

# โครงการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาปริญญาโท

## 1. ชื่อวิทยานิพนธ์

ภาษาไทย : ผลของ *Penaeus merguensis*-translationally controlled tumor protein ต่อการ  
แสดงออกของยีน TPT1 ในเซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันมนุษย์เมื่อได้รับความร้อน

ภาษาอังกฤษ : Effect of *Penaeus merguensis*-translationally controlled tumor protein on TPT1  
expression of heat-treated human pulp cell

2. หลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ

3. ผู้ดำเนินการวิจัย นาย คณิสันท์ จิตร โชติกุล รหัส 5410220008

4. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. อูรีพร เล็กกัต (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก)  
ดร. ศิษญา ตันนุกิจ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม)

## 5. โครงการวิทยานิพนธ์โดยย่อ

### 5.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ในระหว่างขบวนการรักษาทางทันตกรรม เช่น การกรอฟัน (cavity preparation) เพื่อขจัดส่วน  
ของฟันที่ผุออกนั้นจะทำให้เกิดความร้อนขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายทำให้เคลือบฟัน (enamel)  
และเนื้อฟัน(dentine) ไหม้ (carbonization), ละลาย (melting) และปริแตกได้ (cracking) ความร้อนที่  
เกิดขึ้นยังส่งผลให้เกิดความเสียหายกับเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (dental pulp) ซึ่งเป็น โครงสร้างอ่อน  
นุ่มในตัวของฟัน จากการศึกษาพบว่า หากอุณหภูมิในโพรงประสาทฟันสูงขึ้นประมาณ 5.5 องศาเซลเซียส  
จะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันขึ้น อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ได้รับความร้อน  
จะตอบสนองโดยการสร้าง Heat-shock proteins (HSPs) ขึ้นมาเพื่อปกป้องเซลล์จากความร้อน (Lin *et*  
*al.*, 2010)

โปรตีน Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) เป็นโปรตีนที่มีการอนุรักษ์สูงในระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตและ มีการแสดงออกอย่างกว้างขวางทั้งในพืชและสัตว์ TCTP มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อมากกว่า 500 ชนิด แต่มีปริมาณที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับ ชนิดและสภาวะการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อนั้นๆ TCTP ยัง มีความเกี่ยวข้องในขบวนการ แบ่งเซลล์, ยับยั้งการเกิด apoptosis, จับกับ cytoskeleton, การสังเคราะห์โปรตีน, การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน, การพัฒนาการของตัวอ่อน และมีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Koziol *et al.*, 2012) TCTP มีคุณสมบัติ เป็น cyto-protective function ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จาก various stress conditions เช่น heat shock, heavy metal, calcium stress และ proapoptotic/cytotoxic signals (Bommer *et al.*, 2004)

จากการศึกษาพบว่า เซลล์เนื้อเยื่อในโพรงประสาท เมื่ออยู่ในสภาวะ Heat stress จะมีการแสดงออกของ Heat-shock proteins 70 (HSP70) เพิ่มสูงขึ้นเพื่อฟื้นคืนสภาพเซลล์จากการถูกทำลายด้วยความร้อน (Amano *et al.*, 2006) ซึ่ง TCTP มีคุณสมบัติคล้าย Heat-shock proteins (HSPs) โดยจะทำหน้าที่เป็น chaperone ซึ่งจะจับกับ โปรตีนได้หลากหลายชนิด ช่วยป้องกันและ ช่วยคืนสภาพโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์จากการเสียหายของ โปรตีน เนื่องจากถูกทำลายด้วยความร้อน และ ป้องกันการตายของเซลล์จากสภาวะ thermal shock (Gnanasekar *et al.*, 2009) อีกทั้งในปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยใดศึกษาผลของ โปรตีน TCTP ต่อเซลล์ในโพรงประสาทพันเมื่ออยู่ในสภาวะ Heat stress

ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาบทบาทหน้าที่ของโปรตีน TCTP ใน เซลล์ในโพรงประสาท พันมนุษย์ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะ Heat stress

## 5.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

5.2.1 ศึกษาผลของความร้อนต่อการตายของเซลล์และการแสดงออกของยีน TPT1

5.2.2 ศึกษาผลของ *Penaeus merguensis*-translationally controlled tumor protein

(*Pmer*-TCTP) ต่อการแสดงออกของยีน TPT1 ในสภาวะปกติและเซลล์เมื่อได้รับความร้อน

5.2.3 ศึกษาผลของ *Pmer*-TCTP ต่อการอยู่รอดของเซลล์เมื่อได้รับความร้อน

### 5.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.3.1 ทราบถึงผลของความร้อนต่อการตายของเซลล์ และการแสดงออกของยีน TPT1

5.3.2 ทราบถึงผลของ *Penaeus merguensis*-translationally controlled tumor protein

(*Pmer*-TCTP) ต่อการแสดงออกของยีน TPT1 ในสภาวะปกติ และเซลล์เมื่อได้รับความร้อน

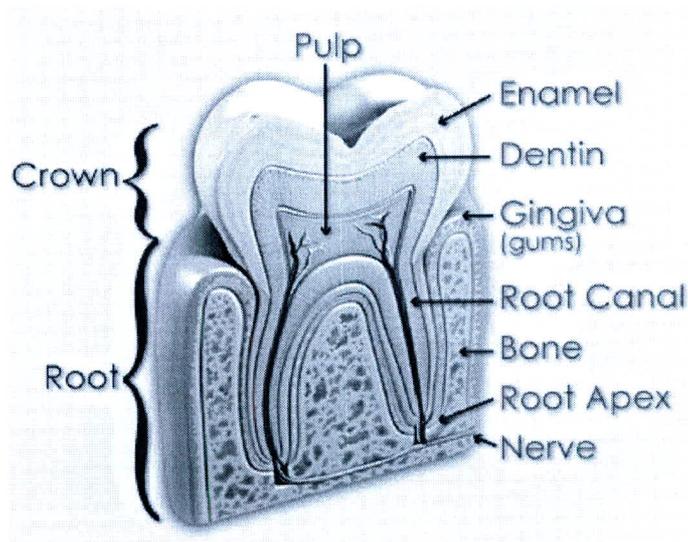
5.3.3 ทราบถึงผลของ *Pmer*-TCTP ต่อการอยู่รอดของเซลล์เมื่อได้รับความร้อน

