ β^0 -thal	0	7	26	0	0	0
α -Thal 1 trait	3	2	2	0	1	0
α -Thal 2/ α -thal 2	1	0	1	0	0	0
α -Thal 2 trait	2	2	3	8	0	0
Hb Constant Spring (CS)	0	1	0	4	2	0
Xmn I, --	11	7	26	2	8	4
Xmn I, ++	0	0	0	1	1	0
Xmn I, +-	4	4	5	25	32	8

BINDING AND INACTIVATION OF DIHYDROARTEMISININ BY α -THALASSEMIC ERYTHROCYTES

*Yongyuth Yuthavong*¹, *Juree Charoenteeraboon*², *Prapon Wilairat*²,
*Phantip Vatanaviboon*³ and *Sumalee Kamchonwongpaisan*¹

1. National Science and Technology Development Agency, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand
2. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand
3. Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Thailand

Plasmodium falciparum infecting α -thalassaemic erythrocytes (Hb H or Hb H/Hb Constant Spring) is resistant to artemisinin derivatives. Similar resistance, albeit at a much lower level, is shown by the parasite infecting β -thalassaemia/Hb E erythrocytes. The resistance is due to host-specific factors, one of which is the higher uptake of the drugs by the thalassaemic erythrocytes than normal. α -Thalassaemic erythrocytes retain accumulated dihydroartemisinin after extensive washing, in contrast to normal erythrocytes which release most of the drug. Hb H accounts for a significant portion of bound drug. Binding experiments showed that it has 5-7 times the drug-binding capacity of Hb A. In addition to higher drug binding, incubation of dihydroartemisinin with α -thalassaemic erythrocytes resulted in preferential inactivation of the drug. Incubation with either the hemolysate or membrane fraction from these erythrocytes to the culture medium also resulted in preferential inactivation of the drug. It is concluded that the ineffectiveness of dihydroartemisinin against *P. falciparum* infecting the thalassaemic erythrocytes is partly due to competition of the host cell components, particularly Hb H, for binding with the drug, and partly due to inactivation of the drug by the cell components.

(PW is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund)

HYPOXEMIA IN THALASSEMIA

Suthat Fucharoen¹, Pranee Winichagoon¹, Udom Chantaraksri², Prapon Wilairat³, Ahnond Bunyaratvej⁴, Praparn Yongchaiyud⁵, Nisarot Oparthiattikul⁶, Dhira Sonakul⁷, Kleophant Thakerngpol⁷, Yoshinori Funahara⁸ and Prawase Wasi⁵

¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, ^{2,3}Department of Pharmacology and Biochemistry, Faculty of Science, ⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, ⁵⁻⁷Department of Medicine, Clinical Pathology and Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand; ⁸First Department of Physiology, Kober University School of Medicine, Kobe, Japan

Hypoxemia in thalassemia is a very unique syndrome. It was first observed in a 16 years old splenectomized β -thalassemia/Hb E patient in 1977. A series of studies were carried out in order to understand the mechanism of hypoxemia on top of chronic anemia in thalassemia. The results can be summarized as follows :

1. Hypoxemia is observed mainly among β -thalassemia cases, especially after splenectomy. It is more common in severe cases with rather low hemoglobin levels. The syndrome may occur in both male and female, after splenectomy without any definite period.
2. Clinically, patients with hypoxemia are easily tired especially up on exertion. Peripheral cyanosis and clubbing fingers are observed in some cases with chronic hypoxemia. About half of these patients have clinical evidence of pulmonary hypertension with changes in chest x-ray and electrocardiogram suggesting right heart strain.
3. Pulmonary function test reveals restrictive, obstructive and combined defects. Hypoxemia in thalassemia, thus, may occur from ventilation/perfusion mismatch and a diffusion defect.
4. Abnormal platelet function is observed in almost all thalassemia patients. There are both hypo- and hyper-aggregated platelets in patients' blood. Abnormal hyper-functional platelets are more obvious among splenectomized cases. Platelet dysfunction in thalassemia results from many abnormalities including cellular (red cell) and soluble factors in the plasma.
5. The levels of protein C and protein S, an important vitamin K dependent coagulating protein, is markedly decreased in splenectomized thalassemia cases, but there is neither evidence of vitamin K deficiency nor other abnormal production of proteins. Marked reduction of γ -carboxylated protein C may result from its binding with the negatively charged phosphatidylserine on the thalassemic red cell outer membrane surface.

INVESTIGATIONS INTO THE PATHOGENIC MECHANISMS RESPONSIBLE FOR THE INCREASED SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS IN THALASSEMIC PATIENTS

Prapat Suriyaphol¹, Prida Malasit¹, Prapon Wilairat², Suthat Fucharoen³, Sucharit Bhakdi⁴

¹Medical Molecular Biology Unit, Office of Research & Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

³Haematology Unit, Department of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok

⁴Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Mainz University, Germany

It has long been observed that thalassemic patients, particularly those who have been splenectomized, are more susceptible to repeated infections and showed abnormalities in the platelet and coagulation functions. Wide spectrum of infectious agents including bacteria, viruses and fungi has been found in severe cases of thalassemia. Acquired complement deficiency has been reported and might be one of the important factors for increased susceptibility to infection. Platelet microthrombi are also found in pulmonary vasculatures of severe patients. However, no clear explanation has been offered for the mechanisms leading to hypocomplementemia, abnormal platelets, and coagulation system in thalassemia.

The primary defect in thalassemia is the reduction of globin chain synthesis, which leads to the abnormalities of RBCs. Many biochemical and structural defects are found in thalassemic RBCs, including depletion of cytoplasmic ATP, oxidative damage to the membrane and complement activation on the surfaces. It is known that RBC with such defects will shed parts of their membranes in the form of small vesicles.

Our investigations centered on the search for mechanisms that lead to the defects listed above, in particular whether red cell vesicles exist *in vivo*. We have successfully shown that red cell vesicles were indeed present in the patients' plasma with highest amount in splenectomized β thalassemia/HbE patients, followed by non-splenectomized β -thalassemia/HbE and non-splenectomized α -thalassemia. The vesicles were spherical or oval in shape, with an average diameter of 0.3 μ m. They were devoid of spectrin, a major erythrocytic cytoskeletal protein, and exposed phosphatidylserine on their surface. Shortened clotting time was found when thalassemic vesicles were incubated with recalcified plasma, indicating that the vesicles possess procoagulant activity. The vesicles could efficiently activate the complement system via the alternative pathway.

