



ความเป็นพิษของ Transthyretin กลายพันธุ์ชนิด V30M และ L55P ที่มีต่อเซลล์มนุษย์

Cytotoxicity of V30M and L55P Transthyretin Variants on Human Cells

ศิริภา อन्नانونท์ และ พรทิพย์ ประพันธ์พจน์

Siripa Annanon and Porntip Prapunpoj*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University

Received : 24 February 2020

Revised : 29 April 2020

Accepted : 18 June 2020

บทคัดย่อ

Transthyretin (TTR) เป็นหนึ่งในโปรตีนขนส่งฮอร์โมนไทรอกซินในพลาสมาและไซสตันหลัง เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน และมีน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa การกลายพันธุ์ของยีนที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่ง จะส่งผลให้เกิดเป็น TTR variant ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรค TTR amyloidosis โดย TTR จะเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น amyloid fibril ที่เป็นพิษ เกิดการสะสมและทำให้การทำงานของระบบเซลล์ประสาทผิดปกติ ในบรรดา TTR variants ที่ได้มีการศึกษาแล้วนั้น V30M (เมไทโอนีนแทนที่วาลีนที่ตำแหน่ง 30) เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุด ในขณะที่ L55P (โพรลีนแทนที่ลิวซีนที่ตำแหน่ง 55) เป็นชนิดก่อให้เกิดอาการรุนแรงที่สุด การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เป็นวิธีการพื้นฐานสำหรับวิเคราะห์ amyloidogenicity ของ TTR ในเบื้องต้น อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่มีความจำเพาะและไวต่อพิษของ TTR amyloid เป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพของการทดสอบ การวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์มนุษย์ต่อพิษ TTR เพื่อค้นหาเซลล์ที่มีความไวและเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเครื่องมือศึกษา TTR amyloidosis เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาโดยอาศัย recombinant V30M และ L55P เป็นเครื่องมือ พบว่า L55P ถูกชักนำให้เกิดเป็น soluble aggregate ด้วยสภาวะกรดได้รวดเร็วกว่า V30M รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ทั้งชนิด F-N และ F-DS รวมทั้งนิวโรบลาสต์ (neuroblast) ชนิด LAN-5 และ ลิมโฟบลาสต์ (lymphoblast) ที่สูงกว่า V30M นอกจากนี้ จากการศึกษาเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ชนิด F-DS มีความไวต่อพิษของ soluble aggregated TTR มากที่สุด

คำสำคัญ : พิษต่อเซลล์ ; ไฟโบรบลาสต์ ; ลิมโฟบลาสต์ ; นิวโรบลาสต์ ; รีคอมบิแนนต์โปรตีน



Abstract

Transthyretin (TTR) is one of the thyroxine transport protein in the plasma and cerebrospinal fluid. It is a 55-kDa homotetrameric protein. The mutation of TTR gene that leads to a single amino acid change of TTR protein will result in the TTR variant, which is the major cause of TTR amyloidosis. TTR mis-folding into toxic amyloid fibril found deposited and resulting in dysfunction of the nervous system. Among the identified TTR variants, V30M (methionine for valine substitution at position 30) is the most common type; whereas, L55P (proline for leucine substitution at position 55) is the most aggressive type. To evaluate amyloidogenicity of TTR variants, cytotoxicity assay is a primary assessment; however, the sensitivity and specificity of cell to TTR amyloid are the effectiveness factors of the assay. The objective of this research is to comparatively study on the responsiveness of human cell types to the toxicity of TTR amyloid in order to identify more cell that is sensitive and appropriate for using as a tool in the study of TTR amyloidosis. By using recombinant V30M and L55P as tools, it revealed that L55P was induced by acidic condition to form a soluble aggregate faster than V30M, and it was more toxic to the studied cells including fibroblasts (F-N and F-DS), neuroblast (LAN-5) and lymphoblast than V30M. In addition, the comparatively results showed that F-DS cells were the most sensitive to the toxicity of soluble aggregated TTRs.

Keywords : cytotoxicity ; fibroblast ; lymphoblast ; neuroblast ; recombinant protein

บทนำ

Amyloidosis เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางโครงสร้างของโปรตีนตั้งต้น (precursor protein) ที่มีการม้วนพับผิดไปจากธรรมชาติ ส่งผลให้โปรตีนมีสมบัติที่เปลี่ยนไปจากเดิม โดยเฉพาะความสามารถในการละลายน้ำลดลง เกิดการรวมตัวเป็นก้อน amyloid (amyloid fibril) สะสมตามเนื้อเยื่อและอวัยวะของร่างกาย (for review, see Tan *et al.*, 1995) ก่อให้เกิดการขัดขวางต่อการทำงาน ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในที่สุด จนถึงปัจจุบัน ได้มีการค้นพบโปรตีนตั้งต้นหลายชนิด รวมทั้ง transthyretin (TTR) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa มีแหล่งสังเคราะห์หลักในร่างกาย คือ ที่ตับและ choroid plexus ของสมอง และบางส่วนของเรตินา ตับอ่อน ไต และ เซลล์ประสาทบางชนิด (Casella *et al.*, 2013) ทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งฮอร์โมน thyroxine

ความผิดปกติหรือการกลายพันธุ์ของยีนโปรตีน TTR เป็นสาเหตุของโรค TTR amyloidosis (Christmanon *et al.*, 1991; Sousa and Saraiva, 2003; Barreiros *et al.*, 2015) เนื่องจากทำให้โปรตีนหน่วยย่อยมีการพับม้วน (protein folding) ที่ผิดปกติ ส่งผลให้ความเสถียรทางโครงสร้าง tetramer ลดลง เมื่อสภาวะแวดล้อมในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลง TTR ในรูป tetramer จึงมีแนวโน้มสูงที่จะเกิดการแยกตัวออกเป็นหน่วยย่อยที่ไม่สามารถกลับมารวมตัวเป็นโครงสร้าง tetramer ได้ดังเดิม แต่จะมีการพัฒนาไปเป็นก้อน amyloid ด้วยกระบวนการ fibrillation โดยมีขั้นตอนเริ่มจากหน่วยย่อยจับตัวกันเป็นโมเลกุลคู่ (dimers) แล้วพัฒนาไปเป็น oligomers หรือ soluble aggregate ขนาดเล็ก และ amyloid fibril หรือ aggregate ที่มีขนาดใหญ่ ในที่สุด (Dasari *et al.*, 2019, 2020; Ferreira *et al.*, 2019) จากงานวิจัยที่ผ่านมาหลายชิ้น ชี้และยืนยันว่า soluble aggregate เป็นรูปแบบของโปรตีน ที่ทำให้เกิดพิษและนำสู่การตายของเซลล์สูงที่สุด (Dasari *et al.*, 2019) การสะสมของ TTR amyloid fibril มักพบตามเนื้อเยื่อระบบประสาท สมอง และไขสันหลัง ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาทรอบนอก ทำให้การรับรู้ความรู้สึกของร่างกายทำงานช้าลงและกล้ามเนื้ออ่อนแรง เป็นต้น รวมทั้งส่งผลกระทบต่อระบบประสาทอัตโนมัติ และอวัยวะสำคัญต่าง ๆ เช่น หัวใจ ตา เป็นต้น (for review, see Richardson, 2007) โรค TTR amyloidosis นี้สามารถจำแนกได้ตามชนิดของ TTR ที่เป็นสาเหตุ คือ senile systemic amyloidosis (SSA) เกิดจากการสะสม amyloid ของ TTR ชนิด wild-type (WT) มักพบในผู้สูงอายุ 80 ปีขึ้นไป (Sorgjerd *et al.*, 2008; Saelice *et al.*, 2015) และ familial amyloidosis (familial amyloid polyneuropathy; FAP และ familial amyloid cardiomyopathy; FAC) ที่เกิดจาก TTR กลายพันธุ์ (TTR variant) โดยที่ FAP ส่งผลกระทบต่อระบบประสาท พบได้ในผู้ที่มีอายุตั้งแต่วัยรุ่นจนถึง 60 ปี ในขณะที่ FAC ส่งผลกระทบต่อระบบหัวใจ พบในคนที่มีความอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป (Jacobson & Buxbaum, 1991) ผลจากการวิจัยจนถึงปัจจุบัน พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบนโมเลกุล TTR มากกว่า 48 ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับโรค TTR amyloidosis (for review, see Park *et al.*, 2019) โดยที่ TTR variant ชนิด V30M (กรดอะมิโนวาลีน ที่ตำแหน่ง 30 ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนเมไทโอนีน) เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรค FAP ที่พบได้บ่อยที่สุด และ L55P (กรดอะมิโนลิวซีน ที่ตำแหน่ง 55 ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนโพโรลีน) เป็นชนิดที่เกิดเป็น amyloid fibril ได้เร็วและก่อให้เกิดอาการรุนแรงที่สุด (Jacobson *et al.*, 1992; Lashuel *et al.*, 1998) และ TTR variant ทั้ง 2 ชนิดนี้ มักถูกใช้เป็นเครื่องมือในการทดสอบเพื่อหาวิธีการรักษาหรือยับยั้งโรค TTR amyloidosis

เนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักในการสร้าง TTR การรักษาโรค TTR amyloidosis ด้วยการเปลี่ยนถ่ายตับ (Orthotopic liver transplantation; OLT) นับว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับมากที่สุด (Holmgren *et al.*, 1993; Hund *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวยังไม่สามารถประสบความสำเร็จในระยะยาว เนื่องจาก TTR ยังคงมีการสังเคราะห์ที่อวัยวะอื่น ๆ ได้ จึงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาวิธีการรักษาโดยวิธีการอื่น ซึ่งพบว่าสารโมเลกุลขนาดเล็กบางชนิดที่ช่วยให้ TTR มีความสามารถในการคงรูปโครงสร้างจตุรภูมิ (TTR tetramer) เพิ่มขึ้น (Peterson *et al.*, 1998) สามารถชะลอการเกิดเป็น amyloid fibril และอาการของโรคได้ นำสู่การรักษาโดยเพิ่มการคงรูปให้กับ TTR กลายพันธุ์ (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2003; Kawas, 2006; Garcia-Alloza *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2013) ซึ่งการค้นหายาขนาดเล็กด้วยการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อใช้เป็นยารักษาแบบใหม่นั้น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือและตัวชี้วัดที่สำคัญในการประเมินผลทางชีวภาพของสารเป้าหมาย โดยที่ชนิดของเซลล์ที่เลือกใช้ในการทดสอบนั้นเป็นปัจจัยสำคัญต่อความถูกต้องของผลประเมินที่ได้รับจากการทดสอบ งานวิจัยชิ้นนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อความเป็นพิษของ TTR ของเซลล์มนุษย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลของความไวและความเหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์และศึกษาโรค TTR amyloidosis ที่เกิดจาก TTR กลายพันธุ์

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมโปรตีน TTR กลายพันธุ์ ชนิด V30M และ L55P

ในการผลิตโปรตีน V30M และ L55P อาศัยยีสต์ *Pichia pastoris* strain GS115 (*P. pastoris*) ที่มี cDNA ของ TTR กลายพันธุ์ดังกล่าว โดยวิธีการที่เคยมีการรายงาน (Kaewmeechai *et al.*, 2019) โดยเริ่มจาก ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวของ *P. pastoris* บนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารแข็ง yeast peptone dextrose (YPD) มาเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด buffered medium containing glycerol (BMGY) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ด้วยเทคนิค centrifugation ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวชนิด buffered methanol complex medium (BMMY) เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตและหลั่งโปรตีนเป้าหมายออกสู่ภายนอกเซลล์ ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นระยะเวลา 3 วัน ตามวิธีการที่เคยมีการรายงาน (Prapunpoj *et al.*, 2002) กล่าวคือ ทำการสูบล้างน้ำเพาะเลี้ยงหลังการกระตุ้นในแต่ละวัน เพื่อนำไปแยกเอาเซลล์ออกและวิเคราะห์หาปริมาณการสังเคราะห์ TTR ในสารละลายส่วนใส ด้วยวิธี 10% Native-PAGE (10% separating และ 4% stacking gel) และทำการย้อมสีด้วย silver staining เมื่อทำการกระตุ้นครบ 3 วันแล้ว จึงทำการเก็บน้ำเพาะเลี้ยงทั้งหมด เพื่อทำการปั่นแยกเอาเซลล์ออก แล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ ไปเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีการ ultrafiltration และแยก TTR กลายพันธุ์ที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี preparative native PAGE (12% resolving gel และ 4% stacking gel; Prep Cell 491) แล้วจึงทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี 10% Native-PAGE และ 12% SDS-PAGE (12% separating และ 4% stacking gel) และย้อมสีด้วยวิธี Coomassie blue staining จากนั้น นำโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้วไปเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีการ ultrafiltration และทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane ขนาด 0.2 µm รวมทั้งหาปริมาณด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) ก่อนนำไปเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การเตรียม V30M และ L55P ให้อยู่ในรูป soluble aggregates

เตรียม V30M และ L55P ให้อยู่ในรูป soluble aggregates โดยเจือจางโปรตีนเป้าหมายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 M sodium acetate, pH 4.2, 0.4 M KCl, 0.4 mM EDTA) ที่ปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 μ M จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงปรับสภาพสารละลายให้ค่า pH เป็นกลาง นำไปวิเคราะห์โครงสร้างในรูป soluble aggregate ด้วยวิธี 12% SDS-PAGE ในสถานะที่มีความแตกต่างของปัจจัย คือ อุณหภูมิและสารตีรัวซ์ (β -mercaptoethanol) แล้วทำการย้อมสีด้วยวิธี Coomassie blue staining เพื่อเปรียบเทียบผล และยืนยันผลอีกครั้งด้วย 10% Native-PAGE และย้อมด้วย silver staining

การเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษาค้นคว้านี้ได้รับอนุเคราะห์เซลล์ไลน์ของมนุษย์ชนิดนิวโรบลาสต์ (LAN-5), ไฟโบรบลาสต์ (ชนิด F-N และ F-DS) และ ลิมโฟบลาสต์ จากสถาบันรามาธิบดี โดยที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด F-N และ F-DS เป็นเซลล์ที่สถาบันฯ พัฒนาจากเซลล์ชั้นผิวหนังของคนปกติและผู้ที่มีอาการดาวนซินโดรม ตามลำดับ ในขณะที่ เซลล์ลิมโฟบลาสต์พัฒนามาจากการชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยไวรัสชนิด Epstein-Barr สายพันธุ์ EBV-95

เพื่อใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ เซลล์ไลน์ดังกล่าวถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ ทำการเลี้ยงเซลล์ชนิดนิวโรบลาสต์ (LAN-5) และไฟโบรบลาสต์ ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 2 mM L-glutamine, 50 Units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% และ 5% CO₂ ในขณะที่เซลล์ลิมโฟบลาสต์ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI-1640 ที่ประกอบไปด้วย 10% FBS ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% และ 5% CO₂

