

# Transthyretin กลายพันธุ์ ที่พบในคนไทยมีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค Transthyretin Variant in Thai People is Likely to Associate with Pathogenesis

สุภาวดี แก้วมีชัย รัตวรรณ พุดเพราะ และ พรทิพย์ ประพันธ์พจน์\*

Supawadee Kaewmeechai, Rattawan Poodproh and Porntip Prapunpoj\*

Received: 16 October 2018, Revised: 28 November 2018, Accepted: 14 January 2019

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาแนวโน้มในการก่อให้เกิดโรคของ Transthyretin กลายพันธุ์ (TTR variant) ณ ตำแหน่ง valine 122 ที่พบในคนไทย โดยทำการผลิต cDNA ของ TTR variant ดังกล่าว จาก cDNA ของคนปกติ ด้วยเทคนิค Site-Directed Mutagenesis แล้วเชื่อมต่อเข้าสู่เวกเตอร์ pPIC 3.5 ก่อนนำเข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อให้ผลิตเป็นโปรตีน TTR variant และทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิค preparative-native PAGE โปรตีน TTR variant ที่สังเคราะห์ได้ มีลักษณะการเคลื่อนที่บน โพลีอะครีลาไมด์เจลในสภาพธรรมชาติเร็วกว่าอัลบูมิน เช่นเดียวกับ TTR ที่พบในพลาสมาของคนปกติ จากการวิเคราะห์หาหน่วยย่อยด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ปรากฏว่า TTR variant มีมวลโมเลกุลหน่วยย่อยประมาณ 17 กิโลดาลตัน ความสามารถในการเกิดเป็นเส้นใย amyloid ถูกวัดด้วย Thioflavin T พบว่าเกิดเป็นเส้นใยได้เร็วกว่า L55P ภายใต้สภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่า TTR variant นี้ มีความเสถียรของโครงสร้าง tetramer น้อยกว่า และผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ human neuroblastoma (LAN-5) โดยเทคนิค MTT แสดงให้เห็นว่า TTR variant นี้ มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า L55P ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการก่อโรคของ TTR กลายพันธุ์ชนิดนี้

**คำสำคัญ:** Transthyretin, การกลายพันธุ์, โปรตีนอะมิลอยด์, ความเป็นพิษต่อเซลล์

## ABSTRACT

In this research, we study a tendency of pathogenesis of a transthyretin variant (TTR variant) which was identified in Thai people. The cDNA of TTR variant was constructed from the cDNA of human TTR wild type (TTR WT) by Site-Directed Mutagenesis following by ligation into pPIC 3.5 expression vector and transformation into *Pichia pastoris*. The recombinant TTR variant was successfully synthesized by *Pichia*, and it was purified by preparative native-PAGE. In the comparison, TTR variant migrated on a non-denatured polyacrylamide gel faster than albumin in human plasma. Its molecular mass analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was approximately 17 kilodaltons. The ability to form fibril of TTR variant was investigated by Thioflavin T assay and found that TTR variant definitely formed fibril under the physiological condition faster than L55P and TTR WT, indicating low stability of tetrameric structure of TTR variant. Cytotoxicity test to human neuroblastoma cells (LAN-5) and determined by MTT assay showed that TTR variant had higher toxicity than L55P. The results demonstrated a potential pathogenesis of the studied TTR variant.

**Key words:** Transthyretin, variant, amyloid fibril, cytotoxicity

### บทนำ

Transthyretin (TTR) เป็นโปรตีนที่พบในพลาสมา มีหน้าที่สำคัญในการขนส่งฮอร์โมน ไทรอยด์ และวิตามินเอ ยีน TTR อยู่บนโครโมโซมที่ 18 ประกอบด้วย 4 exon และ 3 intron โดยส่วนใหญ่โปรตีนชนิดนี้ถูกสังเคราะห์โดยเซลล์ตับแล้วหลั่งออกมาสู่พลาสมา ส่วนอวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่นๆ ได้แก่ choroid plexus ในสมอง และ retina สามารถผลิต TTR ได้เช่นกัน (Cavallaro *et al.*, 1990; Schreiber, 2002; Palha, 2002) โครงสร้างธรรมชาติของ TTR ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (tetramer) โดยแต่ละหน่วยย่อยมีกรดอะมิโน 127 หน่วย สายโพลีเพปไทด์ของแต่ละหน่วยย่อยมีโครงสร้างเป็น beta-pleated sheet จำนวน 8 สาย (A ถึง H) ที่เรียงตัวในทิศทางตรงกันข้าม (DAGH และ CBEF) และมีเพียงส่วนน้อยที่เรียงตัวแบบ alpha-helix สายสั้นๆ dimer เกิดจากการยึดเหนี่ยวด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงดึงดูดแบบ hydrophobic ระหว่างสาย F กับ F' และ H