These findings are unique and significant, they serve as linkages between the defective hemoglobin synthesis, red cell perturbation and a group of clinical complications found in thalassemia. The fact that significant amounts of red cell vesicles has been found to be constantly generated *in vivo*, and the vesicles are functionally active in complement activation, and consumption of coagulation factors suggests that they represent important factors responsible for the complications described. Mechanisms leading to the generation of vesiculation remain to be elucidated and the understanding of the pathophysiology of this phenomenon could lead to new approaches in the treatments of patients with thalassemia.

ABSTRACTS

**2nd Asia – Pacific International
Molecular Biology Network Conference**

25th – 28th July, 1999

Singapore

RENAL TUBULAR ACIDOSIS, AE1 MUTATIONS, MALARIA: A UNIFYING HYPOTHESIS

Prapon Wilairat, Peti Thuwajit

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama 6 Road, Bangkok 10400.

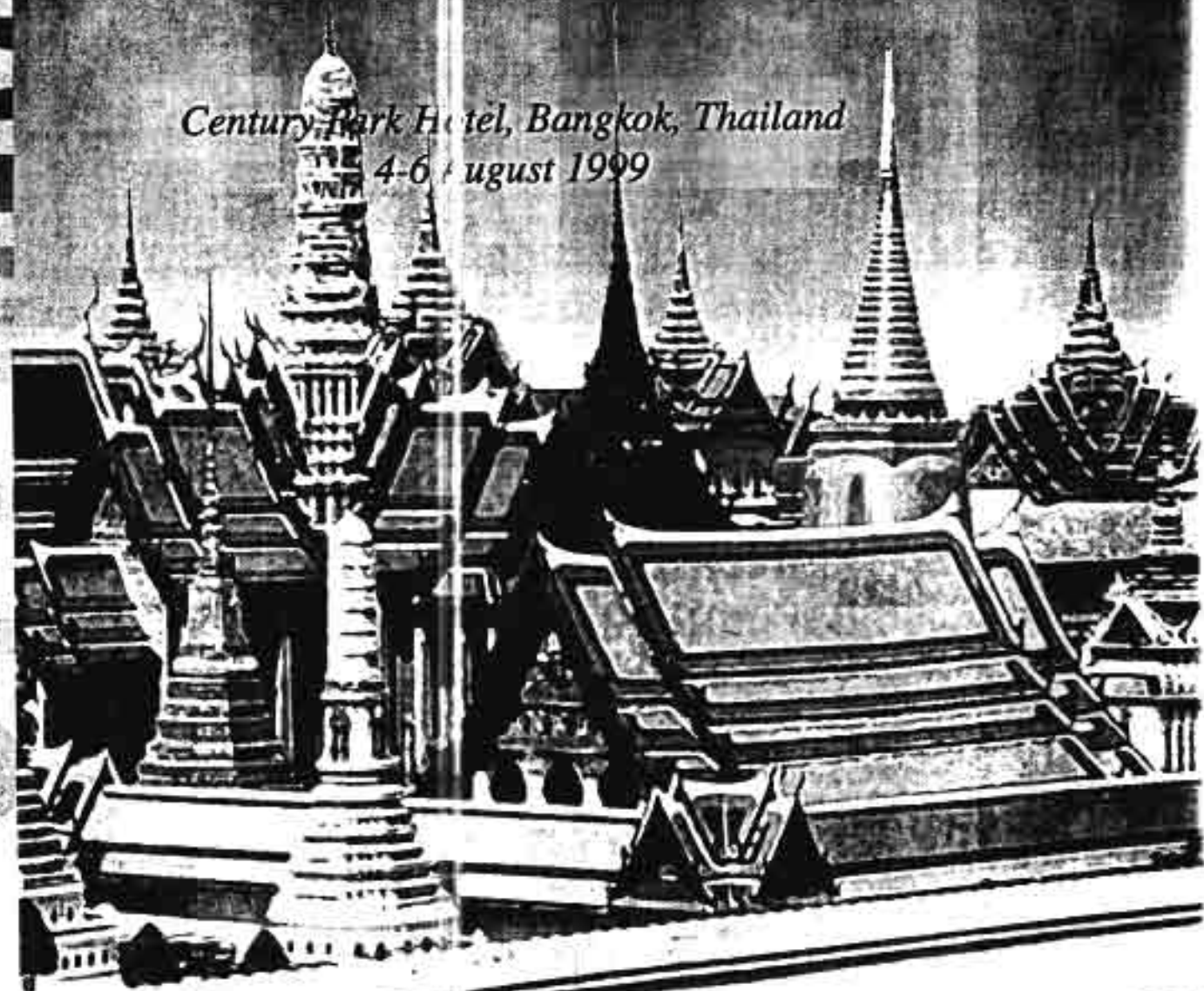
The kidney maintains acid-base homeostasis by reclaiming all filtered bicarbonate and excreting acid sufficient in amount to that produced by systemic metabolism. The acid secretion occurs in the distal nephron, mediate largely by type A intercalated cells (IC) of the cortical and outer medullary collecting ducts. Inherited defects in this urinary acid secretion process is known as primary distal renal tubular acidosis (dRTA), and is manifested by inappropriate alkaline urine in the presence of systemic metabolic acidosis or in response to an imposed acid loading test. Primary dRTA can be inherited by both autosomal dominant and recessive patterns. Autosomal dominant dRTA has previously been shown to be associated with mutations in the AE1 anion exchanger gene (Karet FE et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 6337-42). This gene encodes for both the erythroid (eAE1) and the kidney (kAE1) isoforms of band 3 protein (Tanner MJA. Mol Membrane Biol 1997; 14: 155-63). Kidney AE1 exchanges bicarbonate for chloride across the basolateral membrane of the type A IC during urinary acidification, which requires proton to be transported across the apical membrane. More recently, AE1 mutations linked to a recessive syndrome of dRTA in two Thai siblings have been identified (Tanphaichitr VS et al. J Clin Invest 1998; 102: 2173-9). We have now identified recessive inheritance of AE1 mutations in dRTA associated with Southeast Asian ovalocytosis (SAO) in three unrelated Thai families. SAO individuals have abnormal shaped red cells and are heterozygous for a band 3 deletion. These incidences of autosomal inheritance of dRTA suggest that carriers for AE1 mutations (other than SAO) may be polymorphic in the Thai population. We hypothesize that these carriers for AE1 mutations have a selective advantage by being protected against malaria, possibly by reduction of cytoadherence of *P. falciparum*-infected red cells to capillary vessels and thereby are less likely to have fatal cerebral malaria.

PW is a Senior Research Scholar of The Thailand Research Fund.