### 5.4 บทตรวจเอกสาร

#### 5.4.1 โครงสร้างของฟัน

โครงสร้างของฟัน พิจารณาได้เป็น 2 ลักษณะคือ โครงสร้างภายนอก และโครงสร้างภายใน โครงสร้างภายนอกแบ่งออก 2 ส่วน คือ ตัวฟัน (Crown) และรากฟัน (Root) โดยมีแนวคอฟันเป็นเกณฑ์ ในการแบ่งแยก โครงสร้างภายในของฟัน ประกอบด้วย 4 ส่วน คือ

1. เคลือบฟัน (Enamel) เป็นส่วนที่แข็งที่สุดของฟัน กลุ่มอยู่รอบนอกสุดของตัวฟันโดยตลอด มีความหนามากที่สุด ในบริเวณปุ่ม หรือปลายขอบฟัน ค่อยๆ บางลงในบริเวณใกล้คอฟัน ทำหน้าที่เหมือนเกราะหุ้มฟัน เพื่อช่วยปกป้องอันตรายให้แก่ ชั้นของเนื้อฟัน และเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน เคลือบฟันโดยทั่วไปมีสีขาวใส เป็นมันวาว
2. เนื้อฟัน (Dentine) คือ ส่วนที่อยู่ถัดจากชั้นเคลือบฟันเข้าไป มีสีเหลือง มีความแข็งมากกว่ากระดูก แต่อ่อนกว่าเคลือบฟัน
3. เคลือบรากฟัน (Cementum) เป็นส่วนที่คลุมภายนอกของรากฟันโดยตลอด มีสีเหลืองอ่อน และทึบแสง
4. เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน (Dental Pulp) เป็นเนื้อเยื่ออ่อน (Soft tissue) ประกอบด้วยหลอดเลือด และเส้นประสาท ซึ่งผ่านเข้าโพรงประสาทฟัน ทางรูเปิดที่ปลายรากฟัน อวัยวะเหล่านี้ อยู่ภายในช่องว่าง ใจกลางฟัน ที่เรียกว่า โพรงประสาทฟัน (Pulp cavity) ทำหน้าที่นำอาหารหล่อเลี้ยงฟัน และรับความรู้สึกจากฟันไปสู่สมอง โพรงประสาทฟันแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ โพรงประสาทฟันในตัวฟัน (Pulp Chamber) มีรูปร่างไปตามตัวฟัน และโพรงประสาทในคลองรากฟัน (Pulp canal)

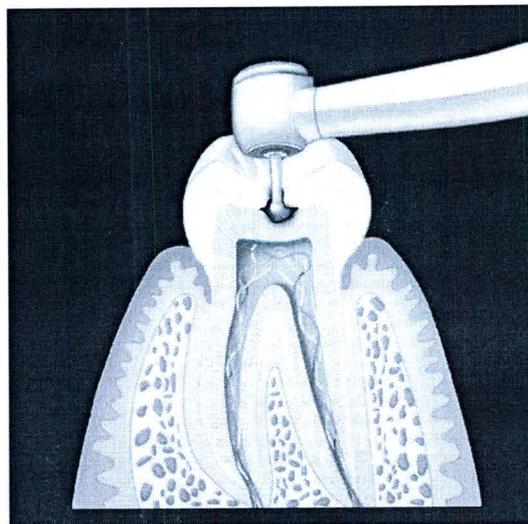


รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างของฟัน

จาก <http://www.blurtit.com/q6275295.html>

#### 5.4.2 การกรอฟัน

จากการศึกษาพบว่า การกรอฟันแสดงในรูปที่ 2 นั้นจะทำให้อุณหภูมิในโพรงประสาทรากฟันเพิ่มสูงขึ้นดังตารางที่ 1 ซึ่งหากอุณหภูมิในโพรงประสาทฟันสูงขึ้นประมาณ 5.5 องศาเซลเซียส จะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันขึ้น อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ได้รับความร้อนจะตอบสนองโดยการสร้าง Heat-shock proteins (HSPs) ขึ้นมาเพื่อปกป้องเซลล์ไม่ให้เสียหายจากความร้อน (Lin *et al.*, 2010)



รูปที่ 2. แสดงการกรอฟัน

จาก <http://www.nagpurdentist.in/tab%202.html>

ตารางที่ 1 แสดงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในโพรงประสาทฟันในขั้นตอนเตรียมผิวฟัน (Lin *et al.*, 2010)

ชนิดเครื่องมือที่ใช้ในขั้นตอนเตรียมผิวฟัน	อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในโพรงประสาทฟัน( องศาเซลเซียส)
Laser assisted tooth ablation	2.3–24.7
Laser assisted caries prevention	1.2–4.0
Bleaching (without light/laser assisted)	0.1–1.1
Bleaching (with light/laser assisted)	1.1–16.0
Polymerization of dental restorative materials (DRMs)	2.9–7.8
HSHPs cavity preparation (without water, high load)	16.4–19.7
HSHPs cavity preparation (without water, low load)	7.1–9.5
HSHPs cavity preparation (with water, high load)	2.2–5.9
HSHPs cavity preparation (with water, low load)	-1.8 ถึง 5.0

### 5.4.3 โปรตีน TCTP

#### 5.4.3.1 การค้นพบ

The translationally controlled tumour protein (TCTP) เป็นโปรตีนที่ถูกค้นพบ โดยกลุ่มนักวิจัย 3 กลุ่มที่สนใจศึกษาโปรตีนที่ถูกควบคุมการแสดงออกในขั้นตอนการแปลรหัสเป็นโปรตีน ในปี 1981 กลุ่มของ George Thomas ค้นพบโปรตีนที่ถูกควบคุมการแสดงออกในขั้นตอนการแปลรหัสซึ่งมีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อ เซลล์ fibroblasts (Swiss 3T3) ของหนูถูกกระตุ้นให้แบ่งเซลล์ด้วย serum และให้ชื่อว่า Q23 (Thomas *et al.*, 1981) ต่อมากลุ่มของ George Brawerman สนใจศึกษา mRNA ของโปรตีนที่ยังไม่ถูกแปลรหัสจำนวนมาก อยู่ในลักษณะ nonribosomal mRNP particles ใน sarcoma cell line และ

erythroleukaemia cell ของหนู และให้ชื่อว่า P21 (Yenofsky *et al.*, 1982, Yenofsky *et al.*, 1983) ต่อมากลุ่มของ Heinz Bielka (Berlin) ค้นพบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากใน Ehrlich ascites tumour cells ของมนุษย์ที่เจริญเติบโต เมื่อเทียบกับเซลล์ชนิดเดียวกันที่ไม่เจริญ และให้ชื่อว่า P23 (Bohm *et al.*, 1989) ซึ่งจากการศึกษาในขณะนั้นพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีการควบคุมการแสดงออกในขบวนการแปลรหัส มีการศึกษาลำดับเบสบน cDNA ของโปรตีนดังกล่าวในหนู (Chitpatima *et al.*, 1988) และ mammary tumour ในมนุษย์ ได้ตั้งชื่อว่า Translationally Controlled Tumour Protein (Gross *et al.*, 1989) ตามกลไกควบคุมการแสดงออกและ แหล่งที่ใช้ clone โปรตีน TCTP ได้ถูกศึกษาอย่างมาก ทำให้ค้นพบคุณสมบัติของ TCTP เพิ่มขึ้น ในปี 1995 พบว่า TCTP เป็นตัวกระตุ้นให้ basophil leukocytes ปลดปล่อย histamine และได้มีการตั้งชื่อตามคุณสมบัติที่พบว่า Histamine releasing factor (HRF) (MacDonald *et al.*, 1995) ต่อมาพบว่า TCTP มีคุณสมบัติเป็น anti-apoptotic จึงตั้งชื่อว่า fortilin (Li *et al.*, 2001)

