

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	MRG5380196
ชื่อโครงการ	การผลิต chimeric transthyretins สำหรับใช้เพื่อการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรตีนของ transthyretin
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน	ดร. ลัดดา ลีละวัฒน์วัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อีเมล	ladda.l@psu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	2 ปี

Transthyretin หรือ TTR เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 4 หน่วย และมีบทบาทหลายอย่างในสิ่งมีชีวิต โดยนอกจากทำหน้าที่ในการขนส่งฮอร์โมนต่อมไทรอยด์แล้ว TTR ยังมีคุณสมบัติในการเป็นโปรตีนเอส ถึงแม้ว่าคุณสมบัตินี้ได้ถูกยืนยันว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในมนุษย์ แต่ข้อมูลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยายังคงไม่ชัดเจนเท่าที่ควร ในการที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของปลาย N และ C ต่อความเป็นโปรตีนเอส ของ TTR chimeric TTRs 3 ชนิด ซึ่งเป็น TTR ที่โครงสร้างบริเวณปลาย N และ/หรือ ปลาย C มีการเปลี่ยนแปลงได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย (1) TTR ของจระเข้ (*Crocodylus porosus*TTR หรือ crocTTR) ซึ่งกรดอะมิโนบริเวณปลาย N และ C ถูกเปลี่ยนเป็น TTR ของ *Xenopus* และ TTR ของหมู ตามลำดับ (xeno/croc/pigTTR) (2) TTR ของคน (huTTR) ซึ่งกรดอะมิโนบริเวณปลาย C ถูกเปลี่ยนเป็น TTR ของหมู (pigC/huTTR) และ (3) TTR ของคนซึ่งกรดอะมิโนบริเวณปลาย N และ C ถูกเปลี่ยนเป็น TTR ของ *Xenopus* และ TTR ของหมู ตามลำดับ (xeno/hu/pigTTR) จากการใช้ระบบการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีสต์ *Pichia pastoris* พบว่า recombinant chimeric TTRs ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นสำเร็จ และโปรตีนทั้ง 3 ชนิดมีสมบัติทางเคมี-กายภาพเช่นเดียวกับ TTR ที่พบในธรรมชาติ จากนั้นอิทธิพลของปลาย N และ C ที่มีต่อคุณสมบัติความเป็นโปรตีนเอสของ TTR ได้ถูกศึกษาโดยเปรียบเทียบความเป็นโปรตีนเอสของ chimeric TTRs ที่ถูกสังเคราะห์ในครั้งนี้นับกับ TTRs ชนิดอื่นๆ ผลการทดลองพบว่า chimeric TTRs ที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณปลาย N และ/หรือปลาย C มีความสามารถในการเป็นโปรตีนเอสที่แตกต่างจาก wild type TTR ทั้งที่เป็น huTTR ที่สกัดจากพลาสมา และของ crocTTR เมื่อใช้ apoA-I เป็นสารตั้งต้น พบว่า xeno/crocTTR มีความว่องไวจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาต่ำสุด ($1.45 \pm 0.10 \mu\text{g/min/mg}$) ในขณะที่ความสามารถในการเป็นโปรตีนเอสของ pigC/crocTTR มีค่าสูงสุด (ความว่องไวจำเพาะเป็น $23.95 \pm 0.00 \mu\text{g/min/mg}$) โดยคิดเป็น 4 เท่าของ crocTTR (ความว่องไวจำเพาะเป็น $6.08 \pm 0.47 \mu\text{g/min/mg}$) อย่างไรก็ตามความว่องไวของ TTR จะลดลงใน xeno/croc/pigTTR ($16.24 \pm 1.37 \mu\text{g/min/mg}$) ผลการทดลองที่ได้ในกลุ่ม TTR จากจระเข้ พบว่าแตกต่างจากที่ได้จาก TTR ของคน โดยความว่องไวจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของ pigC/huTTR ($34.46 \pm 2.85 \mu\text{g/min/mg}$) ไม่