Joint International Tropical Medicine Meeting 1999

*Century Park Hotel, Bangkok, Thailand
4-6 August 1999*



SCIENCE

COMBINATION OF PYRONARIDINE AND STANDARD ANTIMALARIALS AGAINST *P. FALCIPARUM* IN VITRO

S Nakornchai, P Konthiang, P Wilairat

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Pyronaridine (9-substituted-1-aza-acridine) is a new antimalarial compound synthesized in China. Pyronaridine is structurally related to quinacrine; its side chain resembles that of amodiaquine. The combination of pyronaridine with pyrimethamine and sulfadoxine has been used for the treatment of chloroquine resistant falciparum malaria.

Pyronaridine was assayed for *in vitro* antimalarial activity against chloroquine resistant *P. falciparum* by measuring ³H-hypoxanthine incorporation into the parasites. Pyronaridine inhibited the growth of parasites with the EC₅₀ of 4x10⁻⁸ M. The ring stage was more sensitive to pyronaridine than trophozoites and schizonts.

When drug combinations of pyronaridine with currently available antimalarial drugs were studied, pyronaridine showed an antagonistic effect with dihydrofolate reductase inhibitor, pyrimethamine or cycloguanil. Drug combination of pyronaridine and tetracycline or fluoroquinolones also showed an antagonistic effect. Combination of pyronaridine with quinine, or with mefloquine or with artesunate showed an additive effect.

This work was supported by Thailand Research Fund

STAGE SPECIFICITY OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* TELOMERASE AND ITS INHIBITION BY BERBERINE

N. Sriwilaijeon¹, A. Mutirangura², M. Ponglikitmongkol¹, S. Petmitr³,
P. Wilairat¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Tropical Nutrition and Food Science, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Telomerase, a ribonucleoprotein, maintains chromosome telomere length during the cell cycle, permitting cells to continue to divide indefinitely. We have examined telomerase activity in asynchronized and synchronized *Plasmodium falciparum* during its erythrocytic cycle using TRAP assay. Telomerase activity was detected at all stages of the parasite intraerythrocyte development, with an increase in activity in the late stages (trophozoite and schizont) compared with early stage (ring), indicating that there was a correlation between expression of telomerase and erythrocytic cycle regulation. We have investigated the inhibition of this enzyme by berberine extracted from *Arcangelisia flava* (L.) Merr. Berberine inhibited *P. falciparum* telomerase in a dose-dependent manner over a concentration range of 15-370 μ M. In addition, we have also examined the effect of berberine on parasite growth using [³H]-hypoxanthine incorporation method obtaining an IC₅₀ value of 2.4 μ M. These data indicate that *P. falciparum* telomerase is a potential target for future malaria chemotherapy.

Supported by the National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science, Technology and Environment, Thailand. P. Wilairat is a Senior Research Scholar of The Thailand Research Fund.

ABSTRACTS

**9th Congress of The International
Society of Haematology Asian-Pacific
Division**

**24th – 28th October, 1999
Central Plaza Convention Hall
Bangkok**

THE THALASSEMIC RED CELL MEMBRANE

Prapon Wilairat

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand.

Globin imbalance in thalassemia results in the binding of unmatched globin chains to red cell membrane where they cause oxidative damage. The results of such insults depend on the nature of the membrane-bound globin species, Hb H (β_4) in the case of α -thalassemia and unpaired α -globin chains in β -thalassemia. Both types of thalassemic red cells are more rigid than normal cells, but under high shear stress β -thalassemic red cells undergo fragmentation whereas those from α -thalassemic subjects are more stable. Red cells containing the elongated α -globin variant, Hb Constant Spring (CS), have α^{CS} and HbH bound to their membranes, accounting for the pathology observed in HbH/CS and homozygous HbCS individuals, but such red cells have rheological properties more akin to α - than β -thalassemia.

Oxidation of the thalassemic red cell membrane lipid and protein components probably results from free radicals generated by iron, heme or hemechromes resulting in elevation of membrane malonyldialdehyde, reduction of vitamin E and loss of protein sulfhydryl contents. Oxidative damage to membrane ion transporters accounts for cation imbalance seen in thalassemic red cells. There is disruption to the asymmetric organization of phospholipids in the membrane bilayer allowing phosphatidylserine to be exposed on the outer surface. Vesiculation of thalassemic red cells have been observed both *in vitro* and *in vivo*. In erythroid progenitors of patients with β -thalassemia major laser confocal microscopy has revealed abnormal assembly of membrane proteins.

The recognition that thalassemic patients are not only anemic but are constantly subjected to oxidative stress suggests that appropriate antioxidant intervention may be warranted.

PW is a Senior Research Scholar of The Thailand Research Fund.

ABSTRACTS

**The 25th Congress on Science
and Technology of Thailand**

20th – 22nd October, 1999

Amarin Lagoon Hotel

Pitsanuloke

ชื่อ-สกุล ผู้สมัครงานวิจัย กฤษณี ชูเจริญ

สาขาวิชา:

มาน น.ส. นาง ดร. อ. ผศ. รศ. ศ.

การแพทย์ ชีวภาพ
 นิเทศ สรีรวิทยา-เภสัชวิทยา
 เกษตร วิทยาศาสตร์
 วิศวกรรมศาสตร์ อื่นๆ

ที่ทำงาน ศพวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อ.พชรบม 6 พญาไท กรุงเทพฯ 10400

โทร. 2460063 ต่อ 6303

STUDIES ON THE EFFECT OF 3,6- DIAMINO-ANILINOACRIDINES ON HEME POLYMERIZATION

Kritchai Pooncharoon, Saranya Auparakkitanon and Prapon Wilairat
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Over 100 million people every year contract malaria resulting in more than 1 million deaths. Control of the most virulent forms of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, has been hampered by the ability of the parasite to develop resistance to nearly all of the currently used antimalarial drugs. We have shown that analogs of 3,6-diamino-9-anilinoacridine inhibit *Plasmodium falciparum* growth in culture. We have now studied the effects of these drugs on heme polymerization *in vitro* by incubating drugs with heme (0.4 mM) and inducing heme polymerization under acid condition. The quantity of heme polymer was determined by dissolving the heme pellet in DMSO. IC₅₀ values (concentration to inhibit heme polymerization by 50 %) were measured using chloroquine as control (IC₅₀ = 2.5 × 10⁻⁴ M). Four analogs of 3,6-diamino-9-anilinoacridines with different substituent at C1'- position of anilino branch (NMe₂, OMe, CH₂NMe₂, NHSO₂Me) were tested and only C1'-NMe₂ analog was able to inhibit heme polymerization (IC₅₀ = 7.7 × 10⁻⁴ M).