กับ H' ของ 2 หน่วยย่อย (' หมายถึงหน่วยย่อยอื่น) เกิดเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียร จากนั้น dimer 2 หน่วย จับกันโดยส่วนใหญ่อาศัยแรงดึงดูดแบบ hydrophobic ซึ่งเกี่ยวข้องกับบริเวณสาย A, B, G และ H เกิดเป็นโครงสร้าง tetramer (Ferreira *et al.*, 2013) หากมีการกลายพันธุ์ของยีนที่แปลรหัสในการผลิตโปรตีน TTR จะส่งผลให้โครงสร้างของ TTR ไม่เสถียร (Terry *et al.*, 1993; Sebastiao *et al.*, 1998) ทำให้เกิดการแยกตัวของโปรตีนหน่วยย่อยแล้วรวมตัวกันในรูปแบบเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเรียกว่าเส้นใย amyloid (Lai *et al.*, 1996; Quintas *et al.*, 2001) เส้นใยเหล่านี้จะไปสะสมตามเนื้อเยื่อต่างๆ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเนื้อเยื่อและส่งผลกระทบโดยตรงต่อการทำงานของอวัยวะ โดยโปรตีน TTR กลายพันธุ์สามารถแยกตัวเป็นหน่วยย่อยได้ในสภาวะปกติทั่วไปของร่างกาย (Quintas *et al.*, 1997; 1999; 2001; Hou *et al.*, 2005) มีงานวิจัยหลายเรื่องที่รายงานตรงกันว่าเส้นใยสายสั้นๆ ที่ก่อตัวขึ้นระหว่าง

กระบวนการเกิด amyloid ที่สมบูรณ์เป็นรูปแบบของเส้นใยที่เป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด (Sousa *et al.*, 2001; 2002; Reixach *et al.*, 2004)

โดยทั่วไปการกลายพันธุ์ของยีน TTR ก่อให้เกิดโรค hereditary amyloidosis ทั้งชนิด familial amyloid polyneuropathy (FAP) และ familial amyloid cardiomyopathy (FAC) (Ikeda, 2004; Ando *et al.*, 2005) สาเหตุของ FAP ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน TTR เพียงตำแหน่งเดียว โดย L55P (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 55 ในสายโพลีเพปไทด์เปลี่ยนจาก leucine เป็น proline) เป็นการกลายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงที่สุด (Yang *et al.*, 2003; Babbes *et al.*, 2008) ในขณะที่ V30M (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 30 ในสายโพลีเพปไทด์เปลี่ยนจาก valine เป็น methionine) เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด (Ueda and Ando, 2014) โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวส่งผลต่อความเสถียรของโครงสร้างโปรตีน ก่อให้เกิดการสะสมของโปรตีน TTR ในรูปแบบของเส้นใย amyloid บริเวณระบบประสาทส่วนนอกเกิดเป็นกลุ่มโรค sensory peripheral neuropathy ที่ส่งผลต่อการรับรู้ความรู้สึกทั้งความเจ็บปวดและการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ นอกจากนี้การกลายพันธุ์บางชนิด เช่น V122I (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 ในสายโพลีเพปไทด์เปลี่ยนจาก valine เป็น isoleucine) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค FAC (Jacobson *et al.*, 1997) โดยเส้นใย amyloid จะไปสะสมที่เนื้อเยื่อหัวใจ ส่งผลต่อจังหวะการเต้นของหัวใจและอาจทำให้หัวใจวายได้ นอกจากนี้ การกลายพันธุ์ชนิดนี้ยังทำให้เกิดโรค amyloid neuropathy ได้เช่นกัน (Carr *et al.*, 2015) ความรุนแรงและอาการของโรค TTR amyloidosis ขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์และตำแหน่งที่มีการสะสมของเส้นใย amyloid การแสดงออกของอาการทางคลินิกขึ้นอยู่กับอายุ เพศ และระยะเวลาในการเกิดโรคซึ่งแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ ในคนไทยได้

มีการค้นพบการกลายพันธุ์ของยีน TTR ในหลายตำแหน่ง รวมทั้งการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 122