#### 5.4.3.2 ลักษณะ mRNA และโปรตีนของ TCTP

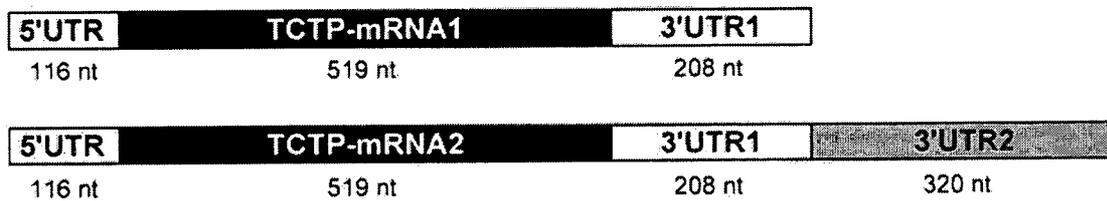
TCTP เป็นโปรตีนที่มีการอนุรักษ์สูงในระหว่างสิ่งมีชีวิตและ มีการแสดงออกอย่างกว้างขวางทั้งในพืชและสัตว์ (Bommer *et al.*, 2004) โครงสร้างที่ละลายน้ำของ TCTP ในส่วน  $\beta$ -sheet domain ซึ่งมีการอนุรักษ์สูงมีลักษณะคล้ายกับโปรตีน Mss4/Dss4 ซึ่งเป็น small chaperone ทำให้ TCTP ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม small chaperone proteins (Thaw *et al.*, 2001)

TCTP มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อมากกว่า 500 ชนิด (Bommer *et al.*, 2004) แต่มีปริมาณที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับ ชนิดและสภาวะการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อนั้นๆ โดย TCTP จะมีการแสดงออกมากในเซลล์ที่แบ่งตัวได้ดีหรือมีกิจกรรมสูงเช่น เซลล์กล้ามเนื้อและตับอ่อน ในขณะที่มีการแสดงออกต่ำในเซลล์ที่หยุดการแบ่งตัวเช่นเซลล์สมอง (Thiele *et al.*, 2000) และยังมีการแสดงออกที่มากผิดปกติในเซลล์มะเร็ง (Bommer *et al.*, 2012)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยีนที่สร้าง TCTP คือ TPT1 ซึ่งประกอบด้วย 6 exons และ 5 introns มี TATA-box เป็น promoter และมีอีกหลาย promoter elements ซึ่งมีการอนุรักษ์สูงใน

สิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนม ในมนุษย์ ยีน TPT1 อยู่ที่ โครโมโซมคู่ที่ 13 ตรงตำแหน่ง 13q14 (Thiele *et al.*, 2000) ซึ่งหากแปลรหัสแล้วโปรตีน TCTP จะประกอบด้วย 172 กรดอะมิโน ยีน TPT1 ที่มี intron น้อยกว่าปกติ จะถอดรหัสหรือแปลรหัสเป็น โปรตีน TCTP ที่ไม่สมบูรณ์ เรียก ยีนเหล่านี้ว่า TPT1 pseudogenes ซึ่งในมนุษย์จะมีอยู่ 15 pseudogenes ,ใน rat มี 18 pseudogenes ,ใน mouse มี 13 pseudogenes และในกระต่ายมี 10-15 pseudogenes

ยีน TPT1 สามารถถอดรหัสเป็น mRNA ได้ 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับ alternative polyadenylation signals ซึ่งแตกต่างกันที่ความยาวของบริเวณ 3'-UTRs โดย mRNA1 มีขนาด 843 nucleotides และ mRNA2 มีขนาด 1164 nucleotides (Thiele *et al.*, 2000) ดังรูปที่ 3

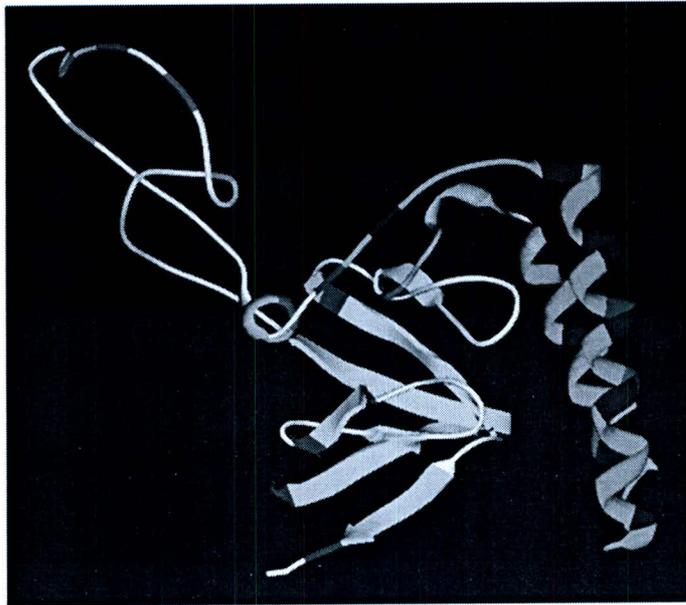


รูปที่ 3 แสดง mRNA ทั้ง 2 ชนิดของโปรตีน TCTP (Thiele *et al.*, 2000)

ในสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนม เนื้อเยื่อทุกชนิดจะมีการแสดงออกของ mRNA ทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีอัตราส่วนที่แตกต่างกันไปโดย mRNA ที่สั้นกว่าจะมีการแสดงออกที่สูงกว่า mRNA ของ TCTP จะมีส่วนของ 5'-UTR ตรงบริเวณ 5'-terminal oligopyrimidine tract (5'-TOP) และส่วนของ 3'-UTR โดย 5'-UTR จะทำหน้าที่ควบคุมการแปลรหัสของสาย mRNA บริเวณดังกล่าวยังมีเบส CG สูงเกือบ 80 % ทำให้เกิดโครงสร้างขั้นที่ 2 ได้ดี ซึ่งในหนูพบว่า โครงสร้างขั้นที่ 2 ของ TCTP mRNA สามารถจับและกระตุ้นการทำงานของ dsRNA-dependent protein kinase PKR ได้ (Bommer *et al.*, 2002) ส่วน 3'-UTR จะมี AU มาก และมีบริเวณของ AUUUA ซึ่งมีส่วนช่วยในการคงตัวของสาย mRNA (Bommer *et al.*, 2004)

### 5.4.3.3 โครงสร้างของโปรตีน TCTP

โครงสร้าง 3 มิติของ TCTP ประกอบด้วย 3 ส่วนหลักๆ คือ  $\beta$ -stranded core domain, Helical domain และ Flexible loop โดย  $\beta$ -stranded core domain เป็นส่วนที่คล้ายกับ โปรตีน Mss4 และ Dss4 ซึ่งเป็น small chaperones ที่สามารถจับกับ nucleotide อิสระเพื่อรวมตัวเป็น โปรตีน Rab (Thaw *et al.*, 2001) ส่วน Helical domain และ Flexible loop เป็นบริเวณ tubulin-binding region และ the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding area (Bommer *et al.*, 2004) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีน TCTP

จาก Thaw *et al.*, 2001 (PDB: 1H6Q)

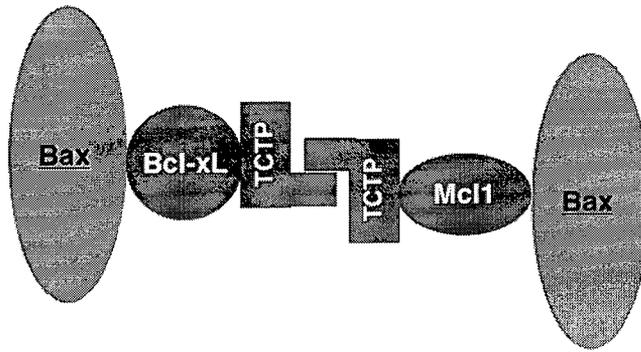
โปรตีน TCTP มีหลาย region ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ดังนี้ กรดอะมิโนตัวที่ 1-40 เป็นส่วน N-terminal region ของโปรตีน TCTP ที่ใช้จับกับ โปรตีน anti-apoptosis Bcl-xL, กรดอะมิโนตัวที่ Glu12, Leu74, และ Glu134 เป็นส่วนที่ TCTP ใช้จับกับ Rab G protein-like translation elongation factor eEF1A, กรดอะมิโนตัวที่ Arg21 มีความสำคัญ ต่อการจับกัน ระหว่าง TCTP และ the Bcl-xL homolog Mcl-1, กรดอะมิโนตัวที่ 79-123 เป็นส่วน tubulin binding domain, กรดอะมิโนตัวที่ 81-112 เป็นส่วน  $\text{Ca}^{2+}$  binding region, กรดอะมิโนตัวที่ 107-

172 เป็นส่วน polo-like kinase interaction domain และ กรดอะมิโนตัวที่ 126-172 เป็นส่วน C-terminal self-interaction domain (Yang *et al.*, 2005)

#### 5.4.3.4 คุณสมบัติของโปรตีน TCTP

โปรตีน TCTP ได้ชื่อว่าเป็น multifunctional protein (Bommer *et al.*, 2012) เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในขบวนการต่างๆของเซลล์ เช่น ระดับการแสดงออกของโปรตีน TCTP จะสูงในระหว่างการแบ่งเซลล์ซึ่งเชื่อว่า โปรตีนดังกล่าวมีความสำคัญต่อขบวนการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ (Bommer *et al.*, 2004) โดย TCTP สามารถจับกับ tubulin ได้ (Gachet *et al.*, 1999) ในช่วงที่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งเซลล์ในระยะ metaphase TCTP จะไปจับกับเส้นใย spindle เพื่อเพิ่มความมั่นคงให้กับเส้นใยและจะปล่อยหลังจากที่ผ่านระยะ metaphase โดยโปรตีน kinase Pik (Yarm *et al.*, 2002) จะทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้ TCTP ทำให้ TCTP หลุดออกจากเส้นใย spindle (Bommer *et al.*, 2012) การเคลื่อนที่ของเซลล์ TCTP ยังจับกับ actin filaments เมื่อทำการ knockdown TCTP พบว่า morphology ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เซลล์ไม่เกาะกัน, ตัวเซลล์ไม่เรียบแบบมีการยกตัวขึ้นจากพื้นผิว (Bazile *et al.*, 2009) TCTP ยังมีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ (Meyvis *et al.*, 2009) และตัวอ่อน (Li *et al.*, 2011) TCTP ยังมีการแสดงออกมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Bommer *et al.*, 2012) เมื่อทดลองยับยั้งการผลิต TCTP พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเนื้อร้ายได้ (Tuynder *et al.*, 2002) และกระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis (Gnanasekar *et al.*, 2009)

TCTP มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน anti-apoptosis (Li *et al.*, 2001) สามารถจับกับ calcium เพื่อควบคุมปริมาณ calcium อิสระในเซลล์โดยจากการศึกษาพบว่าปริมาณ calcium อิสระในเซลล์ที่ลดลงมีผลลดการเกิด apoptosis ได้ (Arcuri *et al.*, 2004) TCTP ยังสามารถจับกันเองได้ และสามารถจับกับ โปรตีน MCL1 และ Bcl-XL โดยใช้ ส่วนของ N-terminal region ของโปรตีน TCTP (Yang *et al.*, 2005) เพื่อป้องกันการรวมตัวของโปรตีน Bax บนเยื่อหุ้ม mitochondrial ในขบวนการป้องกันการเกิด apoptosis (Susini *et al.*, 2008) ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงกลไกการทำงานของ TCTP ในการป้องกันการรวมตัวของโปรตีน Bax บนเยื่อหุ้ม mitochondrial ในขบวนการป้องกันการเกิด apoptosis (Susini *et al.*, 2008)

อีกทั้ง โปรตีน TCTP ยังมีความจำเป็นต่อการเจริญของตัวอ่อนหนู (Li *et al.*, 2011) และหากขาดการแสดงออกของโปรตีน TCTP ในตัวอ่อน จะทำให้ตัวอ่อนเกิด spontaneous apoptosis และตายตั้งแต่อยู่ในท้องแม่ (Susini *et al.*, 2008) งานวิจัยส่วนใหญ่ พบว่า TCTP เป็น cytoplasmic protein แต่ยังมีบางรายงานวิจัยพบว่า TCTP อยู่ในนิวเคลียส ด้วยเช่นเดียวกัน (Li *et al.*, 2001)

