แบบฟอร์มบทคัดย่อ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ คุณลักษณะและการเป็นโปรตีนเส้นใยของ transthyretin variants ที่ตรวจพบในคนไทย

Characteristics and fibrillation of transthyretin variants detected in Thai people

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2555 จำนวนเงิน 130,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย……1……ปี

ตั้งแต่ มกราคม พ.ศ. 2555 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2555

ชื่อ-สกุลผู้วิจัยพร้อมสถาบันการศึกษา โทรศัพท์และอีเมลล์ติดต่อ

นางสาวสุพรรณี ชูเอียด ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทรศัพท์ 074-288246

โทรสาร 074-446656 มือถือ**082-2674576

E-mail: honey_nongmaa@hotmail.com

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

TTR เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หลักในการขนส่งฮอร์โมนไธรอยด์และวิตามินเอในกระแสเลือดของมนุษย์ โดยมีแหล่งสร้างที่สำคัญคือ ตับและ choroids plexus ในสมอง TTR เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถก่อเกิดเป็น amyloid ได้ โดย TTR ที่เกิดมิวเตชั่น (mutation) เป็นสาเหตุหลักของโรค Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) และ cardiomyopathy (FAC) จากการศึกษาพบมิวเตชั่นของ TTR เกิดขึ้นมากกว่า 100 ตำแหน่ง และมีมากถึง 80 ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับโรค FAP โดยเมื่อไม่นานนี้ ได้มีการค้บพบ TTR ชนิด Val122Asp (V122D) ซึ่งเป็นมิวเตชั่นชนิดใหม่ในผู้ป่วยคนไทย เนื่องจากความถี่และลักษณะทางคลีนิคของโรคมีความผันแปรในหมู่ประชากร ความเข้าใจในคุณลักษณะของ TTR จึงมีความสำคัญทางคลีนิค งานวิจัยวิทยานิพนธ์นี้ ได้ทำการสังเคราะห์ cDNA ของ V122D และ TTR ที่เกิดมิวเตชั่นอีก 2 ชนิด คือ Val30Met (V30M) และ Leu55Pro (L55P) โดยวิธีการ site-directed mutagenesis จากแม่แบบ (template) ชนิด wild type TTR แล้วเชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pPIC3.5 โปรตีนรีคอมบิแนนท์ (recombinant protein) ดังกล่าวถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยระบบการสังเคราะห์ของ *Pichia pastoris* ผลการทดลองปรากฏว่ายีสต์สามารถสังเคราะห์และหลั่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกสู่อาหารเลี้ยงภายนอกเซลล์ได้ และโปรตีนเหล่านี้ถูกแยกให้

บริสุทธิ์จากโปรตีนชนิดอื่นได้ โดยผ่านการแยกเพียงขั้นตอนเดียวโดยเทคนิค preparative native-PAGE ซึ่ง TTR ทุกชนิดที่ทำการสังเคราะห์มีคุณสมบัติเคมีกายภาพเช่นเดียวกับ TTR ในธรรมชาติ กล่าวคือมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าภายใต้สภาพธรรมชาติเร็วกว่าอัลบูมินในพลาสมาของคน แสดงให้เห็นการพับทบของโครงสร้างที่สมบูรณ์ น้ำหนักหน่วยย่อยของ V122D, V30M และ L55P ที่ได้จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE มีค่าเท่ากับ 16.9, 15.9 และ 15.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์โดยใช้ ThT พบว่า V122D สามารถเกิดเป็นโปรตีนเส้นใย (fibril) ได้เร็วกว่า wild type TTR และ L55P แต่เกิดได้ช้ากว่า V30M โดยอัตราการเกิดเป็น fibrils ของ wild type TTR, V30M, L55P และ V122D เท่ากับ 9.9%, 38.6%, 8.4% และ 10.8% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการเกิดเป็น fibril ของ wild type TTR พบว่า V122D, V30M และ L55P เกิดได้เป็น 1.2, 4.3 และ 0.9 เท่า ตามลำดับ การที่ V122D เกิดเป็น fibrils ได้ดีกว่า L55P แต่น้อยกว่า V30M ชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างโปรตีนของ V122D มีความเสถียรต่อสภาวะที่เป็นกรดน้อยกว่า L55P แต่มากกว่า V30M เนื่องจากมีรายงานระบุว่า TTR ขณะเป็น protofibrils มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าขณะเป็นก้อน fibrils ดังนั้นการที่ V122D เกิดเป็นก้อน fibrils ได้น้อยย่อมชี้ได้ว่า V122D มีแนวโน้มที่จะเป็นพิษต่อเซลล์สูง อย่างไรก็ตาม ยังจำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานนี้

จากการศึกษาคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) ของ V122D โดยใช้เคซีนที่เชื่อมต่อกับ fluorescence isothiocyanate (casein-FITC) เป็นสับสเตรท และเปรียบเทียบผลที่ได้กับ TTR ชนิดอื่น พบว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาโดย V30M, L55P, V122D และ human native TTR มีค่าเท่ากับ 0.97, 0.51, 0.40 และ 0.26 นาโนโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ความว่องไวจำเพาะ (specific activity) สำหรับ V122D มีค่าเท่ากับ 8038.67 นาโนโมลาร์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่ V30M, L55P และ wild type TTR มีค่าดังกล่าวเท่ากับ 3887.81, 2936.10 และ 1024.56 นาโนโมลาร์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เนื่องจากเป็นที่เชื่อกันว่า binding site ที่ TTR ใช้ในการจับกับ apoA-I อยู่บริเวณปลายทางด้านคาร์บอกซิลและลำดับกรดอะมิโน HXHXE ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกับ apoA-I นั้น พบอยู่ ณ ตำแหน่ง 88 ถึง 90 บนสายโพลีเปปไทด์ของ TTR ดังนั้นมิวเตชั่นที่เกิด ณ ตำแหน่ง 122 ซึ่งพบใน V122D นั้น จึงน่าจะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ TTR ได้มากกว่ามิวเตชั่นที่เกิด ณ ตำแหน่างอื่น เช่น ที่ตำแหน่ง 30 (ใน V30M) และ ตำแหน่ง 55 (ใน L55P) เป็นต้น

TTR is one of the three major thyroid hormone (TH) distributors and a vitamin A transporter in bloodstream of human. It is mainly synthesized in liver and choroids plexus of the brain. TTR is one of the precursor proteins those are known to form amyloid fibril. Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) and cardiomyopathy (FAC) are the systematic amyloidoses that have mutated TTR as major cause. Up to date, more than 100 point mutations of TTR have been identified and up to 80 were revealed associate with FAP. A novel mutated TTR, Val122Asp (V122D) was recently identified in a Thai patient. Since frequency and clinical manifestations of the disease are varied among populations. Insight into TTR characteristics is clinically importance. In this thesis, cDNA of V122D and that of another two variants, Val30Met (V30M) and Leu55Pro (L55P) were constructed from wild type TTR cDNA template by site-directed mutagenesis, and ligated into pPIC3.5 expression vector. The recombinant proteins were synthesized by using the heterologous gene expression system of *Pichia pastoris*. The result showed that all recombinant TTRs were successfully synthesized and extracellularly secreted into the yeast culture medium. They were efficiently isolated from other proteins in the culture supernatant with a single step by preparative native-PAGE. All of these TTRs had similar physicochemical properties to native TTR. Their electrophoretic mobilities in polyacrylamide under non-denaturing condition were faster than albumin in human plasma indicating to a proper structural folding of the TTRs. The subunit masses determined by SDS-PAGE were 16.9 kDa, 15.9 kDa and 15.5 kDa for V122D, V30M and L55P, respectively. Based on ThT assay, V122D formed fibril faster than human wild type TTR and L55P, but slower than V30M. Percentages of the fibril forming were 9.9, 38.6, 8.4 and 10.8 for human wild type TTR, V30M, L55P, and V122D, respectively. In addition, the relative fibril formation compared to human wild type TTR were 1.2, 4.3, and 0.9 folds for V122D, V30M and L55P, respectively. These indicated that the protein structure of V122D was slightly more sensitive to the acidic condition than L55P, but less sensitive than V30M as it formed fibril better that L55P but less than V30M. Since, TTR protofibril was reported more toxic to cells than the mature fibril. Less prefer to form fibril of V122D possibly indicates to its highly toxic potency, however, additional experiments must be carried out to prove our hypothesis. The proteolytic activity of V122D was examined using fluorescein isothiocyanate linked casein (casein-FITC) as substrate, and compared to other TTRs. The catalytic activities of V30M, L55P, V122D and human native TTR were 0.97, 0.51, 0.40 and

0.26 nM/min, respectively. However, the specific activity of V122D was 8038.67 nM/min/mg protein, whereas, those of V30M, L55P, and wild type TTR were 3887.81, 2936.10 and 1024.56 nM/min/mg protein, respectively. Since, the TTR binding site for apoA-I was believed locate at its C-terminal region and the HXHXE sequence which involved in the binding locate at position 88 to 90 on TTR polypeptide chain. The mutation of TTR polypeptide at position 122 (in V122D) was, thus, affected to the catalytic activity of TTR than the mutation at other positions such as position 30.