แตกต่างจากของ huTTR ($34.94 \pm 2.53 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$) อย่างไรก็ตามอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของ xeno/hu/pigTTR มีค่าต่ำสุดด้วยความว่องไวจำเพาะเป็น $26.46 \pm 4.50 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ หากใช้สารตั้งต้นเป็น $A\beta$ จะพบว่า TTR ทุกชนิดมีความสามารถในการสลาย $A\beta$ ได้ เนื่องจากพบ fragment ของ $A\beta$ ที่มีขนาดเล็กเกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม TTR จากจระเข้ พบว่า xeno/crocTTR มีอัตราเร็วในการสลาย $A\beta$ ต่ำที่สุด ในขณะที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะสูงใน pigC/crocTTR และ xeno/croc/pigTTR นอกจากนี้อัตราเร็วปฏิกิริยาของ chimeric TTRs ของคนพบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับ huTTR ถึงแม้ว่า xeno/hu/pig มีแนวโน้มเร่งปฏิกิริยาได้ช้าที่สุด ผลจากการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นอิทธิพลของปลาย N และ C ที่มีต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ TTR โดยความยาวและ hydrophathy ของโครงสร้างบริเวณปลาย N และ C อาจจะมีผลต่อ conformation ของหน่วยย่อยรวมถึงโครงสร้าง tetramer ของ TTR ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นโปรตีนเอสของ TTR ทั้งในเชิงกระตุ้นหรือยับยั้งการเร่งปฏิกิริยา

คำหลัก: โปรตีนเอส Hydrophathy *Pichia pastoris* Transthyretin

Abstract

Project code	MRG5380196
Project title	Synthesis of chimeric transthyretins to use for proteolysis study of transthyretin
Investigator and Institute	Dr. Ladda Leelawatwattana, Price of Songkla University
E-mail address	ladda.l@psu.ac.th
project period	2 years

Transthyretin (TTR) is a multi-functional homo-tetrameric protein. Beside functions as a thyroid hormones transporter, it also catalyzes the hydrolytic cleavage of particular proteins. Although this property has been proved to associate in pathology of human, the amino acid residues involved in the catalysis are still unclear. To explore the involvement of N- and C-terminal sequences in this ability, three types of chimeric TTRs in which N- and/or C-terminal fragments of the primary structure was changed were produced. These included (1) *Crocodylus porosus* TTR with N-terminal sequence of *Xenopus* TTR and C-terminal sequence of pig TTR (xeno/croc/pigTTR), (2) human TTR with the C-terminal sequence of pig TTR (pigC/huTTR) and (3) human TTR with N-terminal sequence of *Xenopus laevis* TTR and C-terminal sequence of pig TTR (xeno/hu/pigTTR). By heterologous protein expression system of *Pichia pastoris*, the recombinant chimeric TTRs with proper physicochemical properties were successfully synthesized. The influence of N- and C-terminal regions on the proteolysis property of TTR was studied using new chimeric TTRs constructed in this research and other chimeric TTRs. Results showed that the chimeric TTRs those N- or C-terminal region was altered had different activity in comparing to the wild type TTR from either human (huTTR) and *C. porosus* (crocTTR). In the presence of the specific substrate, apoA-I, the xeno/crocTTR showed to has lowest activity (1.45 ± 0.10 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$). The catalytic activity of pigC/crocTTR was highest (specific activity was 23.95 ± 0.00 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$) which was 4 folds greater than that of crocTTR (specific activity was 6.08 ± 0.47 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$). However, the activity decreased in xeno/croc/pigTTR (16.24 ± 1.37 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$). The results obtained from crocTTR family were different from that of TTR from human family. The specific activity of pigC/huTTR (34.46 ± 2.85 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$) was not different from that of huTTR (34.94 ± 2.53 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$). However, the activity of xeno/hu/pigTTR was lowest with specific activity of 26.46 ± 4.50 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$. By using A β

as substrate, in the presence of all type of TTRs, the cleavage fragments of A β were generated. In comparison to croc TTR, xeno/crocTTR showed to had lowest activity whereas high activity were found in pigC/croc and xeno/croc/pigTTR. Moreover, the activity of two chimeric human TTRs were not much different when compared to the wild type huTTR, although the xeno/hu/pig had a trend to showed lowest activity. Finally, the results obtained could demonstrate to the influence of N- and C-terminal regions on the catalytic activity of TTR. Length and hydropathy of the N- or C-terminus may affect on conformation of the TTR subunit and/or molecule, which led to changes in the activity either in promote and inhibit manner.

Keywords: Hydropathy, *Pichia pastoris*, Protease and Transthyretin