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของ V30M และ L55P ต่อเซลล์

กรณีใช้เซลล์นิวโรบลาสต์และไฟโบรบลาสต์ในการทดสอบ: ทำการแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.25% Trypsin-EDTA แล้วจึงนำไปใส่ลงในหลุมทดสอบ (96-well plate) โดยแต่ละหลุมมีปริมาณของเซลล์นิวโรบลาสต์และไฟโบรบลาสต์ เท่ากับ 4×10^4 เซลล์ และ 2×10^3 เซลล์ ตามลำดับ จากนั้นบ่มเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเกาะของเซลล์กับหลุมทดสอบ ก่อนทำการทดสอบ

กรณีใช้เซลล์ลิมโฟบลาสต์ในการทดสอบ: ทำการแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยว โดยใช้ปิเปตเป่าเบาๆ จากนั้นนำเซลล์ใส่ลงในหลุมทดสอบ ที่มีปริมาณของเซลล์ในแต่ละหลุม เท่ากับ 10^4 เซลล์ บ่มเซลล์ไว้เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ก่อนทำการทดสอบ

ทำการปรับสภาพของสารละลาย soluble aggregated V30M และ L55P ให้กลับมาเป็นกลาง และมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 และ 2 μ M ด้วยอาหารเลี้ยงที่ปราศจากซีรั่ม ที่มี 0.4 M HEPES-NaOH, pH 10 เป็นองค์ประกอบ (ใช้อาหารเลี้ยงชนิด DMEM สำหรับเซลล์นิวโรบลาสต์และไฟโบรบลาสต์ ใช้อาหารเลี้ยงชนิด RPMI-1640 สำหรับเซลล์ลิมโฟบลาสต์ และใช้อาหารเลี้ยงผสมกับ 0.4 M HEPES-NaOH, pH 10 เป็นตัวควบคุม) แล้วทำการบ่มกับเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95% และ 5% CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงประเมินการรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole; บริษัท Roche Life Science) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาดำเนินการ

microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm และความยาวคลื่นอ้างอิง 650 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ ตามวิธีการของบริษัท เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับโปรตีนทดสอบ

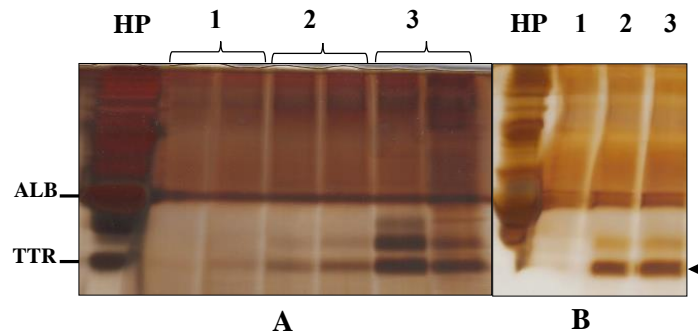
การวิเคราะห์ข้อมูลและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการใช้ Two-way ANOVA สำหรับการเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์และโปรตีนทุกชนิดที่ทดสอบและใช้ One-way ANOVA สำหรับการเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์แต่ละชนิดกับโปรตีนที่สภาวะเดียวกัน (โปรตีนชนิดเดียวกันและความเข้มข้นเดียวกัน) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

การผลิตและวิเคราะห์โปรตีน TTR กลายพันธุ์ ชนิด V30M และ L55P

เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ยีสต์ที่มี cDNA ของ TTR กลายพันธุ์ V30M หรือ L55P ด้วยเมทานอลเป็นเวลา 3 วัน พบว่า TTR กลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิด ได้มีการผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ยีสต์ได้ในรูป tetramer (ภาพที่ 1) โดยที่การผลิต V30M (ภาพที่ 1A) และ L55P (ภาพที่ 1B) เกิดขึ้นตั้งแต่วันแรกของการกระตุ้นด้วยเมทานอล และปริมาณการผลิตเพิ่มสูงมากที่สุดในวันที่สามของการกระตุ้น นอกจากนี้ พบการสังเคราะห์โปรตีนอื่นที่ไม่ใช่ TTR ร่วมด้วย ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการกระตุ้น โดยเฉพาะในการผลิต V30M

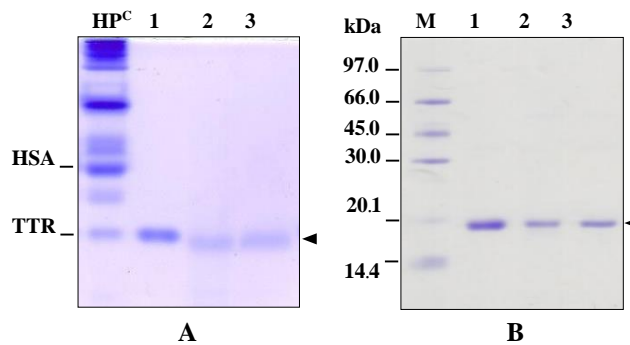


ภาพที่ 1 การวิเคราะห์การผลิต V30M (A) และ L55P (B) หลังการกระตุ้นด้วยเมทานอล โดย Native-PAGE

และย้อมด้วย silver staining 1, 2 และ 3 แสดงถึงจำนวนวันที่เซลล์ยีสต์ได้รับการกระตุ้นด้วยเมทานอล; HP คือ พลาสมา ที่ใช้เป็น marker เพื่อระบุตำแหน่งของ TTR ในพลาสมา; ALB และ TTR คือ ตำแหน่ง อัลบูมินและ TTR ในพลาสมา ตามลำดับ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าภายใต้สภาวะธรรมชาติที่ทดสอบโดยอาศัยเทคนิค Native-PAGE ของ TTR กลายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative Native-PAGE แล้วนั้น พบว่า ทั้ง V30M และ L55P ที่ผลิตได้ในรูป tetramer เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอัลบูมินในพลาสมาและเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า TTR ปกติที่อยู่ใน

พลาสมาเล็กน้อย (ภาพที่ 2A) ในขณะที่ ทั้ง V30M และ L55P เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าภายใต้สภาวะสูญเสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งทดสอบโดยอาศัยเทคนิค SDS-PAGE ได้ในอัตราเร็วเท่ากับ TTR ปกติ (ภาพที่ 2B) และเมื่อคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย (monomer) จากค่าการเคลื่อนที่ภายใต้สภาวะสูญเสียสภาพธรรมชาติ ที่สัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (Rf values) พบว่าทั้ง TTR ปกติ และ TTR กลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วงประมาณ 17-20 กิโลดาลตัน