การศึกษาคุณลักษณะของ TTR จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างโปรตีนปริมาณมากในระดับหนึ่ง แต่การแยกโปรตีน TTR จากผู้ป่วยเพื่อนำมาศึกษาโดยตรงเป็นสิ่งที่ยาก ดังนั้นการศึกษาครีนิคจึงได้ทำการผลิต TTR variant โดยอาศัยระบบการผลิตของยีสต์ (*Pichia pastoris*) *Pichia* เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตโปรตีนโดยอาศัยการเหนี่ยวนำยีนให้แสดงออกด้วยเมทานอล (methanol) ซึ่งเป็นระบบที่มีประโยชน์ในการผลิตโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่มีในยีสต์ โปรตีนที่ผลิตได้จะอยู่ในรูปแบบของโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) โดยยีสต์มีระบบที่สามารถผลิตและปรับแต่งโปรตีนที่ผลิตโดยยูคาริโอตชั้นสูงได้ เช่น การเติมน้ำตาล และการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) (Patrick *et al.*, 2005) มีรายงานการผลิตโปรตีนหลายชนิดโดยใช้ยีสต์ชนิดนี้ได้แก่ โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent) เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ในมนุษย์ และเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส ( $\alpha$ -amylase) ในหนู (Ahmad *et al.*, 2014) เป็นต้น ในส่วนของโปรตีน TTR เคยมีการใช้ยีสต์ *P. pastoris* ในการผลิตเช่นกัน โดยสามารถผลิตโปรตีน TTR ทั้งชนิดปกติและ TTR กลายพันธุ์ (Prapunpoj *et al.*, 2002; สุภาวดี, 2549) TTR ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยยีสต์มีโครงสร้างตามธรรมชาติที่ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อยที่เหมือนกันและมีขนาดที่เหมือนกับ TTR ที่พบในพลาสมาของคน และยังคงคุณสมบัติในการจับกับฮอร์โมน ไทรอยด์ และ retinol binding protein (Prapunpoj *et al.*, 2006; Leelawatwattana *et al.*, 2011)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการผลิต TTR ปกติและ TTR variant โดยอาศัยระบบการสังเคราะห์ของยีสต์

*P. pastoris* เพื่อใช้ในการศึกษาคุณลักษณะทั่วไป รวมถึงความสามารถในการเกิดเป็นเส้นใย amyloid ซึ่งจะมีประโยชน์ในการช่วยทำนายโอกาสที่จะก่อให้เกิดโรค TTR amyloidosis จากการกลายพันธุ์ของยีน TTR variant ที่พบในคนไทยชนิดนี้

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การสร้างเวกเตอร์สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน TTR ในยีสต์ (*P. pastoris*)

#### 1.1 การสร้าง cDNA ของ TTR

variant

พลาสมิดที่มี cDNA ของ TTR variant ถูกผลิตขึ้นจาก cDNA ของ TTR ปกติ (wild type; WT) โดยอาศัยเทคนิค Site-Directed Mutagenesis โดยใช้ชุดนี้ 1 ย 1 Gene Editor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis (Promega, USA) ด้วยขั้นตอนตามคำแนะนำจากบริษัท โดยมี cDNA ของ TTR ปกติที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM-T easy เป็นแม่แบบ และใช้ oligonucleotide ที่จำเพาะซึ่งออกแบบมาจาก full-length cDNA ของยีน *Homo sapiens* TTR (accession number NM\_000371) คือ 5'-ACGGTCGTCGACAC CAATCCC-3' สำหรับ TTR variant และ 5'-AGTCTGGAGAGCCGCATGG -3' สำหรับ L55P โดย cDNA ถูกสังเคราะห์ด้วยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA polymerase จากนั้นเชื่อมต่อปลายทั้งสองเข้าด้วยกันโดยเอนไซม์ T4 DNA ligase ก่อนนำเวกเตอร์ดังกล่าวไปเพิ่มจำนวนโดยการนำเข้าสู่ *Escherichia coli* (BMH71-18 mutS) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีคุณสมบัติในการตรวจสอบ DNA ที่กลายพันธุ์เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาด้านแบคทีเรียที่จำเพาะ จากนั้นสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Kit for plasmid purification (Geneaid, Taiwan) นำพลาสมิดที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด (*Bam*HI และ *Eco*RI) แล้วนำไปแยก

