

## บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่: BRG5180006

ชื่อโครงการ: การศึกษาโปรตีนที่ใช้ในไมโทคอนเดรียที่ถอดรหัสจากยีนนิวเคลียสในผู้ป่วยโรคไม

โทคอนเดรีย Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)

หัวหน้าโครงการ: ศ. พญ. พัชรีย์ เลิศฤทธิ์ วิทยานุกูล

Email address: patcharee.ler@mahidol.ac.th

ระยะเวลาดำเนินงาน: 3 ปี

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) เป็นโรคไมโทคอนเดรียที่พบบ่อยที่สุดโรคหนึ่ง มีสาเหตุทำให้ตาบอด ซึ่งจะแสดงอาการเด่นชัดในวัยรุ่นชาย แม้ว่ามีการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียตำแหน่งที่ 11778G>A, 14484T>C หรือ 3460G>A เป็นสิ่งจำเป็นแรกที่จะก่อให้เกิดโรค แต่ไม่สามารถบอกถึงการแสดงออกของโรคได้ แม้ว่าการกลายพันธุ์นี้จะมีมาตั้งแต่เกิด และสิ่งเหล่านี้ก็ไม่สามารถบอกถึงการแสดงออกของโรค LHON ได้เช่นกัน เช่น เพศชาย, การถ่ายทอดพันธุกรรมแบบไม่สมบูรณ์, ช่วงอายุของการเกิดโรค จากสิ่งเหล่านี้ นำไปสู่ความสนใจในนิวเคลียสว่าเป็นตัวที่ทำให้เกิดการแสดงออกของโรคได้หรือไม่ เพื่อตรวจสอบว่ายีนในนิวเคลียสตัวไหนที่สังเคราะห์โปรตีนในไมโทคอนเดรีย และที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาของโรค LHON และเพื่อพิสูจน์ว่ายีนในนิวเคลียสมีผลต่อการกลายพันธุ์ของโรค LHON ในการทดลองนี้จะศึกษาโปรตีนในไมโทคอนเดรียจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคนแสดงอาการของโรค LHON (affected) (n = 7), คนที่ไม่แสดงอาการของโรค LHON (unaffected) (n = 3) และคนปกติ (control) (n = 5) โดยทำการวิเคราะห์ด้วย 2-DE และ MS / MS เพื่อจำแนกโปรตีน จากการทดลองพบโปรตีน 29 ชนิดที่มีความแตกต่างกันในคนที่มียีนไมโทคอนเดรียผิดปกติ 11778G>A (affected) และกลุ่มคนปกติ (control) โปรตีน 4 ชนิด ถูกเลือกมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค western blot เพื่อยืนยันผลการทดลอง โปรตีน 29 ชนิดที่ได้มาจาก 2-DE มี 20 ชนิดที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่แสดงอาการของโรค (affected) และกลุ่มคนปกติ (control) ในขณะที่มีโปรตีน 23 ชนิดที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มียีนผิดปกติแต่ไม่แสดงอาการ (unaffected) และกลุ่มคนปกติ (control) มีโปรตีน 7 ชนิดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่มียีนผิดปกติและแสดงอาการ (affected) และกลุ่มที่มียีนผิดปกติแต่ไม่แสดงอาการ (unaffected) โปรตีนส่วนใหญ่ที่ได้จากการศึกษาจะอยู่ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะถูกรวบรวมจากการกลายพันธุ์ 11778G>A โปรตีนเหล่านี้พบใน หน่วยย่อยของ OXPHOS, intermediary metabolism, nucleoid related proteins, chaperones, cristae remodeling และเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ เป็นที่น่าสนใจว่า กลุ่มที่มียีนผิดปกติและแสดงอาการ (affected) และกลุ่มที่มียีนผิดปกติแต่ไม่แสดงอาการ (unaffected) มีโปรตีนที่คล้ายกันต่อการตอบสนองของการกลายพันธุ์ 11778G>A ยกเว้นบางโปรตีนที่พบระหว่างกลุ่มที่มียีน

ผิดปกติและแสดงอาการ (affected) และกลุ่มคนปกติ (control) หรือ กลุ่มที่ไม่มีผิดปกติแต่ไม่แสดงอาการ (unaffected) และกลุ่มคนปกติ (control) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนจะพบโปรตีน 2 แบบ คือ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวพลังงาน และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการพับของโปรตีนอื่น เพื่อยืนยันผลการศึกษาที่ได้นี้จะต้องนำมาวิเคราะห์การทำงาน และการรวมกลุ่มกันของโปรตีนต่อไป สิ่งสำคัญที่พบในการศึกษานี้ คือ โปรตีนที่อยู่ในเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของโรค LHON จะลดลง ซึ่งทำให้มีผลกระทบต่อการหายใจโดยใช้ออกซิเจน และระบบการควบคุมคุณภาพของโปรตีน สภาวะเหล่านี้ไม่เหมาะสมกับเซลล์ที่ต้องการใช้พลังงานมาก อย่างเช่น เซลล์ประสาทตา

## Abstract

Project Code: BRG5180006

Project Title: Proteomic study of imported nuclear proteins into mitochondria in the patients with mitochondrial disease: Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)

Investigator: Prof. Patcharee Lertrit, M.D. Ph.D.

Email address: patcharee.ler@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is one of the commonest mitochondrial diseases causing total blindness, affecting predominantly in young male. Though either of the primary mitochondrial DNA mutation 11778G>A, 14484T>C or 3460G>A is essential to develop the disease, it cannot explain the characteristic features of LHON such as male preference, incomplete penetrance, relatively later age of onset, though mutation is present since birth. This calls for attention to nuclear genes as modifiers in disease expression. In order to explore the nuclear encoded mitochondrial proteins which influence the development of LHON and to identify the nuclear response to the LHON mutation, a proteomic approach was used to decipher the mitochondrial proteins from fibroblasts of affected LHON (n=7), unaffected LHON (n=3) and the control (n=5). 2-DE followed by MS/MS analysis identified 29 proteins which were differentially expressed between the 11778G>A LHON mutant fibroblasts and those of the controls. The proteomic data were successfully validated by western blot analysis of 4 selected proteins. Out of 29 proteins identified by 2-DE proteomics, 20 different proteins were significantly different between the affected and the control groups while 23 proteins were different between the unaffected and the controls. Comparison between the affected and the unaffected groups revealed 7 different proteins which were significantly different. Most of the proteins identified in the study were from the mitochondrial proteins and they were down regulated in 11778G>A mutant fibroblasts. These proteins were from the subunits of OXPHOS, intermediary metabolism, nucleoid related proteins, chaperones, cristae remodeling and an anti-oxidant enzyme. Interestingly, the proteomic profiles of the affected and unaffected LHON shared many proteins, revealing the similar proteomic response to 11778G>A mutation, except some proteins which

were particularly observed in the comparisons between the affected and the control or in the unaffected and the control. Protein-protein interaction analysis of identified proteins showed two broad categories: those related with bioenergetic pathway and those related with protein folding. This result is further supported by functional annotation and clustering analysis. The important findings of the present proteomic study are that the proteomic changes in the cells with LHON mutation were mostly down regulation, and that the aerobic respiration and the protein quality control system of the mitochondria are critically affected, the conditions that would be incompatible with the higher energy demanding cells such as the retinal ganglion cells.