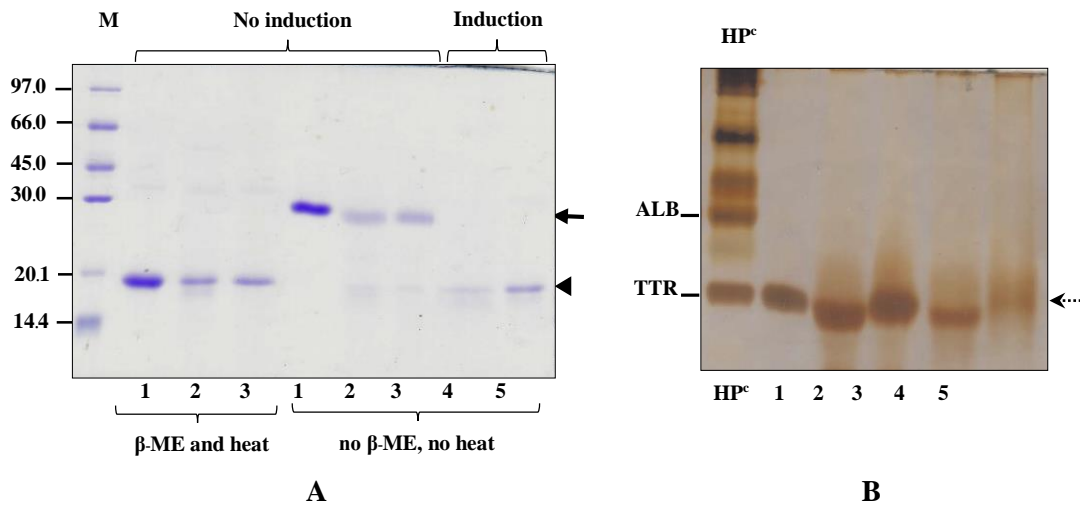


ภาพที่ 2 แสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบสมบัติการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าภายใต้สภาวะสภาพธรรมชาติ และขนาดน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของ TTR ปกติ (1), V30M (2) และ L55P (3) โดยอาศัย 10% Native-PAGE (A) และ 12% SDS-PAGE (B) และย้อมด้วย Coomassie blue staining HP^c คือ พลาสมาที่ได้ลดปริมาณอัลบูมินบางส่วนออกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) ที่มี Cibacron Blue 3GA เป็นลิแกนด์ (ligand) และใช้เป็น marker เพื่อแสดงตำแหน่งของ TTR ในพลาสมา; M คือ low molecular weight protein markers

เปรียบเทียบรูปแบบของ V30M และ L55P ก่อนและหลังการชักนำให้เกิดเป็น soluble aggregates

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงจาก TTR tetramer ไปเป็น amyloid fibril นั้น มีขั้นตอนเริ่มจากการแยก TTR tetramer ไปเป็นหน่วยย่อย (monomer) ก่อน จากนั้น หน่วยย่อยเหล่านี้จึงมีการจับและรวมตัวกันในรูปของโมเลกุลคู่ (dimers) soluble aggregated (หรือ oligomers) และ amyloid fibril ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ (Dasari *et al.*, 2019, 2020) นอกจากนี้ กระบวนการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว สามารถชักนำให้เกิดขึ้นได้ในหลอดทดลอง ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ในการทดลองครั้งนี้ จึงได้ทำการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ TTR กลายพันธุ์ทั้ง V30M และ L55P ด้วยสภาวะที่เป็นกรด และเปรียบเทียบรูปแบบก่อนและหลังชักนำ กับ TTR ปกติ โดยอาศัย 12% SDS-PAGE ที่ไม่เติม β -mercaptoethanol และไม่ทำการต้ม พบว่าทั้ง V30M และ L55P ที่ถูกชักนำด้วยกรดมีโครงสร้างในรูปแบบหน่วยย่อย (monomer) ที่มีน้ำหนักประมาณ 17-20 kDa โดยไม่พบโครงสร้างในรูปแบบโมเลกุลคู่ (dimer) ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28-30 kDa ในขณะที่ TTR ปกติ V30M และ L55P ที่ไม่ได้ผ่านการชักนำด้วยสภาวะกรด สามารถสังเกตเห็นได้ทั้ง

โครงสร้างแบบหน่วยย่อยและโมเลกุลคู่ (ภาพที่ 3A) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ด้วย 10% Native-PAGE (ภาพที่ 3B) ยืนยันการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างไปเป็น soluble aggregate ของ TTR กลายพันธุ์ โดยที่ ทั้ง V30M และ L55P มีโครงสร้างจตุรภูมิ (TTR tetramer) ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการชักนำด้วยสภาวะกรด (ภาพที่ 3B เลน 4-5) กล่าวคือ แถบโปรตีน ณ ตำแหน่งของ TTR มีความเข้มเพิ่มขึ้นและสีที่จางลงกว่า TTR ที่ไม่ได้ผ่านการชักนำด้วยสภาวะกรด นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง V30M และ L55P ที่ถูกชักนำด้วยสภาวะกรด พบว่าแถบโปรตีน L55P มีความเข้มเพิ่มขึ้นและสีที่จางลงมากกว่าแถบโปรตีน V30M อย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 3B เลน 4-5)



ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ด้วย 12% SDS-PAGE ย้อมเจลดด้วย Coomassie blue staining (A) และ 10% Native-PAGE ย้อมเจลดด้วย silver staining (B) เพื่อแสดงผลการชักนำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ V30M และ L55P ด้วยสภาวะกรด M คือ molecular weight markers; 1, 2, 3 คือ TTR ปกติ, V30M และ L55P ที่ไม่ได้มีการชักนำด้วยสภาวะกรด ตามลำดับ; 4 และ 5 คือ V30M และ L55P ที่มีการชักนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็น soluble aggregates ด้วยสภาวะกรด ตามลำดับ; HP^c คือ พลาสมาที่ผ่านการกำจัดอัลบูมินออกบางส่วนออกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography) ที่มี Cibacron Blue 3GA เป็นลิแกนด์ (ligand); ตำแหน่ง monomer และ dimer ของ TTR แสดงด้วยหัวลูกศรและลูกศร ตามลำดับ; ALB และ TTR คือ ตำแหน่งอัลบูมินและ TTR ในพลาสมา; ตำแหน่งที่ตรงกับ native TTR ใน HP^c แสดงด้วยลูกศรเส้นประ

ผลการทดสอบความเป็นพิษของ V30M และ L55P ต่อเซลล์ชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ ระหว่าง V30M และ L55P ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูป และที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปภายหลังการชักนำด้วยสภาวะกรดไปเป็น soluble aggregates โดยวิธี MTT และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 4) นั้น พบว่าที่ความเข้มข้นเพียง 2 μM สามารถเห็นผลความ



เป็นพิษของโปรตีน V30M และ L55P ได้ โดยที่ soluble aggregated V30M แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด F-DS > Lymphoblast > F-N > Neuroblast โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แต่ละชนิด เท่ากับ $40.90 \pm 2.37\%$, $48.35 \pm 11.30\%$, $50.36 \pm 4.86\%$ และ $54.83 \pm 2.71\%$ ตามลำดับ สำหรับ L55P ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีพิษต่อเซลล์ชนิด F-DS > Neuroblast > F-N > Lymphoblast โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์แต่ละชนิด เท่ากับ $13.52 \pm 3.62\%$, $36.32 \pm 1.91\%$, $38.27 \pm 1.78\%$ และ $40.14 \pm 12.30\%$ ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ห้ข้อมูลด้วย One-way ANOVA แสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิดที่ได้ศึกษาในครั้งนี้ เซลล์ชนิด F-DS เป็นเซลล์ที่มีความไวต่อความเป็นพิษของทั้ง V30M และ L55P ที่ความเข้มข้น $2 \mu\text{M}$ สูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