ใน agarose gel จากนั้นตัดเจลตำแหน่งที่มีชิ้นส่วนของยีน TTR (ขนาดประมาณ 400 bp) นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Kit for gel extraction (Geneaid, Taiwan) แล้วนำชิ้นส่วนยีนของ TTR ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC 3.5 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด (*Bam*HI และ *Eco*RI) ก่อนนำเวกเตอร์ pPIC 3.5 ที่มี cDNA ของ TTR ไปเพิ่มจำนวนโดยการนำเข้าสู่ *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) พลาสมิดที่สกัดได้ถูกนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส โดยใช้ไพรมเมอร์ 5' AOX (5'-GACTGGTCCAATTGACAAGC-3')

#### 1.2 การนำ cDNA ของ TTR variant

เข้าสู่ยีสต์

นำเวกเตอร์ pPIC 3.5 ที่มี cDNA ของ TTR variant ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Sac*I) แล้วผสม DNA ดังกล่าว 0.5 ไมโครกรัม กับยีสต์ *P. pastoris* (GS115) ที่ผ่านการเตรียมเป็น competent cells ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปใส่ใน cuvette ก่อนนำไปทำ electroporation โดยการกระตุ้นด้วยเครื่อง Gene Pulser (Bio-Rad, USA) ที่ความต่างศักย์ 1.5 กิโลโวลต์ ความจุไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด และความต้านทานไฟฟ้า 400 โอห์ม จากนั้นใส่น้ำตาล sorbital ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปใน cuvette ผสมกับเซลล์ยีสต์ ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง minimal dextrose medium (MD) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีโคโลนีของยีสต์ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน

#### 1.3 คัดเลือกโคลนสำหรับใช้ผลิต

โปรตีน TTR

His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> (histidine synthesis plus, methanol utilization plus) เป็นลักษณะของโคลนที่ต้องการซึ่งสามารถคัดเลือกโดยการนำโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MD หลังจากการทำ

electroporation ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MD และ minimal dextrose medium (MM) เป็นเวลา 3 วัน แล้วทำการคัดเลือกโคลน His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup> ซึ่งสามารถเจริญได้คบบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง MD และ MM โคลนที่ได้จากการคัดเลือกถูกนำไปใช้ในการผลิตโปรตีน TTR

## 2. การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน TTR

นำโคลนของยีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง yeast extract peptone dextrose (YPD) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร BMGY (buffer medium containing glycerol) 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ย้ายยีสต์ที่อยู่ในอาหารไปเลี้ยงต่อใน BMGY 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วเท่าเดิมเลี้ยงต่อไปจนวัดค่าความขุ่นของยีสต์ที่ OD<sub>600</sub> ได้ 3-4 หน่วย จากนั้นเก็บเซลล์ยีสต์แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร BMMY ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนด้วย 0.5% เมทานอลทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสแล้วตรวจสอบโปรตีน TTR ที่ยีสต์หลั่งออกมาโดยการนำอาหารเลี้ยงยีสต์ไปแยกบนโพลีอะครีลาไมด์เจลในสภาพธรรมชาติ ย้อมแถบโปรตีนโดย silver nitrate โปรตีนในส่วนใสถูกนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี Ultrafiltration แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ก่อนนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative native PAGE (12% resolving gel และ 4% stacking gel) โดยใช้ Prep Cell model 491 (Bio-Rad, USA) ด้วยขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท

## 3. การตรวจสอบคุณลักษณะของโปรตีน

### TTR

นำโปรตีน TTR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปแยกในโพลีอะครีลาไมด์เจลในสภาพธรรมชาติเพื่อคุณลักษณะการเคลื่อนที่ของโปรตีน TTR ที่ผลิตโดยยีสต์เปรียบเทียบกับ TTR ที่เตรียมได้จากพลาสมาของมนุษย์ โดยนำโปรตีนไปแยกใน native-PAGE (10% resolving gel และ 4% stacking gel) หลังจากนั้นย้อมแถบโปรตีนโดย Coomassie brilliant blue R-250

ในการหาขนาดของหน่วยย่อยโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ทำได้โดยนำโปรตีน TTR แต่ละชนิดไปเจือจางในสารละลายที่ประกอบด้วย 2% SDS, 2.5% beta-mercaptoethanol แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 30 นาที ก่อนนำไปแยกใน SDS-PAGE (7-15% gradient resolving gel และ 4% stacking gel) จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย Coomassie brilliant blue แล้วตรวจสอบมวลโมเลกุลหน่วยย่อยของ TTR