การศึกษาประสิทธิภาพของยาในกลุ่ม 3, 6 -diamino-anilinoacridines ที่มีผลต่อขบวนการ heme polymerization

กฤษณี ชูเจริญ, สรณญา อูปารักคิตานนท์ และ ประพนธ์ วิลัยรัตน์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้คนมากกว่า 100 ล้านคนติดเชื้อมาลาเรียและส่งผลให้เกิดการเสียชีวิตมากกว่า 1 ล้านคน ในทุก ๆ ปี การควบคุมการแพร่กระจายของปรสิตมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ถูกขัดขวางโดยปัญหาการดื้อยาของ *P. falciparum* ผลการศึกษานี้พบว่าอนุพันธ์ของยาในกลุ่ม 3, 6 -diamino-9-anilinoacridines สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ในจานเพาะเชื้อ และเราได้ศึกษาผลของยาในกลุ่มนี้ที่มีต่อขบวนการ heme polymerization ในหลอดทดลองโดยใส่ยาพร้อมกับ heme (0.4 mM) แล้วชักนำให้เกิดขบวนการ polymerization ในสภาวะกรด เราพบปริมาณ heme polymer ที่เกิดขึ้นโดยใส่ยาทดลองใน DMSO เราได้วัดค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเกิด heme polymer ได้ 50%) โดยใช้ Chloroquine เป็น positive control (IC₅₀ = 2.5 × 10⁻⁴ M) เราได้ทำการทดลองกับยา 4 ชนิดในกลุ่มนี้ที่มีแทนที่ 3,6- diamino substituent เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ C1'- position ของแขนง anilino (NMe₂, OMe, CH₂NMe₂, NHSO₂Me) และพบว่าเพียง 1 ชนิดที่สามารถยับยั้งขบวนการ heme polymerization คือ C1'- NMe₂ โดยมี IC₅₀ เท่ากับ 7.7 × 10⁻⁴ M

INDEX KEY WORDS: malaria, 3,6- diamino-anilinoacridines, heme polymerization

This work was supported by Thailand Research Fund.

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย **พรพิมล เมธีบุญกุล**

สาขาวิชา:

น.บ. น.ส. น.ท. พ.ร. อ. ศ.ก. พ.ศ. ศ.

อักษรศาสตร์ จีวิทยา

แพทย์ กวีศิลป์-นาฏศิลป์

ที่ทำงาน **ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล**

เกษตร วิศวกรรมศาสตร์

ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400 โทร. 2480063 ต่อ 4308

วิทยาศาสตร์ ทั่วไป

Analysis of spectrin phosphorylation in thalassemic red cell membrane
Porppimon Methuenukul, Prapon Wilairat and Rutaiwan Tohtong
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Thalassemia is a genetic disease of abnormal globin chain synthesis, which results in an imbalanced globin chains accumulation. The excess globin chains bind to the red cell membrane, causing increased rigidity (or reduced deformability) of the red cell membrane, which leads to premature destruction of the red cells by the reticuloendothelial system.

We determined whether spectrin phosphorylation contributes to the reduced deformability, and thus, the premature destruction of the red cells in thalassemic patients by Western analysis of ghost proteins using anti-phosphoserine, anti-phosphothreonine and anti-phosphotyrosine antibodies. We found that the levels of phosphoserine and phosphothreonine in β -spectrin of the thalassemic red cells were not significantly different from that of the normal red cells, suggesting that phosphorylation of these residues is not involved in regulating deformability. However, we cannot exclude the possibility that phosphorylation at serine(s) and threonine(s) plays a role but we failed to detect the change.

We also reported the presence of tyrosine phosphorylation in β -spectrin after vanadate treatment. Phosphotyrosine in β -spectrin of β -thalassemia/Hb E (non-splenectomized) patients was significantly higher than that of normal control ($p < 0.05$), implying an increased phosphatidylserine exposure and increased rate of destruction of thalassemic red cells by macrophage attack.

การวิเคราะห์ระดับของหมู่ฟอสเฟตที่เติมโปรตีน ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย
พรพิมล เมธีบุญกุล ประพนธ์ วิลัยรัตน์ และ รุทัยวัน โตตอง
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดความผิดปกติในการสร้างสายโกลบิน ทำให้สายโกลบินชนิดหนึ่ง (แอลฟา หรือ เบตา) มีปริมาณลดลง และชนิดที่เกินสามารถไปจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดพยาธิสภาพในเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้น คุณสมบัตินี้สำคัญอย่างหนึ่งที่เป็นต้นเหตุให้เกิดความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะนำไปสู่การแตกทำลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นก่อนเวลาอายุขัยโดยกำเนิด

เราได้ทำการศึกษาว่า การเติมหมู่ฟอสเฟตที่เติมโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นสาเหตุที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือไม่ โดยทำการวิเคราะห์ระดับของหมู่ฟอสเฟตที่เติมโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียเปรียบเทียบกับตัวอย่างปกติ โดยเทคนิค Western Blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ phosphoserine, phosphothreonine และ phosphotyrosine เราพบว่า ระดับของหมู่ฟอสเฟตที่เติมโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียที่ serine และ threonine ไม่แตกต่างไปจากที่ได้จากเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของปกติ อย่างไรก็ตาม เราไม่สามารถสรุปได้ว่า การเติมหมู่ฟอสเฟตที่เติมโปรตีนไม่ได้มีบทบาทต่ออัตราใด ต่อการควบคุมเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์แดง เนื่องจากเรามีข้อจำกัดทางเทคนิคซึ่งอาจทำให้ตรวจสอบไม่ได้

นอกจากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ serine และ threonine ของเบตาสเปคตินแล้ว เรายังพบว่า มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ของเบตาสเปคตินในเม็ดเลือดแดงที่เติม vanadate โดยเราพบว่า ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β -thal/HbE ที่ยังไม่ได้ตัดม้ามมีระดับการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ของเบตาสเปคตินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และระดับการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิด phosphatidylserine exposure และทำให้เกิดการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงก่อนเวลาอันควร

INDEX KEY WORDS: thalassemia, spectrin, phosphorylation

This work was supported by Thailand Research Fund.



The First Science & Technology Annual Meeting

November 30 - December 1, 1999

Organized by the Institute of Science and Technology for
Research and Development & the Institute of Molecular Biology
and Genetics, Mahidol University, Salaya Campus

Ovalocytosis and Distal Renal Tubular Acidosis: The Malaria Connection

*Prapon Wilairat¹, Peti Thuwajit¹,
Somkiat Vasuvattakul², Pa-thai Yenchitsomanus³,
Prayong Vachuanichsanong⁴, Charoen
Kaitwatcharachai⁴, Vichai Laosombat⁴,
Prida Malasit¹, Sumalee Nimmannit²*

*¹Department of Biochemistry, Faculty of
Science, ²Renal Division, Faculty of
Medicine Siriraj Hospital, ³Medical Molecular
Biology Unit, Faculty of Medicine Siriraj
Hospital, Mahidol University,
⁴Songklanakar Hospital, Prince of
Songkla University*

The kidney maintains acid-base homeostasis by reclaiming all filtered bicarbonate and excreting acid sufficient in amount to that produced by systemic metabolism. This acid secretion occurs in the distal nephron, mediated largely by type A intercalated cells (IC) of the cortical and outer medullary collecting ducts. Inherited defects in this urinary acid secretion process is known as primary distal renal tubular acidosis (dRTA), and is manifested by inappropriate alkaline urine in the presence of systemic metabolic acidosis or in response to an imposed acid loading test.