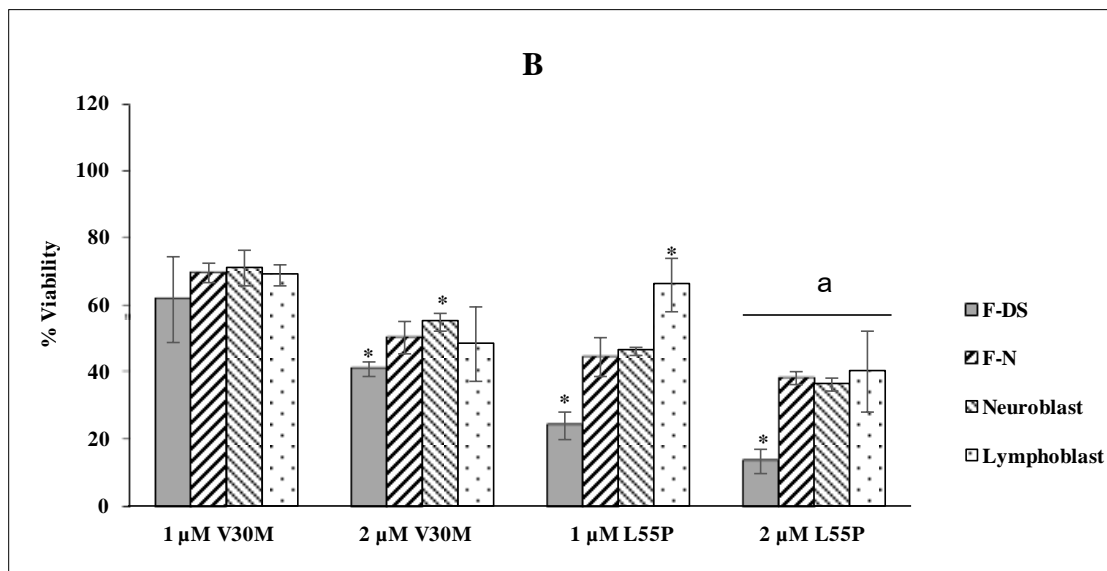
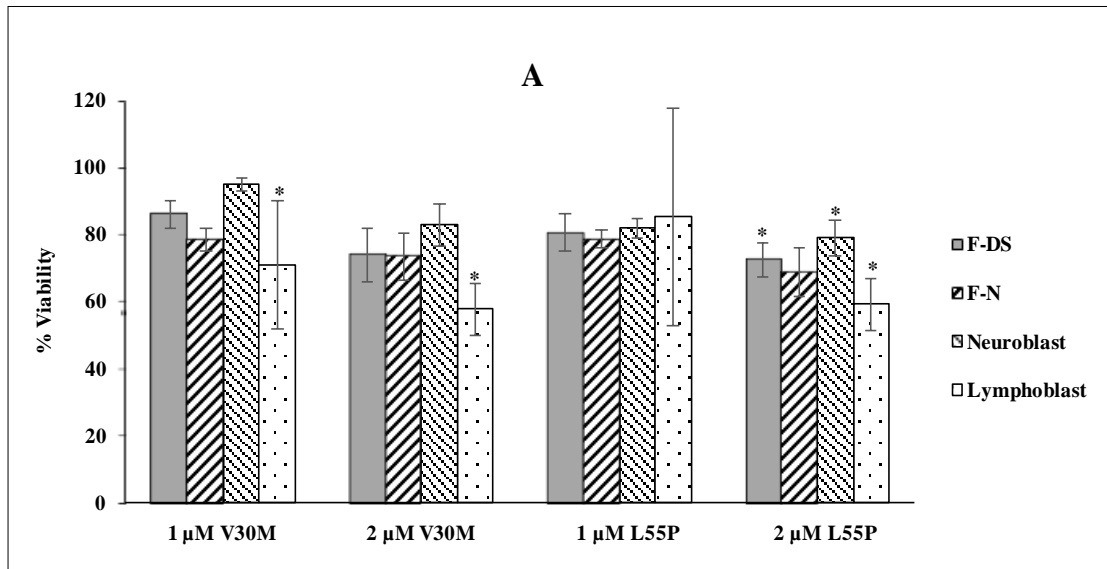
ผลจากการศึกษาลักษณะภายนอกของเซลล์ภายหลังการบ่มกับ TTR แต่ละชนิด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเมื่อทดสอบกับ V30M และ L55P ก่อนชักนำด้วยสภาวะกรด เซลล์ไฟโบรบลาสต์และนิวโรบลาสต์ที่ใช้ทดสอบ มีรูปร่างหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยทั่วไป ไม่แตกต่างจากเซลล์ในชุดควบคุม (control) ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ ในทางกลับกันเมื่อทดสอบกับ soluble aggregate ทั้ง V30M และ L55P ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ $2 \mu\text{M}$ พบเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติ โดยเฉพาะเซลล์ F-DS พบจำนวนเซลล์ที่มีลักษณะบวม (คาดว่าเกิด blebbing) หรือเปลี่ยนแปลงไปจากที่สังเกตได้จากเซลล์ชุด control เพิ่มมากขึ้น หลังการทดสอบกับ 1 และ $2 \mu\text{M}$ soluble aggregate (ภาพที่ 5) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองด้วยวิธี MTT

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ทดสอบเมื่อได้รับ TTR ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT

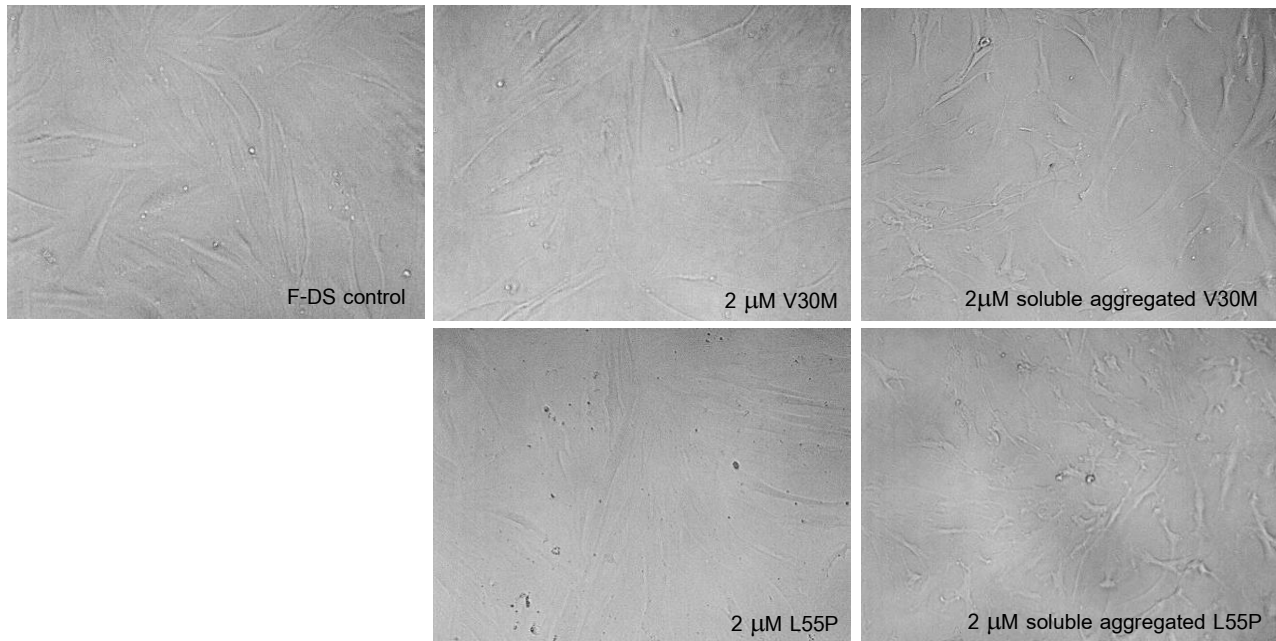
ชนิดของ TTR	ความเข้มข้น	ชนิดเซลล์				P-value ($\alpha = 0.05$)	
		F-DS	F-N	LAN-5	ลิมโฟบลาสต์		
การรอดชีวิตของเซลล์ (%)							
V30M	Non- aggregate	1 μM	86.14 ± 4.28	78.77 ± 3.41	95.00 ± 1.85	$70.92 \pm 19.18^*$	0.01
	aggregate	2 μM	73.97 ± 8.14	73.50 ± 6.84	82.78 ± 6.28	$57.84 \pm 7.81^*$	0.01
	Soluble	1 μM	61.70 ± 12.94	69.64 ± 3.00	70.83 ± 5.35	68.94 ± 2.98	0.23
	aggregate	2 μM	$40.90 \pm 2.37^*$	50.36 ± 4.86	$54.83 \pm 2.71^*$	48.35 ± 11.30	0.023
L55P	Non- aggregate	1 μM	80.57 ± 5.54	78.77 ± 2.75	81.97 ± 2.98	85.39 ± 32.45	0.92
	aggregate	2 μM	$72.56 \pm 5.06^*$	68.83 ± 7.32	$79.06 \pm 5.33^*$	$59.14 \pm 7.77^*$	0.00
	Soluble	1 μM	$23.98 \pm 3.94^*$	44.51 ± 5.80	46.17 ± 1.18	$66.10 \pm 7.92^*$	0.00
	aggregate	2 μM^*	$13.52 \pm 3.62^*$	38.27 ± 1.78	36.32 ± 1.91	40.14 ± 12.30	0.00