การตรวจสอบโปรตีน TTR โดยวิธี Western Blot เริ่มจากการนำโปรตีนไปแยกโดยวิธี SDS-PAGE โดยเตรียมโปรตีนและใช้สภาวะในการทำ electrophoresis เช่นเดียวกับการหามวลโมเลกุลหน่วยย่อยของโปรตีนข้างต้น จากนั้นนำแผ่นเจลวางบนแผ่นเมมเบรน Polyvinylidene (PVDF) โปรตีนจากแผ่นเจลถูกย้ายไปยังเมมเบรนโดยใช้ระบบบัฟเฟอร์ Tris-Glycine (25mM Tris, 192 mM Glycine, pH 8.3) ที่มี 20% (v/v) เมทานอล ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปแช่ใน 5% non-fat milk ก่อนจะบ่มด้วย sheep anti-human antiserum ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก แล้วนำไปบ่มด้วย horseradish peroxidase-conjugated anti-sheep immunoglobulin ก่อนนำไปตรวจสอบแถบโปรตีนโดยการใช้ ECL Prime

Western Blotting Detection Reagent (Amersham, USA) และทำตามคำแนะนำของบริษัท

#### 4. การสร้างและการตรวจสอบเส้นใย amyloid ของโปรตีน TTR

นำโปรตีน TTR ปกติ TTR variant และ L55P ไปเจือจางใน phosphate buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีส่วนผสมของ NaCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ (PBS) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเป็น 4.5 ไมโครโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิดเป็นเส้นใยโดยการนำไปเจือจางในสารละลาย sodium phosphate (pH 7.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มี NaCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ Thioflavin T (ThT) 50 ไมโครโมลาร์ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเส้นใยเป็น 0.8 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำไปวัดค่า fluorescence โดยใช้ Shimadzu RF-1501 spectrofluorometer ด้วยการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 440 nm และปล่อยพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่น 460-600 nm

#### 5. ทดสอบความเป็นพิษต่อ human neuroblastoma cells (LAN-5) ของ TTR

เลี้ยง LAN-5 ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum 10%, penicillin 100 IU/มิลลิลิตร และ streptomycin 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 96-well plate โดยจำนวนของเซลล์เริ่มต้นในแต่ละ well คือ  $4.5 \times 10^4$  เซลล์ บ่มเซลล์ในตู้ที่มีความชื้น 95% คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วเติม DMEM ที่ไม่มีซีรัมลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วใส่โปรตีน TTR ลงไปในแต่ละ well โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเป็น 2 ไมโครโมลาร์ บ่มเซลล์ตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบหาความเป็นพิษของ TTR

ต่อเซลล์โดยการทำให้ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Roche, Switzerland) ซึ่งมีขั้นตอนคือเติม MTT labeling reagent 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละ well แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม solubilization reagent ลงไป 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้ Agilent model Synergy HT Microplate Reader จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบกับ LAN-5 ที่ไม่ได้บ่มกับ TTR

#### 6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบการมีชีวิตของเซลล์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance, ANOVA) แบบ one way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 software ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

#### 1. การสร้างโคลนสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน TTR

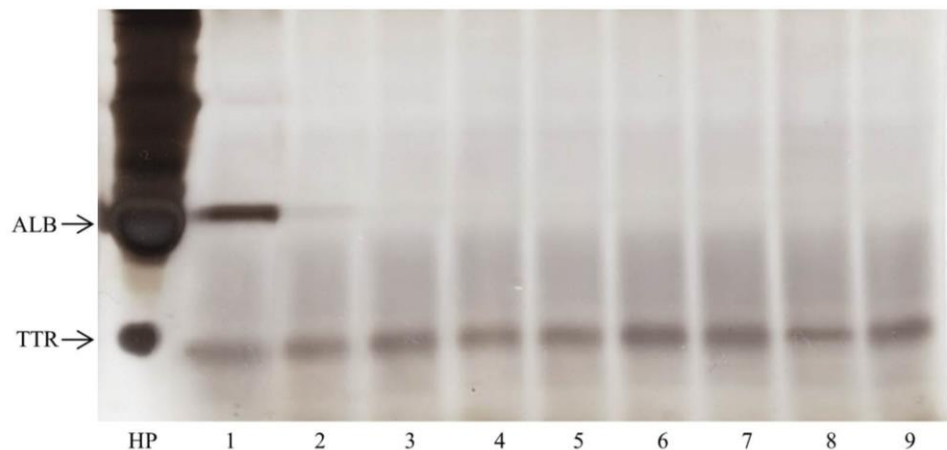
เวกเตอร์ที่มี cDNA ของ TTR variant ถูกสร้างขึ้นด้วยเทคนิค Site-Directed Mutagenesis โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและใช้ cDNA ของ TTR WT เป็นแม่แบบ จากนั้น ยีนของ TTR ถูกใส่เข้าไปในเวกเตอร์ pPIC 3.5 ที่ตำแหน่งระหว่างลำดับเบสของ AOX1 promoter และ terminator โดยยีน TTR ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแทรกเข้าสู่โครโมโซมของ *Pichia* ที่ตำแหน่ง HIS4 (mutant) โดยการนำเข้าสู่ยีสต์ด้วยเทคนิค electroporation ข้อดีคือใช้ DNA ปริมาณน้อยและสามารถนำ DNA เข้าสู่เซลล์เข้าบ้านได้โดยตรง การผลิตและหลัง TTR ส่วน