โปรตีน TCTP มีบทบาทสำคัญใน TOR pathway ซึ่งเป็น pathway ที่มีบทบาทในการเจริญเติบโต, เพิ่มจำนวน, การเคลื่อนที่, การอยู่รอด และ ควบคุมขบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ การทำงานของ TOR pathway จะขึ้นอยู่กับ สารอาหารที่เซลล์ได้รับและ พลังงานภายในเซลล์ ในขบวนการส่งสัญญาณของ TOR pathway จะต้องอาศัยการทำงานของ Rheb ซึ่งเกี่ยวข้องกับ TCTP โดย TCTP จะกระตุ้นการทำงานของ Rheb จากนั้น Rheb จะไปกระตุ้นการทำงานของ TOR1 ซึ่ง TOR1 จะกระตุ้นการทำงานของ serine-threonine kinase S6K และโปรตีน 4EBP1 ทำให้ S6 ribosomal จับกับ eIF3 เป็นสารประกอบจับกับ 5' TOP region ของสาย mRNA เพื่อเริ่มขบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Koziol *et al.*, 2012)

โปรตีน TCTP และ p53 จะมีการควบคุมการทำงานซึ่งกันและกัน โดย TCTP หากมีการแสดงออกมากจะไปจับกับโปรตีน NUMB เกิดเป็นสารประกอบโปรตีนไปกระตุ้นให้ โปรตีน

MDM2 จับกับ p53 เกิดเป็น p53-MDM2-containing complexes (Amson *et al.*, 2011) ส่งผลให้ p53 ถูกส่งออกนอกนิวเคลียส และ โคนย่อยสลายโดย proteasome (Ryan *et al.*, 2001)

mRNA ของ TCTP สามารถจับกับ dsRNA-dependent protein kinase (PKR) (Bommer *et al.*, 2002) ทำให้ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ และทำให้ PKR ทำงานไปกระตุ้นการทำงานของ p53 ไปยับยั้งขบวนการ transcription ของ TCTP การแสดงออกของ PKR มากจะส่งผลให้ TCTP ลดลง และ p53 มากขึ้น โดย TCTP และ p53 จะมีการควบคุมการทำงานซึ่งกันและกันระหว่างขบวนการที่ทำให้เซลล์อยู่รอดและเกิดการตายแบบ apoptosis (Koziol *et al.*, 2012) ซึ่งหากขาดกลไกควบคุมการทำงานของ TCTP จะส่งผลให้ p53 ลดลง, ไม่เกิดการตายแบบ apoptosis เมื่อเซลล์เสียหาย, TOR pathway ทำงานมากขึ้นมีผลให้เซลล์เจริญและแบ่งตัวเร็ว มีผลให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ (Koziol *et al.*, 2012, Bommer *et al.*, 2012)

Extracellular signal เช่น growth factor และ cytokine และส่วน สภาวะกระตุ้นเซลล์เช่น heat shock, heavy metal, calcium stress, oxidation stress, proapoptotic/cytotoxic signals ยังมีผลกระตุ้นการแสดงออกของ โปรตีน TCTP (Bommer *et al.*, 2012) และจากการศึกษา ระดับของ TCTP ที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เซลล์ทนต่อ สภาวะต่างๆและสารเคมีได้ดีขึ้นด้วย (Bommer *et al.*, 2012)

สภาวะ heat shock เซลล์ TCTP จะทำหน้าที่เป็น chaperones ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับโปรตีนได้หลากหลายชนิด (Gnanasekar *et al.*, 2009, Bommer *et al.*, 2004) โดยจะป้องกันและช่วยคืนสภาพโปรตีนต่างๆในเซลล์จากการเสียหายของโปรตีน ป้องกัน การตายของเซลล์จากสภาวะ thermal shock (Gnanasekar *et al.*, 2009) ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติของ TCTP ยืนยันได้ว่า โปรตีน TCTP มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อ Cytoprotective function

#### 5.4.4 การตอบสนองของเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน

เมื่อเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันอยู่ในสภาวะ Heat stress จะมีผลกระตุ้นให้เกิด reactive oxygen species (ROS), interleukin-8 (IL-8) ซึ่งเป็น proinflammatory cytokines ส่งผล

ให้เซลล์เสียหายและเกิดการอักเสบ (Chang et al., 2009) และ Heat stress จะมีผลกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis (Kitamura et al., 2005) Heat stress ยังส่งผลให้ Alkaline phosphatase activity ลดลง และ Intercellular communication เสียหายทำให้การสื่อสารระหว่างเซลล์ลดลง อย่างไรก็ตามเซลล์จะมีขบวนการซ่อมแซมตัวเองโดยมีการแสดงออกของ HSPs เพิ่มขึ้นเพื่อซ่อมแซม Alkaline phosphatase activity และ Intercellular communication ที่เสียหายให้กลับมาทำงานได้ดังเดิม แสดงถึง HSPs มีความสำคัญต่อขบวนการปกป้องและซ่อมแซมเซลล์จากความเสียหายเมื่ออยู่ในสภาวะ Heat stress (Amano et al., 2006)

โปรตีน TCTP เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิด Apoptosis (Li et al., 2001) และมีคุณสมบัติคล้าย Heat-shock proteins (HSPs) (Gnanasekar et al., 2009) ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากสภาวะ Stress ต่างๆ รวมถึง Heat stress (Bommer et al., 2012) ซึ่งได้มีการศึกษาในเซลล์หลายชนิด แต่ยังไม่มีการวิจัยใดศึกษา คุณสมบัติของโปรตีน TCTP ในการปกป้องและฟื้นคืนสภาพของเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน เมื่ออยู่ในสภาวะ Heat stress จึงนำมาสู่การศึกษาทดลองในงานวิจัยฉบับนี้ซึ่งสนใจศึกษาเกี่ยวกับ คุณสมบัติของโปรตีน TCTP ในการปกป้องเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันจากสภาวะ Heat stress

## 5.5 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 5.5.1 ผลผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน *Panaeus merguensis*-translationally controlled tumor protein (*Pmer*-TCTP)

#### 5.5.1.1 การกระตุ้นการสร้างโปรตีน GST-*Pmer*-TCTP ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-*Pmer*-TCTP (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BL ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร ใช้เป็นหัวเชื้อ นำไปบ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT นำไปบ่มเลี้ยงต่อในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงที่  $OD_{600}$  ประมาณ 0.4-0.7 จากนั้นเติมสารละลาย 1.0mM IPTG

( isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranositol ) บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงแยกเก็บเซลล์แบบที่เรียกว่าความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) 200-300 วัตต์ จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (Soluble protein) และ ตะกอน (Insoluble protein) วิเคราะห์วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS – PAGE)

### 5.5.1.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนถูกผสม *Pmer*-TCTP

นำ Soluble protein มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ Glutathione Sepharose 4 Fast (GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ, USA) จากนั้นตัด *Pmer*-TCTP จาก GST-tagged protein ด้วย Thrombin โปรตีน *Pmer*-TCTP มีขนาด 19.2 kDa ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย 12 % SDS – PAGE หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA).