Primary dRTA can be inherited in both autosomal dominant and recessive patterns. Autosomal dominant dRTA has previously been shown to be associated with mutations in the AE1 anion exchanger gene (Karet FE et al. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 6337-42). This gene encodes for

both the erythroid (eAE1) and the kidney (kAE1) isoforms of band 3 protein (Tanner MJA. Mol Membrane Biol 1997; 14: 155-65). Kidney AE1 exchanges bicarbonate for chloride across the basolateral membrane of the type A IC during urinary acidification, which requires proton to be transported across the apical membrane. More recently, *AE1* mutations linked to a recessive syndrome of dRTA in two Thai siblings have been identified (Tanphaichitr VS et al. J Clin Invest 1998; 102: 2173-9).

We have now identified recessive inheritance of *AE1* mutations in dRTA associated with Southeast Asian ovalocytosis (SAO) in three unrelated Thai families. SAO individuals have abnormal shaped red cells and are heterozygous for a band 3 deletion. Affected individuals in two families were compound heterozygotes for SAO and G701D, and in the other family for SAO and R602H. Sulfate uptake of dRTA red cells from probands in the former two families did not differ from those of SAO heterozygotes (about half of normal controls) but in the latter family sulfate uptake of proband was half of that of SAO red cells. These incidences of autosomal recessive inheritance of dRTA suggest that carriers for *AE1* mutations (other than SAO) must be polymorphic in the Thai population. It is hypothesized that these carriers for *AE1* mutations have a selective advantage by being protected against malaria, possibly by reduction of cytoadherence of *P. falciparum*-infected red cells to capillary vessels, and thereby are less likely to have fatal cerebral malaria.

(PW and PM are Senior Research Scholars of The Thailand Research Fund.)



**The Fourth
Princess Chulabhorn International Science Congress
Chemicals in the 21st Century**

28 November - 2 December, 1999 Bangkok, Thailand

**organized by
Chulabhorn Research Institute**

Program - Abstracts

ENHANCED DETECTION OF MUTAGENS WITH NOVEL CLONED MUTATOR BACTERIAL GENES

Emmanuel E. Obaseiki-Ebon, Department of Pharmaceutical Microbiology
National Institute for Pharmaceutical Research and Development,
Idu, Abuja, Nigeria

BamHI fragment of plasmids pEB017 (DNA kbp 65) and pEB018 (kbp 58) were respectively cloned into plasmid vector pBR322 and transformed into *Escherichia coli* AB 1157 wild type; *recA56* and *umuC36* strains; *E. coli* WP₂ *trp* and *E. coli* WP₂ *uvrA trp* and the *Salmonella typhimurium his* TA1535, TA1537 and TA1538 respectively. The cloned plasmid fragments conferred enhanced resistance to UV-radiation in *E. coli* AB 1157 *recA* and wild-type strains, slight enhanced UV-radiation mutability in *E. coli* AB1157 *umuC36* and remarkable enhanced chemical mutagenesis in *E. coli* WP₂ *trp*, *E. coli* WP₂ *uvrA trp* and the *Salmonella typhimurium his* TA1535, TA1537 and TA1537 and TA1538 strains. The cloned *recA*-like gene DNA fragment from pEB081 could only confer a slight enhanced mutability in *umuC36* strain compared to the high level mutability induced by the whole plasmid pEB081. Comparatively, the cloned *recA*-like genes from pEB081 and pEB017 were superior to pKM101 (Ames' mutagenicity test mutator plasmid) in the detection of chemical mutagenesis in *E. coli* tester strains. In *Salmonella typhimurium* tester strains, the cloned *recA*-like gene from pEB081 was superior to the cloned *recA*-like gene from pEB017 and the pKM101. These results indicated that the plasmids pEB017 and pEB081 have unusual *recA*-like genes with the unique properties of eliciting enhanced DNA repair and mutability independent of host cell *recA* gene.

ERYTHROCYTE MEMBRANE CA²⁺-ATPASE AS A BIOLOGICAL MODEL FOR THE DETECTION OF FREE RADICAL-INDUCED DAMAGE.

Udompun Khansuwan¹, Nampuang Pengpad² and Prapon Wilairat². ¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

The effects of several free radical-producing compounds (phenazine methosulfate, tert-butyl hydroperoxide, phenylhydrazine and xanthine/xanthine oxidase) on the Ca²⁺-ATPase activity of the human erythrocyte membrane were studied in both the intact cells and in calmodulin-deficient membrane preparations. ATPase activity was determined by a pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupled enzyme method. Arrhenius profile (log activity versus reciprocal of absolute temperature) and Ca²⁺- and calmodulin-dependence of the Ca²⁺-ATPase was investigated. In the presence of calmodulin, 10 μM free Ca²⁺ stimulated ATPase activity 2.5 fold. After exposure of intact erythrocytes and membrane preparations to the oxidants, ATPase activity in the absence of free Ca²⁺ was increased whereas stimulation by calmodulin was decreased. The changes were dose dependent and at maximal oxidation conditions, ATPase activity without Ca²⁺ was not different from that in the presence of Ca²⁺ and calmodulin. These results indicated that free radicals caused the loss of both Ca²⁺- and calmodulin-dependent properties of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. However, treatment with diamide, a sulfhydryl oxidising agent, inhibited Ca²⁺-ATPase activity and its stimulation by calmodulin and this effect was reversed upon treatment with dithiothreitol. This study indicated that Ca²⁺-ATPase of human erythrocyte plasma membrane can be used as a biological system for detecting oxidative damage. The system can be applied to studies of the protective effects of antioxidants as well.

PW is a Senior Research Scholar of The Thailand Research Fund.



การประชุมวิชาการสรีรวิทยา ครั้งที่ 29

MEMBRANE TRANSPORT in HEALTH and DISEASE

จัดโดย

สรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย

ร่วมกับ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

วันที่ 10-12 พฤษภาคม 2543

ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก

Dithi Chungcharoen Lecture:

**"Distal renal tubular acidosis, anion exchanger 1
(AE 1) mutation, Southeast Asian Ovalocytosis:
a malaria connection?"**

Prof. Dr. Prapon Wilairat

Distal renal tubular acidosis, anion exchanger 1 (AE1) mutations, Southeast Asian ovalocytosis: a malaria connection?