ใหญ่ถูกควบคุมโดย *AOXI* promoter ซึ่ง promoter ชนิดนี้มีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ alcohol oxidase ในยีสต์ (Patrick *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2014) ดังนั้นเมื่อเลี้ยง *Pichia* ในอาหารที่มีเมทานอล *AOXI* จะถูกเหนี่ยวนำให้ทำงานแล้วส่งผลให้เกิดการผลิต TTR

## 2. การสังเคราะห์และการตรวจสอบโปรตีน TTR

โปรตีนลูกผสม TTR variant ที่สังเคราะห์โดยยีสต์ *P. pastoris* ถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (ภาพที่ 1) โดยปกติแล้วยีสต์ชนิดนี้จะหลั่งโปรตีนที่ผลิตภายในเซลล์ออกมาภายนอกน้อยมาก ดังนั้นโปรตีนส่วนใหญ่ที่ถูกหลั่งออกมาจึงเป็นโปรตีนลูกผสม (Balamurugan *et al.*, 2007) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค preparative native-PAGE (Prapunpoj *et al.*, 2006) ข้อดีของการใช้ยีสต์ผลิตโปรตีนคือ ระบบของยีสต์มีกระบวนการ

post translation modification เช่น signal sequence processing, การเติม disulfide bond, การม้วนพับของโปรตีน และการเติมน้ำตาล (Cereghino and Cregg, 2000; Balamurugan *et al.*, 2007) และเนื่องจาก *Pichia* สามารถเจริญเติบโตในช่วง pH ตั้งแต่ 3.0 ถึง 7.0 จึงทำให้ช่วยลดความเสียหายของโปรตีนจาก extracellular protease โดยการปรับ pH ในการเลี้ยงยีสต์ให้ต่างจาก pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ protease (Patrick *et al.*, 2005) นอกจากนี้การเติมสารตั้งต้นบางชนิด เช่น peptide component ของ yeast extract และ peptone ในอาหารยังช่วยลดผลของ protease ส่งผลให้โปรตีน TTR ที่ถูกหลั่งออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงยีสต์มีความเสถียรมากขึ้น (Westen *et al.*, 1999) ดังนั้นการเลี้ยงและเหนี่ยวนำ *Pichia* ให้มีการผลิตโปรตีนในอาหารที่เป็นระบบบัฟเฟอร์ เช่น BMGY และ BMMY จึงสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของโปรตีน TTR ได้



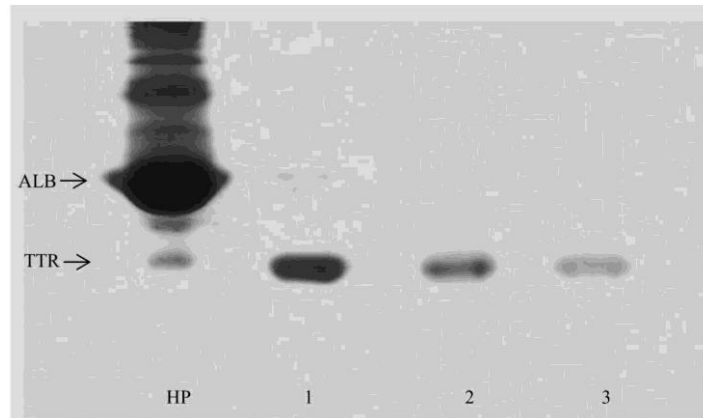
ภาพที่ 1 โปรตีน TTR variant ที่ *Pichia* สังเคราะห์และหลั่งออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อถูกนำไปวิเคราะห์โดยการทำ native-PAGE และย้อมแถบโปรตีนด้วย silver nitrate (ALB: albumin; HP: human plasma; 1-9: โปรตีน TTR ที่ยีสต์ผลิตได้จากแต่ละโคลน)