### 5.5.2 การเลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน (human dental pulp cells, HDPCs)

นำฟันคุดที่ถูกถอน มาฆ่าเชื้อบริเวณผิวฟันด้วย 70 % แอลกอฮอล์ ทำการแยกเอาเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน มาย่อยด้วย 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Collagenase type I และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Dispase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายที่ได้ เลี้ยงในอาหาร alpha modified Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM) ที่มี 20% FCS, 100  $\mu\text{M}$  L-ascorbic acid 2-phosphate, 2 mM L-glutamate, 100 units/ml penicillin และ 100 mg/ml streptomycin บ่มเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ในความดันบรรยากาศที่มี 5%  $\text{CO}_2$

### 5.5.3 การให้ความร้อนแก่เซลล์

เลี้ยงเซลล์ จนมีความหนาแน่นประมาณ 70 % ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ใส่ในกล่องปิดฝาสนิท เพื่อจำลองสภาพบรรยากาศในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ นำไปลอยใน Water bath ที่ปรับอุณหภูมิ ให้อุณหภูมิภายในวัสดุที่ใช้เลี้ยงเซลล์

เท่ากับ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบกำหนด ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เต็มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีและมีโปรตีน TCTP ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำ 5 ซ้ำต่อกลุ่มการทดลอง ลงไปนำกลับ ไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความดันบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> เมื่อครบกำหนดจึงนำเซลล์ไปวิเคราะห์ผลต่อไป

#### 5.5.4 ตรวจสอบการเกิด Apoptosis ในเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันเมื่อได้รับความร้อน

เลี้ยงเซลล์ ใน Dishes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จนมีความหนาแน่นประมาณ 60 % ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 เมื่อครบกำหนด 0 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย Annexin-V และ PI วิเคราะห์ผลภายใต้กล้อง Fluorescence ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 5.5.5 ทดสอบหา เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันเมื่อได้รับความร้อน

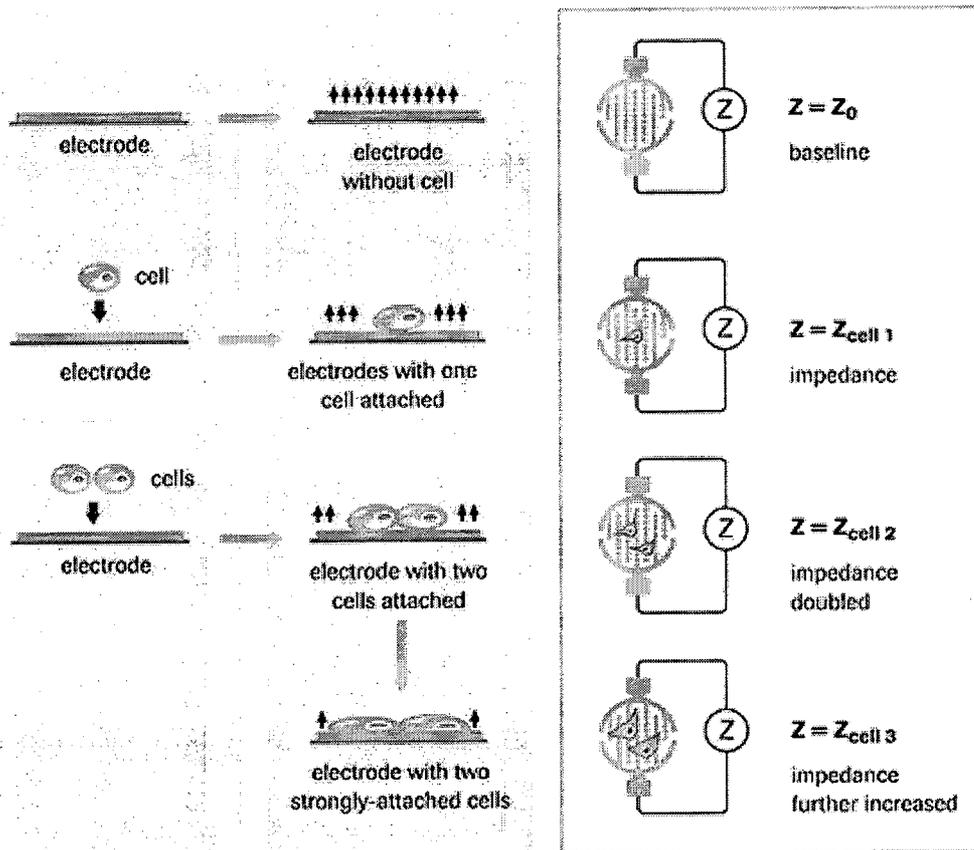
##### 5.5.5.1 เทคนิค 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

###### Assay

เลี้ยงเซลล์ ความเข้มข้น  $1 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96-well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เต็มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10mM HEPES, pH 7.4 ลงไป 200 ไมโครลิตร, ใส่ สารละลาย PBS pH 7.4 ที่มี MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป 50 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่า plates ให้สารละลายผสมกันดี ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในความดันบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดดูสารละลายออก เต็ม DMSO ลงไป 200 ไมโครลิตร ตามด้วย Sorensen's glycine buffer (0.1 M glycine และ 0.1 M NaCl) 25 ไมโครลิตร นำ plate ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 5.5.5.2 เทคนิค xCELLigence

เลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน ความเข้มข้น  $8 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม ใน E-plate 96 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความดันบรรยากาศที่มี 5%  $\text{CO}_2$  วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เครื่อง xCELLigence จะเก็บข้อมูลแบบ ต่อเนื่องทุกๆ 15 นาที จนถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งอาศัยความต้านทานไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเซลล์เกาะที่ก้นหลุมใน E-plate 96 บ่งบอกถึงการเจริญและการตายของเซลล์ ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6. แสดงความต้านทานไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเจริญของเซลล์