Prapon Wilairat

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama 6 Road, Bangkok 10400

Renal tubular acidosis (RTA) is a generic name for a heterogeneous group of nonuremic disorders in which there is a hyperchloremic metabolic acidosis with a normal value in the anion gap in plasma (anion gap is defined as the difference between plasma cations and anions) and a reduced rate of net acid secretion (1). The cause can be both renal and extrarenal. In the latter case, this may result from administration of HCl-generating compounds (viz. ammonium chloride, lysine, arginine) or from loss of bicarbonate resulting from diarrhea or bowel ileus.

Depending on the location of the defect, RTA can be classified as being proximal (pRTA) or distal (dRTA). In pRTA, the defect resides in proximal tubule and results in excessive bicarbonate loss in the urine but urinary acidification is normal. The defect has been attributed to reduced bicarbonate reabsorption, and in some cases, pRTA has been found to be associated with familial carbonic anhydrase II deficiency (2). On the other hand, dRTA results in abnormal urinary acidification and produces clinical manifestation. Patients cannot lower urine pH below 5.5, and present chronic acidosis. Adults with dRTA have metabolic acidosis and hypokalemia; in children, there is stunted growth due to rickets. Hospital visits are often triggered by paralysis of all extremities.

Distal renal tubular acidosis is highly prevalent in Northeast Thailand and has been given the name endemic dRTA (3). In a survey of five villages around Khon Kaen, out of a population of 3013 who were examined for urine citrate concentration and their ability to lower urine pH under acid loading condition, 2.8% were unable to acidify their urine and 0.8% had serum potassium level below the lower limit of normal range. A large number of villagers (33.4%) showed low urine citrate levels and there was a high prevalence of renal stone.

The etiology of endemic dRTA in Northeast Thailand remains an enigma (4). Suggested possible environmental insults include low dietary potassium intake and high vanadium in soil which correlates with elevated urine vanadium in patients when compared with controls in the same region.

Familial dRTA inherited in an autosomal dominant form has been reported in a number of Caucasian families (5). It is associated with a defect in the anion exchanger (AE1) of the distal renal collecting duct intercalated cell type A (ICA). This transporter is a product of the same gene (*AE1*) as the erythrocyte anion exchanger, band 3, but is NH₂-terminally truncated due to loss of exons 1-3 of the erythroid band 3 due to initiation of transcription from a promoter region within intron 3 of *AE1* gene. In ICA the transporter is located at the basolateral membrane (see Figure 1) and exchanges chloride from plasma with intracellular bicarbonate which remains following the transport of proton into the tubular lumen by the apical H⁺-ATPase pump. Protons are produced by the hydration of carbon

INTERCALATED CELL TYPE A

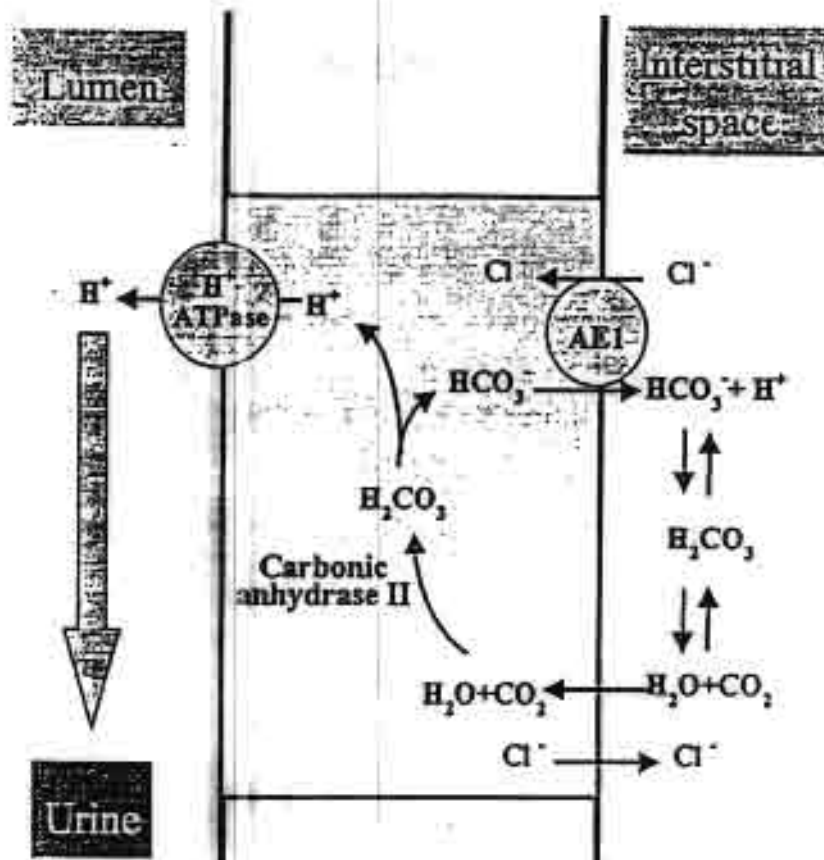


Figure 1. Role of anion exchanger 1 (AE1) in acid secretion by the renal intercalated cell type A.

dioxide by carbonic anhydrase II. Chloride brought into ICA by kidney AE1 leaves the cell through chloride-selective channels.

Studies of genomic DNA from families with dominant form of dRTA have shown, both by genetic linkage studies and by DNA sequencing, that affected individuals are heterozygous for mutations in *AE1* gene (see Table) whilst unaffected members of the family have normal band 3 sequence. However functional studies of band 3 in red cells (sulfate uptake measurements) of affected subjects indicated only slight decrease in activity (80% of control) in those with mutations in R589, and an increase of about 2.5 times in red cells from subjects with mutation S613F. Expression of both the erythroid and kidney isoforms of the mutant AE1 proteins in *Xenopus laevis* oocytes have shown that they retain chloride transport activity. It is suggested that the disease in the dRTA families results from the misdirection of mutant AE1 to the apical membrane of ICA in which case bicarbonate efflux into the lumen would neutralize protons pumped by the apical H⁺-ATPase so that there is no net transfer of protons.