จากการทบทวนงานวิจัยพบว่า TTR ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่เคลื่อนที่เร็วกว่าอัลบูมินระหว่างการทำ electrophoresis ที่ pH 8.6 (Duan *et al.*,

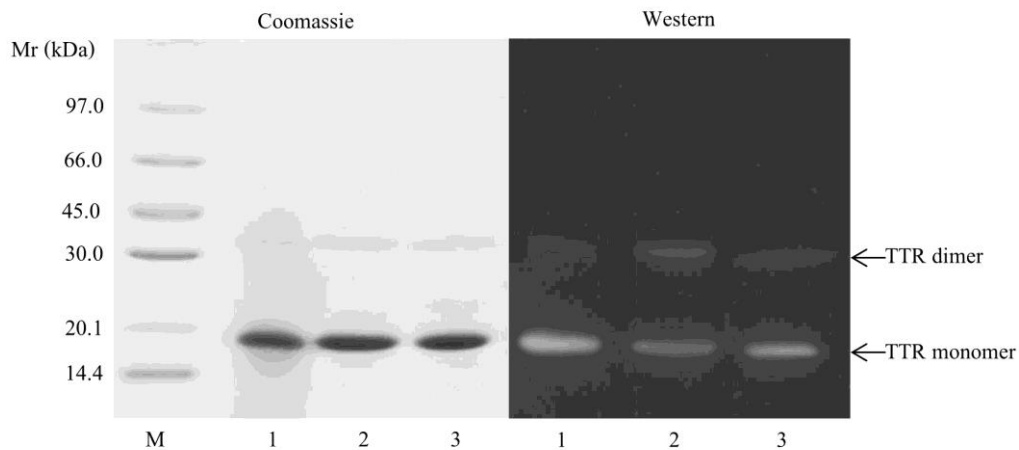
1995; Prapunpoj *et al.*, 2002) และในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบลักษณะการเคลื่อนที่ของโปรตีนลูกผสม TTR ได้แก่ TTR WT, TTR variant และ L55P

เปรียบเทียบกับ TTR ในพลาสมาของคนบน โพลีอะครีลาไมด์เจลภายใต้สภาวะธรรมชาติ โปรตีน TTR ที่ผลิตโดยยีสต์มีลักษณะการเคลื่อนที่เหมือนกับ TTR ในพลาสมาของคน โดยเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอัลบูมิน ดังแสดงในภาพที่ 2 และจากการศึกษาความจำเพาะของโปรตีนโดยการทำให้ Western Blot

พบว่าโปรตีนสองแถบเกิดปฏิกิริยากับ anti-human TTR antibody โดยโปรตีนที่มีแถบขนาดใหญ่ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 กิโลดาลตัน มีตำแหน่งตรงกับหน่วยย่อย TTR ที่ย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie blue ดังแสดงในภาพที่ 3 จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่าโปรตีนที่ผลิตจากยีสต์คือ TTR



ภาพที่ 2 TTR ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์วิเคราะห์ด้วย native-PAGE และย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie blue (ALB: albumin; HP: human plasma; 1: TTR WT; 2: L55P; 3: TTR varaint)



ภาพที่ 3 แถบของโปรตีน TTR บริสุทธิ์ที่วิเคราะห์โดย SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue และตรวจสอบ immunological reactivity ด้วย TTR antiserum (M: โปรตีนมาตรฐาน; 1: TTR WT; 2: L55P; 3: TTR varaint)