จาก [http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/index.jsp?&id=xcept\\_010100](http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/index.jsp?&id=xcept_010100)

เมื่อไม่มีการเกาะของ เซลล์ที่ก้นหลุมของ E-plate 96 ความต้านทานไฟฟ้าจะคงที่ ส่งผลให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างก้นหลุมและบนหลุมของ E-plate 96 คงที่ อ้างอิงเป็น  $Z_0$  แต่เมื่อมีการเกาะของเซลล์จะเกิดความต้านทานระหว่าง ก้นหลุมและบนหลุมของ E-plate 96 ขึ้น

ทำให้ค่าความต่างศักย์เพิ่มขึ้น เมื่อมีการเกาะเพิ่มขึ้นตลอดจน มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน จะส่งผลให้เกิดความต้านทานเพิ่มขึ้นในหลุม ค่าความต่างศักย์ระหว่าง กันหลุมและบนหลุมก็จะเพิ่มขึ้นตาม เครื่อง xCELLigence จะทำการบันทึกค่าความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นทุกๆ 15 นาที ซึ่งค่าความต่างศักย์ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถบ่งบอกถึง การเจริญและการตายของเซลล์ได้

### 5.5.6 ทดสอบหาความเข้มข้นของ *Pmer*-TCTP ที่เหมาะสมในการทดลอง

#### 5.5.6.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของ *Pmer*-TCTP ที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิค MTT

เลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันความเข้มข้น  $1 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม ใน 96-well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 เมื่อครบกำหนด 45 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีน TCTP ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม, 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำ 5 ซ้ำต่อกลุ่มการทดลอง นำกลับไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความดันบรรยากาศที่มี 5%  $\text{CO}_2$  เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ % การรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

#### 5.5.6.2 ทดสอบหาความเข้มข้นของ *Pmer*-TCTP ที่เหมาะสม ด้วยระบบ xCELLigence

เลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ความเข้มข้น  $8 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม ใน E-plate 96 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 เมื่อครบกำหนด 45 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีน TCTP ที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม, 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำ 5 ซ้ำต่อกลุ่มการทดลอง นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในความดันบรรยากาศที่มี 5%  $\text{CO}_2$  วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เครื่อง xCELLigence เก็บข้อมูลแบบต่อเนื่องทุกๆ 15 นาที จนถึง 72 ชั่วโมง

### 5.5.7 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน TPT1

เลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ใน Dishes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 70 % ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 เมื่อครบ

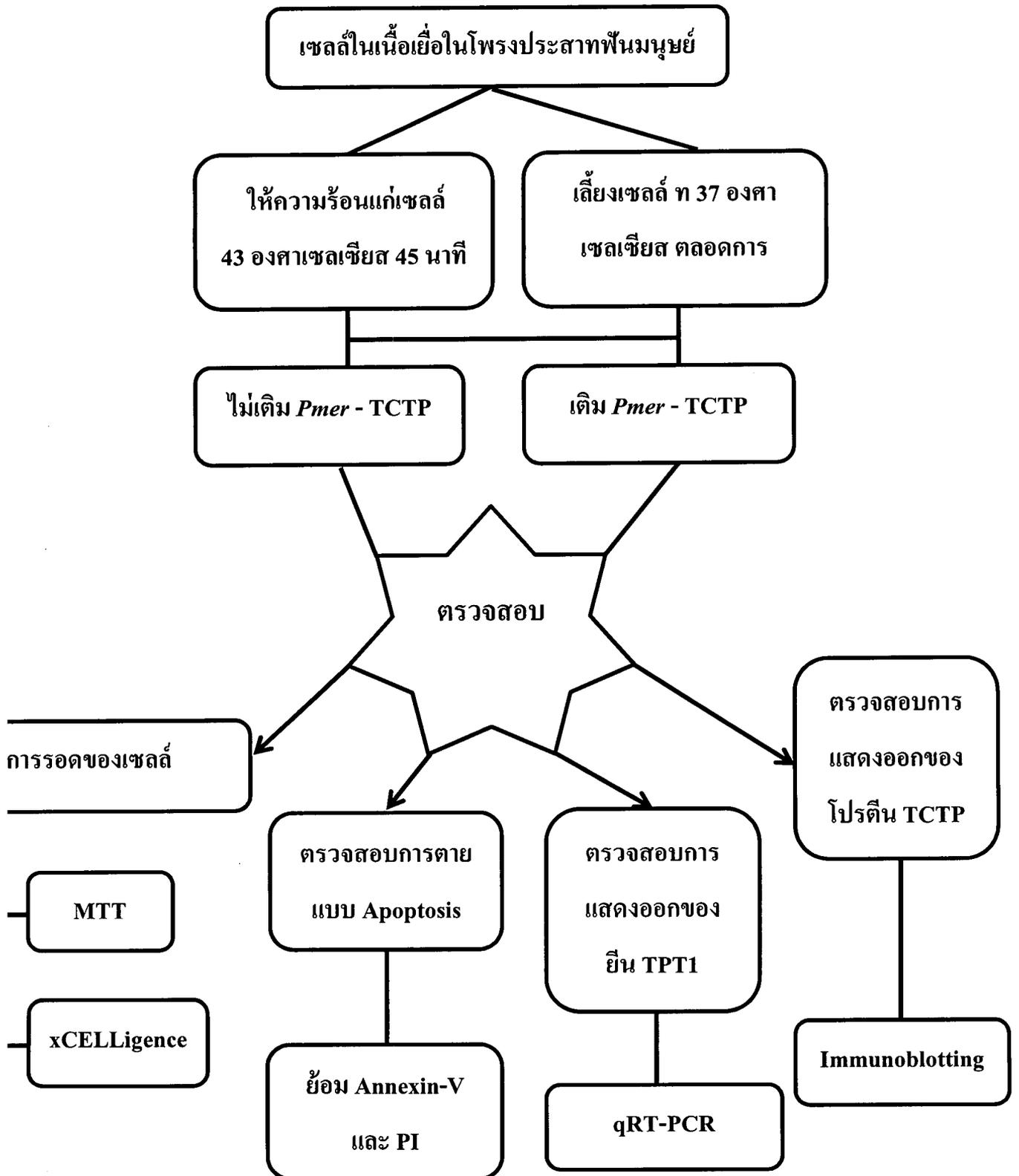
กำหนด 45 นาทีดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เต็มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโปรตีน TCTP และมีโปรตีน TCTP ความเข้มข้นที่เหมาะสม ในหัวข้อ 5.5.5 และ 5.5.6 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในความดันบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> เมื่อครบกำหนด 0 ชั่วโมง, 5 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ทำการสกัด RNA ด้วย RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) สังเคราะห์เป็น cDNA ด้วย SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen Corporation, NY, USA) จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค Quantitative Real-Time PCR (qPCR) ด้วย FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) ใช้ primer ของ TPT1: Forward; AAATGTTAACAAATGTGGCAATTAT, Reverse; AACAAATGC CTC CACTCCAAA และ primer ของ GAPDH : Forward; GCTCATTTCCTGGTATGACAACG, Reverse; AGGGGTCTACATGGCAACTG ( Pilbrow *et al.*, 2008) ใช้รอบอุณหภูมิ ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบปฏิกิริยา, 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตามด้วย 56 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที 40 รอบปฏิกิริยา และ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อีก 1 รอบปฏิกิริยา