Table AE1 Mutations Associated With Familial Distal Renal Acidosis

Mutation	Reference
<u>Dominant Form</u>	
R589H	(5)
R589C	(5)
R589S	(5)
S613F	(5)
<u>Recessive Form</u>	
R602H	(12)
G701D	(13)

Autosomal recessive form of dRTA has been seen in association with familial elliptocytosis (6,7) and in a subject with Southeast Asian ovalocytosis (SAO) (8). SAO is a hereditary anemia that is widespread in parts of Southeast Asia and Melanesia. The abnormal shaped red cell results from a truncated erythroid band 3 (deletion of nine amino acids in exon 11) which affects its interaction with the membrane cytoskeleton (9). Sequencing of the SAO *AE1* gene revealed the presence of two linked mutations: deletion of codons 400 to 408 and a point mutation in the first position of codon 56 (K56E), the Memphis I polymorphism (10). Red cells from SAO individuals (who are

always heterozygotes as the homozygous state is believed to be lethal) have only half of the sulfate uptake activity of normals indicating that SAO band 3 lacks activity.

As endemic dRTA is seen in children in Northeast Thailand, we considered whether there may not be a familial form of dRTA present as well. The mode of inheritance would be autosomal recessive. Although a strong candidate for study is *AE1*, there was no *a priori* evidence that this gene was affected among the endemic dRTA population of Northeast Thailand. However as SAO is prevalent in South Thailand and dRTA has previously been reported to be associated with this syndrome (8), we postulated that SAO individuals with familial dRTA would have mutations in the other *AE1* allele, and that this mutant allele would be inherited in an autosomal recessive mode.

From about 30 individuals with SAO, three families (KS, SS, YA) were identified with at least one SAO member who had been diagnosed with early onset of dRTA (see Figures 2-4 for pedigree). From these probands and family members genomic DNA were obtained for mutation analysis and red cells for sulfate uptake measurements. Exons 4-20 of *AE1* gene were analyzed for sequence mutations using single-stranded conformational polymorphism (SSCP) followed by sequencing of the mutant exon and confirmation of the identified mutation by restriction enzyme digestion of the amplified DNA fragment. The presence of SAO mutation and Memphis I polymorphism were verified by detecting the 27 base pair deletion in exon 11 and sequencing exon 4 of *AE1* gene, respectively.

Probands KS3 and YA3 were compound heterozygotes for SAO and G701D (Figure 2 and 4) (11). KS3 inherited the SAO allele from his father and the G701D allele from the mother; the mother of YA3 was heterozygous for SAO and the father heterozygous for G701D. However proband SS2 presented a different mutation (R602H) in *trans* to SAO (Figure 3) (12). Presumably this R602H mutation was inherited from the father whose DNA was not available for study. Interestingly proband's sister SS4 with the same compound heterozygosity in *AE1* was diagnosed as having incomplete dRTA (no clinical manifestation but with inability to acidify urine under acid loading test) indicating that there may be other factors that can ameliorate the clinical outcome of dRTA. Studies of red blood cell sulfate uptake from probands and family members showed that G701D mutations had no effect on transport activity whereas that of R602H was reduced by about one half.

If these mutant *AE1* proteins have normal transport activity (or if reduced, has not adversely affected red cell function), the mutations cannot account for disease in the kidney. However, two Thai siblings with dRTA and hemolytic anemia have earlier been shown to be homozygous for G701D in *AE1* gene and having normal red blood cell anion transport (13). Expression of both the erythroid and kidney isoforms of the mutant *AE1* gene in *Xenopus laevis* oocytes showed the mutant proteins are unable to be expressed at the oocyte plasma membrane unless the red blood cell membrane protein glycophorin A (gpA) is also co-expressed. Kidney ICA cells lack gpA and this accounts for the renal pathology. A similar phenomenon presumably takes place in the kidney of SAO subjects with co-inheritance of G701D mutation. It is not clear whether this also is the case with R602H *AE1* protein. Both mutations, H602 and D701, are located on the cytoplasmic side of the transmembrane *AE1*.

KS1 (28 yr)

Mutation: SAO/-

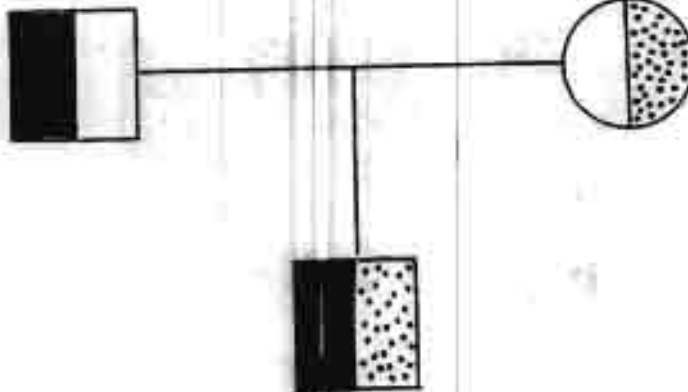
SO_4^{2-} uptake = SAO

RBC = SAO

KS2 (28 yr)