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากการทดลอง 5 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย One-way ANOVA ระหว่างเซลล์แต่ละชนิดกับโปรตีนสภาวะเดียวกัน ที่ $p < 0.05$



ภาพที่ 4 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ TTR กลายพันธุ์และความเข้มข้นที่ใช้กับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ได้รับ V30M และ L55P ที่ไม่ได้ชักนำ (A) และ ที่ชักนำให้เกิดเป็น soluble aggregates ด้วยสภาวะกรด (B) กับเซลล์ชนิดต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์แต่ละชนิดที่ได้รับโปรตีนชนิดเดียวกัน ที่ $p < 0.05$ โดย One-Way ANOVA และ a แทนความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนที่ต่างชนิดกันในแต่ละเซลล์ โดย Two-Way ANOVA; error bar แสดงค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการรอดชีวิตของเซลล์)



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเซลล์ F-DS ชุดควบคุม (F-DS control) กับเซลล์ที่ทำการบ่มกับ V30M และ L55P ทั้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดเป็น soluble aggregates ที่ความเข้มข้น 2 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับกำลังขยาย 10X

วิจารณ์ผลการวิจัย

เนื่องจากยีนของ TTR กลายพันธุ์ถูกนำใส่เข้าไประหว่างลำดับเบส AOX1 promoter และ terminator ของ expression vector ที่ใช้เป็นพาหะนำยีนเข้าสู่เซลล์ยีสต์ โดยที่การทำงานของ AOX1 promoter ถูกกระตุ้นได้ด้วยเมทานอล และส่งผลทำให้ยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ AOX1 promoter สามารถเกิดการแสดงออกได้ (Vogl and Glieder, 2013) การสังเคราะห์ V30M และ L55P ในการทดลองครั้งนี้ ยีนของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ถูกควบคุมและสามารถแสดงออกได้อย่างสมบูรณ์ ภายใต้การทำงานของ AOX1 promoter เช่นเดียวกับที่เคยมีการรายงานในครั้งก่อนหน้า (Kaewmeechai *et al.*, 2019)

การใช้ *P. pastoris* เป็นเครื่องมือในการผลิตโปรตีนเป้าหมาย มีข้อดีและได้เปรียบกว่าการใช้ระบบการผลิตโปรตีนของแบคทีเรีย คือ ยีสต์มีกระบวนการ posttranslational modifications เช่นเดียวกับที่พบในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต โดยเฉพาะ การม้วนพับของโปรตีน (protein folding) และการเติมน้ำตาล (glycosylation) (Cereghino and Cregg, 2000) นอกจากนี้ ยีสต์จะหลั่งโปรตีนที่เป็นโปรตีนลูกผสมออกสู่ภายนอกเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ทำให้ง่ายต่อการแยกโปรตีนเป้าหมายในขั้นตอนต่อไป โดยเฉพาะ การอาศัยเทคนิค preparative native-PAGE อย่างไรก็ตาม มีการรายงานถึงผลกระทบจากการเติมน้ำตาลบนโมเลกุลของโปรตีนที่ผลิตโดยอาศัยระบบของยีสต์ต่อโครงสร้างและการทำงานที่ไม่สมบูรณ์ของโปรตีนดังกล่าว

(for review, see Daly & Hearn, 2005) เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนของ TTR ในคน พบว่ามีตำแหน่งกรดอะมิโนที่สามารถเกิดการเติมน้ำตาลได้ อย่างไรก็ตาม ในธรรมชาติไม่พบการเติมน้ำตาลบนโมเลกุลของ TTR ในคนปกติ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของ TTR ภายพันธุ์ โดยวิธี Native-PAGE และ SDS-PAGE ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมา กล่าวคือ TTR ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง ยกเว้น หมู (Duan *et al.*, 1995) สามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าภายใต้สภาวะธรรมชาติเร็วกว่าอัลบูมิน และน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของ TTR ในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ได้มีการศึกษาส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 15-20 kDa (Prapunpoj *et al.*, 2000, 2002; Tola *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังสนับสนุนได้ว่า ทั้ง V30M และ L55P ที่ผลิตได้ในการศึกษานี้ มีโครงสร้างที่อยู่ในรูปแบบ tetramer ที่มีการม้วนพับอย่างสมบูรณ์และไม่เกิดการเติมน้ำตาลที่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างทั้งในระดับหน่วยย่อยและจตุรภูมิ ตลอดจนการทำหน้าที่ของ TTR ภายพันธุ์ที่ผลิตได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่า TTR ที่อยู่ในรูป soluble aggregate ซึ่งเป็นกระบวนการเริ่มต้นในการเกิดเป็น fibril นั้นส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงและรุนแรงกว่าที่อยู่ในรูปก้อน fibril (Sorgierd *et al.*, 2008) ยิ่งไปกว่านั้นในสภาวะที่เป็นกรด (pH 4.4) TTR สามารถเปลี่ยนโครงสร้างจากจตุรภูมิ (TTR tetramer) เป็นโมเลกุลย่อย (monomer) ได้อย่างรวดเร็ว (Lashuel *et al.*, 1998) ในทางกลับกันหากมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น (pH 2-3) การเกิดเป็น aggregated form ของ TTR ภายพันธุ์ (V30M และ L55P) จะช้าลง ยิ่งไปกว่านั้นสำหรับในสภาวะร่างกายมนุษย์ TTR อาจจะถูกชักนำในสภาวะกรดอ่อนๆ ได้ เช่น lysosomes (Dasari *et al.*, 2020) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาว่าผู้ป่วยที่เกิดจากโรคที่เกี่ยวข้องกับ TTR amyloidosis ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ TTR จะเกิดขึ้นได้กับคนที่อายุน้อย แต่สำหรับ TTR ปกติมักพบได้ในคนสูงอายุ สำหรับในการวิจัยนี้ ได้ทำการชักนำ TTR ภายพันธุ์ด้วยสภาวะที่เป็นกรด ให้อยู่ในรูป soluble aggregate ที่ pH 4.2 โครงสร้างของโปรตีนได้เปลี่ยนเป็น soluble aggregate ซึ่งให้เห็นว่าชนิดของกรดอะมิโนและ/หรือตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ส่งผลถึงสภาพการคงตัวหรืออัตราการสูญเสียสภาพของ TTR ภายพันธุ์แต่ละชนิดในระดับที่แตกต่างกันด้วย โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง V30M และ L55P ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า L55P เกิด aggregation หลังจากชักนำด้วยสภาวะกรดได้เร็วกว่า V30M สอดคล้องกับที่มีการรายงานเอาไว้ก่อนหน้านี้ว่า ในบรรดา TTR ภายพันธุ์ชนิดต่างๆ นั้น L55P เป็นชนิดที่พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น amyloidogenic protein ได้มากที่สุด เนื่องจากอยู่ในตำแหน่งส่วนปลายของสาย D ซึ่งเป็นหนึ่งใน β -sandwich ที่จับเป็นคู่กัน (DAGH และ CBEF) (Yang *et al.*, 2003) เพื่อเกิดเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ และจากรายงานการวิจัย แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่เป็นกรด พันธะไฮโดรเจนที่ใช้ยึดกันของหน่วยย่อยให้เป็นโครงสร้างทุติยภูมิ สำหรับ L55P นั้นมีจำนวนลดลงไปจากเดิม ส่งผลให้ L55P เกิดเป็น fibril ได้ง่ายและเร็วขึ้น (Xue *et al.*, 2014) สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ทำการชักนำเฉพาะ TTR ภายพันธุ์ชนิด V30M และ L55P เนื่องด้วยชนิด V30M เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อย ในขณะที่ L55P นั้น เป็นชนิดที่เกิด amyloid fibril ได้เร็ว และก่อให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในสภาวะกรดอ่อนๆ (pH 4 – 5) ทั้ง V30M และ L55P เกิดเป็น aggregates ได้มากและรวดเร็วกว่า TTR ปกติ (Dasari *et al.*, 2020) และเมื่อนำ TTR ภายพันธุ์ทั้งสองชนิดไปทดสอบความเป็นพิษที่มีต่อเซลล์ต่างๆ พบว่าทั้ง V30M และ L55P ที่ถูกชักนำให้เกิดเป็น soluble aggregate มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งความเข้มข้นที่ 1 และ 2 μ M (เทียบเท่า 0.055 และ 0.11 μ g/ μ l ตามลำดับ) ซึ่งเป็นความ