วิเคราะห์จำนวนเท่าการแสดงออกของยีน TPT1 โดย นำค่า Threshold cycle (C<sub>t</sub>) ของยีน TPT1 ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้มา normalize ด้วยค่า C<sub>t</sub> ของยีน GAPDH ( $\Delta C_t$ ) จากนั้นจึง normalize ด้วยค่า  $\Delta C_t$  ของ กลุ่มควบคุม ( $\Delta\Delta C_t$ ) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

### 5.5.8 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน TCTP

เลี้ยงเซลล์ในเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน ใน Dishes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 70 % ให้ความร้อนแก่เซลล์ ดังหัวข้อที่ 5.5.3 เมื่อครบกำหนด 45 นาทีดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เต็มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีโปรตีน TCTP และมีโปรตีน TCTP ความเข้มข้นที่เหมาะสม ในหัวข้อ 5.5.5 และ 5.5.6 นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในความดันบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> เมื่อครบกำหนด 0 ชั่วโมง, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์โดยใช้ 1 x RLB (Promega Corporation, Madison, WI, USA) ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน TCTP โดยใช้เทคนิค Immunoblotting ใช้ Actin เป็น internal control ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

5.5.9 แผนภาพการทดลอง





## 7. สถานที่ดำเนินการวิจัย

ภาควิชา ชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ภาควิชา ชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## 8. เอกสารอ้างอิง

- Amano T, Muramatsu T, Amemiya K, Kubo K, Shimono M. Responses of rat pulp cells to heat stress in vitro. *J Dent Res* 2006; 85: 432–435.
- Amson R, Pece S, Lespagnol A, et al. Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* 2011; 18(1): 91-99.
- Arcuri F, Papa S, Carducci A, Romagnoli R, Liberatori S, Riparbelli MG, Sanchez JC, Tosi P, Vecchio MT. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) in the Human Prostate and Prostate Cancer Cells: Expression, Distribution, and Calcium Binding Activity. *The Prostate* 2004; 60:130 -140
- Bazile F, Pascal A, Arnal I, Le Clainche C, Chesnel F, Kubiak JZ. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30(4): 555-565.
- Bohm H, Benndorf R, Gaestel M, et al. The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem Int* 1989; 19(2): 277-86.
- Bommer UA, Borovjagin AV, Greagg MA, Jeffrey IW, Russell P, Laing KG, Lee M, Clemens MJ. The mRNA of the translationally controlled tumour protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* 2002; 8: 478–496.
- Bommer U A. Cellular Function and Regulation of the Translationally Controlled Tumour Protein TCTP. *The Open Allergy Journal*, 2012; 5: 19-32.

- Bommer UA, Thiele BJ. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(3): 379-385.
- Chang SW, Lee SI, Bae WJ, et al. Heat Stress Activates Interleukin-8 and the Antioxidant System via Nrf2 Pathways in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 2009; 35: 1222–1228.
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G. Nucleotide sequence of a major Messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(5): 2350.
- Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, Bommer UA. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci* 1999; 112(8): 1257-1271.
- Gnanasekar M, Dakshinamoorthy G, Ramaswamy K. Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 21; 386(2): 333-7.
- Gnanasekar M, Thirugnanam S, Zheng G, Chen A, Ramaswamy K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2009b; 34: 1241–1246.
- Gross B, Gaestel M, Bohm H, Bielka H. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(20): 8367.
- Kitamura C, Nishihara T, Ueno Y, Nagayoshi M, Kasugai S, Terashita M (2005). Thermotolerance of pulp cells and phagocytosis of apoptotic pulp cells by surviving pulp cells following heat stress. *J Cell Biochem* 94:826-834.
- Koziol M J, Gurdon J B. TCTP in Development and Cancer. *Biochemistry Research International* 2012; 1-9.

- Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001; 276(50): 47542-47549.
- Li S, Chen X, Ding Y, Liu X, Wang Y, He J. Expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in the uterus of mice of early pregnancy and its possible significance during embryo implantation. *Hum Reprod* 2011; 26(11): 2972-2980.
- Lin M, Xu F, Lu TJ, Bai BF. A review of heat transfer in human tooth—Experimental characterization and mathematical modeling. *dental materials*. 2010; 26: 501–513.
- MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995; 269(5224): 688-90.
- Meyvis Y, Houthoofd W, Visser A, et al. Analysis of the translationally controlled tumour protein in the nematodes *Ostertagia ostertagi* and *Caenorhabditis elegans* suggests a pivotal role in egg production. *Int J Parasitol* 2009; 39(11): 1205-13.
- Pilbrow AP, Ellmers LJ, Black MA, Moravec CS, Sweet WE, Troughton RW, Richards AM, Frampton CM, Cameron VA. Genomic selection of reference genes for real-time PCR in human myocardium. *BMC Medical Genomics* 2008; 1:64
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology* 2001; 13: 332–337.
- Susini L, Besse S, Duflaut D, et al. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ* 2008; 15(8): 1211-20.
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 2001; 8(8): 701-704.
- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., & Thiele, B. J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *European Journal of Biochemistry* 2000; 267: 5473– 5481.

- Thomas G, Luther H. Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum Stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(9): 5712-6.
- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R., & Teleman, A. Biological models and genes of tumour reversion: Cellular reprogramming through *tpt1/TCTP* and *SIAH-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 14976–14981.
- Yang Y, Yang F, Xiong Z, et al. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* 2005; 24(30): 4778-4788.
- Yarm FR. Plk phosphorylation regulates the microtubulestabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 2002; 22(17): 6209-6221.
- Yenofsky, R., Bergmann, I. and Brawerman, G. Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 5876-5880.
- Yenofsky, R., Cereghini, S., Krowczynska, A. and Brawerman, G. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol* 1983; 3: 1197-1203.