Mutation: -/G701D

SO_4^{2-} uptake = 73% normal



KS3 (5 yr) dRTA onset 1 1/12 yr

Mutation: SAO/G701D

SO_4^{2-} uptake = SAO

Figure 2

Pedigree of Family KS

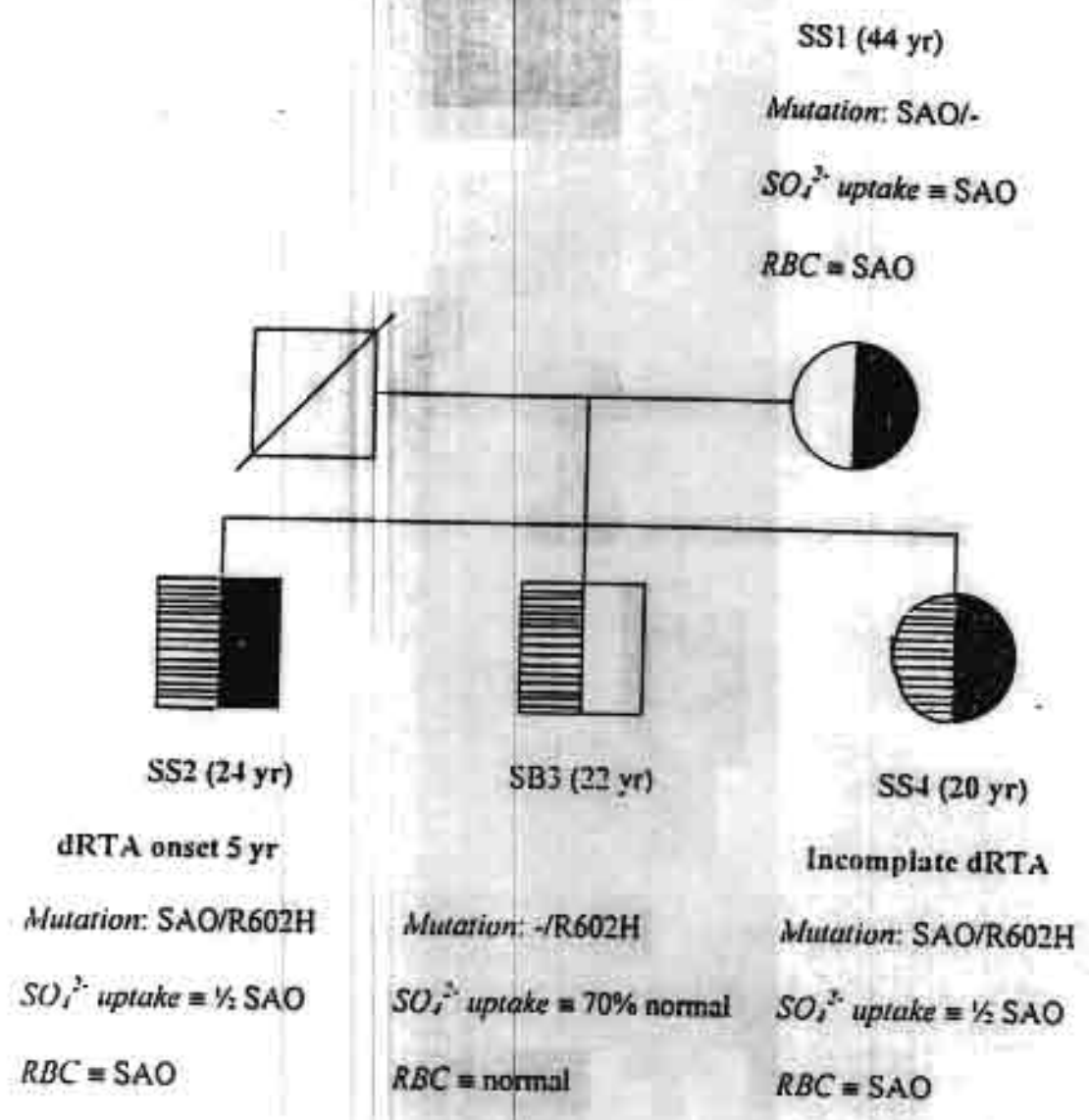
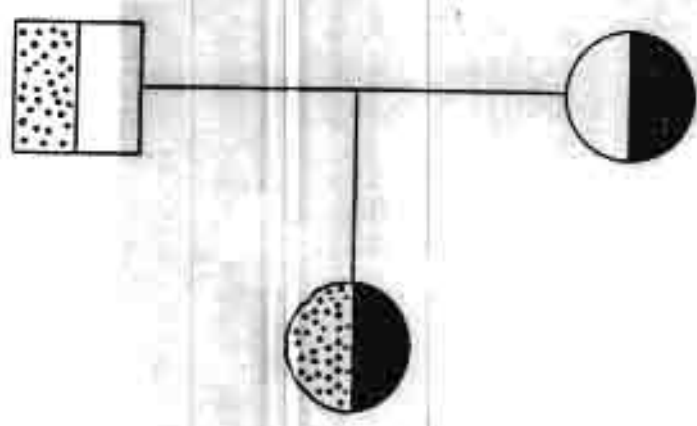


Figure 3 Pedigree of Family SS

YA1 (32 yr)
Mutation: -/G701D
 SO_4^{2-} uptake = 72% normal

YA2 (29 yr)
Mutation: SAO/-
 SO_4^{2-} uptake = SAO
RBC = SAO



YA3 (5 yr) dRTA onset 2 yr
Mutation: SAO/G701D
 SO_4^{2-} uptake = SAO

Figure 4 Pedigree of Family YA

The presence of 3 families with AE1 mutations from random screening of 30 Thai SAO individuals suggests that AE1 mutants, other than SAO, is polymorphic in South Thailand. Among 21 Malay subjects with dRTA, including 3 pairs of siblings, SAO was detected in 16 patients (14). Polymorphism of SAO in Southeast Asian and Melanesian populations has been ascribed to the protection SAO provides against malaria. Cerebral malaria is not found in Papua New Guinea among SAO children (15). The mechanism proposed is that the deletion in band 3 perturbs its interaction with the red cell membrane cytoskeleton which alters the formation of cytoadherence sites on the malaria-infected red cell surface and thereby compromises its attachment to the endothelial surface of brain capillaries. A similar mechanism may be acting to select other AE1 mutants which have properties similar to SAO band 3. In a malaria endemic area, homozygosity or compound heterozygosity of these AE1 mutants will thus manifest in familial dRTA.

Acknowledgments

The studies described would not have been possible without the unstinting assistance of the following colleagues: Peti Thuwajit (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University); Pa-thai Yenchitsomanus and Prida Malasit (Medical Molecular Biology Unit, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University); Somkiat Vasuvattakul and Sumalee Nimmannit (Renal Unit, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University); Prayong Vachuanichsanong, Charoen Kaitwatcharachai and Vichai Laosombat (Songklanakarin Hospital, Prince of Songkla University). PW and PM are Senior Research Scholars of The Thailand Research Fund.

References

1. Halperin, M.L., Carlisle, E.J.F., Donnelly, S., Kamel, K.S., Vasuvattakul, S. (1994). Renal tubular acidosis. In: Narins, R.G., ed. *Maxwell and Cleeman's Clinical Disorder of Fluid and Electrolyte Metabolism*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; p 875-910.
2. Asplin, J.R., Coe, F.L. (1994). Hereditary tubular disorders. In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., ed. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 14th ed, v 2. New York: McGraw-Hill, Inc; p 1562-1569.
3. Nimmannit, S., Malasit, P., Susaengrat, W., Ong-Aj-Yooth, S., Vasuvattakul, S., Pidetcha, P., Shayakul, C. (1996). Prevalence of endemic distal renal tubular acidosis and renal stone in the Northeast of Thailand. *Nephron* 72: 604-610.
4. Tosukhowong, P., Tungsanga, K., Eiam-Ong, S., Sitprija, V. (1999). Environmental distal renal tubular acidosis in Thailand: an enigma. *Am. J. Kidney Dis.* 33: 1180-1186.
5. Karet, F.E., Gainza, F.J., Gyory, A.Z., Unwin, R.J., Wrong, O., Tanner, M.J.A., Nayir, A., Alpay, H., Santos, F., Hulton, S.A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Cunningham, M.J., Di Pietro, A., Walker, W.G., Lifton, R.P. (1998). Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene *AE1* cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 5: 6337-6342.

Thai population. It is hypothesized that these carriers for *AEI* mutations have a selective advantage by being protected against malaria, possibly by reduction of cytoadherence of *P. falciparum*-infected red cells to capillary vessels, and thereby are less likely to have fatal cerebral malaria.