เข้มข้นที่ใกล้เคียงกับในเลือดของคน (0.02-0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Lashuel *et al.*, 1998) โดยเฉพาะ L55P ที่ความเข้มข้น 2 μM ในรูปแบบ soluble aggregate มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิดมากที่สุด

เนื่องจาก TTR amyloidosis เป็นโรคระดับทั่วร่างกาย (systemic disease) การสะสมของ TTR amyloid สามารถพบได้ในหลายระบบ (ซึ่งที่สำคัญคือ ระบบประสาทและสมอง) หลายอวัยวะและหลายเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อผิวหนัง (skin) เนื้อเยื่อไขมันรองฝ่าเท้า (fat pad) ผนังลำไส้ใหญ่ (rectal mucosa) เยื่อบุกระเพาะอาหาร (gastric mucosa) เนื้อเยื่อประสาท (nerve tissue) และ กล้ามเนื้อหัวใจ (myocardium) (Kurian *et al.*, 2013; Ruberg and Berk, 2012) การวินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุมาจาก TTR amyloid จึงมักนิยมใช้วิธีการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue biopsy) จากอวัยวะที่มีอาการผิดปกติ รวมทั้งเลือกใช้เซลล์จากระบบประสาทและสมอง เช่น เซลล์ IMR-32 (Reixach *et al.*, 2004) และ SH-SY5Y (Wang *et al.*, 2014) ในการทดสอบความเป็นพิษของ TTR กลายพันธุ์ สำหรับงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการค้นหาเซลล์ที่มีความไวอย่างจำเพาะต่อพิษของ TTR amyloid เพิ่มเติม นักวิจัยจึงได้เลือกใช้เซลล์ชนิดต่าง ๆ กัน ในการทดสอบ โดยที่เซลล์ที่เลือกใช้นั้น เป็นเซลล์ในกลุ่มของระบบประสาทและสมอง (LAN-5) เซลล์ในระบบน้ำเหลืองและเลือด (lymphoblast) และ เนื้อเยื่อผิวหนัง (Fibroblast; F-N และ F-DS) ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า F-DS เป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อพิษของ TTR กลายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว แต่กลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยก่อนหน้านี้เชื่อว่าเป็นผลมาจาก TTR จับบนเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ตรงบริเวณภายนอกที่เป็นส่วนประกอบของไขมันโดยตรง ส่งผลให้เกิดการไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane fluidity) (Hou *et al.*, 2005) จากสาเหตุดังกล่าวนี้ เป็นไปได้ว่าเซลล์ที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปโดยมีการบวม หรือ blebbing มากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น จากการวิเคราะห์โดยอาศัย Two-way ANOVA ชี้ให้เห็นว่า L55P ในรูปแบบ soluble aggregate ที่ความเข้มข้น 2 μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ TTR ทุกชนิดและที่ทุกความเข้มข้น ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

สรุปผลการวิจัย

จากการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน TTR ที่มีการกลายพันธุ์ไปหนึ่งตำแหน่ง คือ V30M และ L55P และศึกษาสมบัติจากการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ผลิตได้บนสแนมไฟฟ้า ด้วยโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ Native-PAGE พบว่าโปรตีน TTR กลายพันธุ์ทั้งสองชนิดนี้สามารถถูกผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pastoris* strain GS115 ได้ เช่นเดียวกับที่เคยมีการรายงานการผลิต TTR ชนิดต่างๆ โดยอาศัยเซลล์ *P. pastoris* ดังกล่าว (Prapunpoj *et al.*, 2000) รวมทั้งสามารถทำให้โปรตีนดังกล่าวบริสุทธิ์ได้ โดยอาศัยเทคนิค preparative native-PAGE เพียงขั้นตอนเดียว นอกจากนี้ การศึกษาสมบัติทางโครงสร้าง ยังแสดงให้เห็นว่าทั้ง V30M และ L55P ที่ผลิตได้นั้น มีโครงสร้างที่เป็นจตุรภูมิ โดยเคลื่อนที่ในสแนมไฟฟ้าภายใต้สภาวะธรรมชาติ เช่นเดียวกับ TTR ในพลาสมาของมนุษย์ รวมทั้ง หน่วยย่อยของ TTR กลายพันธุ์ดังกล่าว ก็มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับหน่วยย่อยของ TTR ของมนุษย์ที่พบในธรรมชาติเช่นกัน

จากการอาศัยการชักนำด้วยสภาวะกรด (pH 4.4) ทั้ง V30M และ L55P สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น soluble aggregates ได้ โดยที่ L55P มีอัตราในการเปลี่ยนแปลงสูงกว่า V30M ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของ



aggregated TTRs ต่อเซลล์มนุษย์ 4 ชนิด คือ ไฟโบร بلاสต์ F-N, ไฟโบร بلاสต์ F-DS, นิวโร بلاสต์ และลิมโฟ بلاสต์พบว่า soluble aggregated L55P มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่ละชนิด สูงกว่า V30M โดยมีลำดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของ L55P จากมากไปน้อย คือ F-DS > ลิมโฟ بلاสต์ > F-N > LAN-5 และลำดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของ V30M จากมากไปน้อย คือ F-DS > LAN-5 > F-N > ลิมโฟ بلاสต์ เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์ พบว่า ไฟโบร بلاสต์ F-DS มีความไวต่อพิษของทั้ง V30M และ L55P สูงที่สุด โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์จากพิษของ V30M และ L55P เท่ากับ 40.90 ± 2.37 และ 13.52 ± 3.62 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าไฟโบร بلاสต์ F-DS เป็นเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นเครื่องมือสำหรับศึกษาความเป็นพิษและการยับยั้งพิษของ TTR กลายพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2554 ทุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสถาบันราชานุกูล กรุงเทพมหานคร ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Barreiros, A.P., Otto, G., Kahlen, B., Teufel, A., & Galle, P.R. (2015). Familial amyloidosis : Great progress for an orphan disease. *Journal of Hepatology*, 62(2), 483-485.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Cascella, R., Conti, S., Mannini, B., Li, X., Buxbaum, J., Tiribilli, B., Chiti, F., & Cecchi, C. (2013). Transthyretin suppresses the toxicity of oligomers formed by misfolded proteins in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(12), 2302-2314.

Cereghino, J.L., & Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66.



- Christmanson, L., Betsholtz, C., Gustavsson, A., Johansson, B., Sletten, K., & Westermark, P. (1991). The transthyretin cDNA sequence is normal in transthyretin-derived senile systemic amyloidosis. *FEBS Letters*, 281(1-2), 177-180.
- Coelho, T., Adams, D., Silva, A., Lozeron, P., Hawkins, P.N., Mant, T., Perez, J., Chiesa, J., Warrington, S., Tranter, E., Munisamy, M., Falzone, R. Harrop, J., Cehelsky, J., Bettencourt, B.R., Geissler, M., Butler, J.S., Sehgal, A., Meyers, R.E., Chen, Q., Borland, T., Hutabarat, R.M., Clausen, V.A., Alvarez, R., Fitzgerald, K., Gamba-Vitalo, C., Nochur, S.V., Vaishnav, A.K., Sah, D.W., Gollob, J.A., & Suhr, O.B. (2013). Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*, 369(9), 819-829.
- Daly, R., & Hearn, M.T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119-138.
- Dasari, A.K.R., Hughes, R.M., Wi, S., Hung, I., Gan, Z., Kelly, J.W. & Lim, K.H. (2019). Transthyretin aggregation pathway toward the formation of distinct cytotoxic oligomers. *Scientific Reports*, 9, 33-43.
- Dasari, A.K.R., Hung, I., Gan, Z., & Lim, K.H. (2020). Two distinct aggregation pathways in transthyretin misfolding and amyloid formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1867(3), 344-349.
- Duan, W., Richardson, S.J., Köhrle, J., Chang, L., Southwell, B.R., Harms, P.J., Brack, C.M., Pettersson, T.M., & Schreiber, G. (1995). Binding of thyroxine to pig transthyretin, its cDNA structure, and other properties. *European Journal of Biochemistry*, 230(3), 977-986.
- Ferreira, N., Saraiva, M.J., & Almeida, M.R. (2019). Uncovering the neuroprotective mechanisms of curcumin on transthyretin amyloidosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1287.
- Garcia-Alloza, M., Borrelli L.A., Rozkalne, A., Hyman B.T., & Bacskai, B.J. (2007). Curcumin labels amyloid pathology *in vivo*, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1095-1104.



- Holmgren, G., Ericzon, B.G., Groth, C.G., Steen, L., Suhr, O., Andersen, O., Wallin, B.G., Seymour, A., Richardson, S., Hawkins, P.N., & Pepys, M.B. (1993). Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *The Lancet*, *341*(8853), 1113-1116.
- Hou, X., Richardson, S.J., Aguilar, M-I., & Small, D.H. (2005). Binding of amyloidogenic transthyretin to the plasma membrane alters membrane fluidity and induces neurotoxicity. *Biochemistry*, *44*(34), 11618-11627.
- Hund, E., Linke, R.P., Willig, F. & Gra, A. (2001). Transthyretin-associated neuropathic amyloidosis. Pathogenesis and treatment. *Neurology*, *56*(4), 431-435.
- Jacobson, D.R., & Buxaum, J.N. (1991). Genetic aspects of amyloidosis. *Advances in Human Genetics*, *20*, 69-123.
- Kaewmeechai, S., Poodproh, R., & Prapunpoj P. (2019). Transthyretin variant in Thai people is likely to associate with pathogenesis. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal*, *11*(3), 387-401.
- Kawas, C.H. (2006). Medications and diet protective factors for AD?. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, *20*(3 suppl 2), S89–S96.
- Lashuel, H.A., Lai, Z., & Kelly, J.W. (1998). Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. *Biochemistry Journal*, *37*(51), 17851-17864.
- Park, G.Y., Jamerlan, A., Shim, K.H., & An, S.S.A. (2019). Diagnostic and treatment approaches involving Transthyretin in amyloidogenic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12), 2982-2998.
- Peterson, S.A., Klabunde, T., Lashuel, H.A., Purkey, H., Sacchettini, J.C., & Kelly, J.W. (1998). Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(22), 12956-12960.



- Prapunpoj, P., Richardson, S.J., & Schreiber, G. (2002). Crocodile transthyretin: structure, function, and evolution. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(4), R885–R896.
- Prapunpoj, P., Yamauchi, K., Nishiyama, N., Richardson, S.J., & Schreiber, G. (2000). Evolution of structure, ontogeny of gene expression, and function of *Xenopus laevis* transthyretin. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279, R2026-R204.
- Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J.W., & Buxbaum, J.N. (2004). Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2817-2822.
- Richardson, S.J. (2007). Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones. *International Review of Cytology*, 258, 137-193.
- Ruberg, F.L. & Berk, J.L. (2012). Transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *Circulation*, 126(10), 1286-1300.
- Saelices, L., Johnson, L.M., Liang, W.Y., Sawaya, M.R., Cascio, Duilio, Ruchala, P., Whitelegge, J., Jiang, L., Riek, R., & Eisenberg, D.S. (2015). Uncovering the mechanism of aggregation of human transthyretin. *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28932-28943.
- Sorgjerd, K., Klingstedt, T., Lindgren, M., Kagedal, K., & Hammarstrom, P. (2008). Prefibrillar transthyretin oligomers and cold stored native tetrameric transthyretin are cytotoxic in cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(4), 1072-1078.
- Sousa, M.M., & Saraiva, M. (2003). Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling. *Progress in Neurobiology*, 71(5), 385-400.
- Tan, S.Y., Pepys, M.B., & Hawkins, P.N. (1995). Treatment of amyloidosis. *American Journal of Kidney Diseases*, 26(2), 267-285.



- Tola, A.J, Leelawatwattana, L., & Prapunpoj, P. (2019). The catalytic kinetics of chicken transthyretin towards human A β 1-42. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 226, doi: 10.1016/j.cbpc.2019.108610.
- Vogl, T., & Glieder, A. (2013). Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4), 385-404.
- Wang, X., Cattaneo, F., Ryno, L., Hulleman, J., Reixach, N., & Buxbaum, J. (2014). The systemic amyloid precursor transthyretin (TTR) behaves as a neuronal stress protein regulated by HSF1 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and APP23 Alzheimer's disease model mice. *The Journal of Neuroscience*, 34(21), 7253-7265.
- Xue, Q., Zheng, Q.C., Zhang, J.L., Cui, Y.L. Chu, W.T., & Zhang, H.X. (2014). Mutation and low pH effect on the stability as well as unfolding kinetics of transthyretin dimer. *Biophysical Chemistry*, 189, 8-15.
- Yang, M., Lei, M., & Huo, S. (2003). Why is Leu55→Pro55 transthyretin variant the most amyloidgenic; Insights from molecular dynamics simulations of transthyretin monomers. *Protein Science*, 12(6), 1222-1231.
- Yiannopoulou, K.G., & Papageorgiou, S.G. (2013). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(1), 19-33.