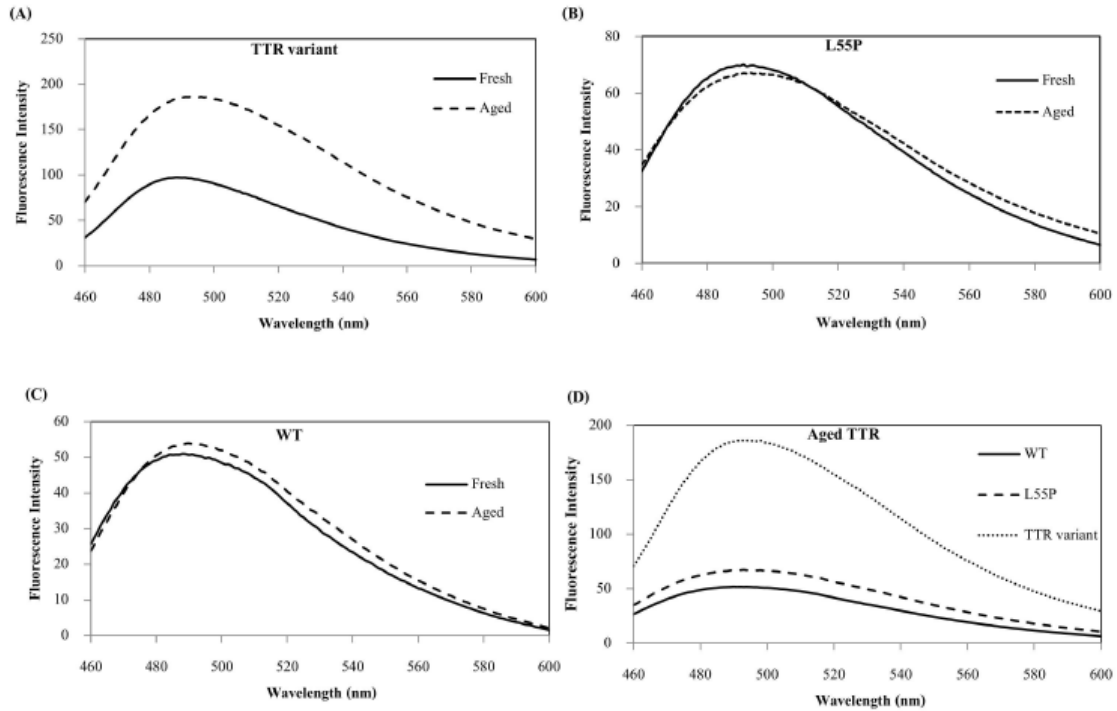


### 3. การเกิดเป็น fibril ของ TTR variant

การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 122 ในสายโพลีเพปไทด์ของ TTR จาก valine ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น isoleucine (V122I) มีรายงานเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับกล้ามเนื้อหัวใจและโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Jacobson *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 2015) ตรงตำแหน่งเดียวกันนี้ในสายโพลีเพปไทด์ของตัวอย่างจากคนไทย ได้พบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าวเช่นกัน ดังนั้นจึงคาดว่า การกลายพันธุ์ชนิดนี้มีแนวโน้มทำให้เกิดเป็นเส้นใย amyloid ที่เป็นพิษต่อเซลล์และก่อให้เกิดโรคเช่นเดียวกับ V122I

โครงสร้างของ TTR ที่ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อยสามารถแยกตัวแล้วนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของแต่ละหน่วยย่อย แล้วส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันเป็นเส้นใย amyloid ภายใต้อาณัติ เช่น L55P สามารถแยกตัวเป็นหน่วยย่อยแล้วเปลี่ยนแปลงเป็น amyloidogenic intermediate ซึ่งสามารถรวมตัวกันเองเป็นเส้นใย amyloid ทั้งในสถานะปกติและที่ pH ต่ำๆ (Lashuel *et al.*, 1999; Arsequell and Planas, 2012; Sant'anna *et al.*, 2013) แต่เนื่องจากโรค TTR amyloidosis ที่เกิดจาก TTR แยกตัวไปเป็น non-nature monomeric แล้วเปลี่ยนแปลงเป็นเส้นใย amyloid ในสถานะ pH ปกติแล้วสะสมในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ (Quintas *et al.*, 1997; 1999; 2001) ดังนั้นในการศึกษาความสามารถของ TTR variant ในการสร้างเส้นใย amyloid จึงทำการทดลองในสถานะปกติและทำการเปรียบเทียบกับ

L55P และ TTR WT โดยโปรตีนเหล่านี้ถูกเจือจางใน PBS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4.5 ไมโครโมลาร์ และเหนี่ยวนำให้สร้าง amyloid ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 7.4 แล้ววัด amyloid ที่เกิดขึ้นโดยใช้ ThT ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป (Arsequell and Planas, 2012) โดย ThT จับกับโครงสร้าง beta-sheet ของ amyloid แล้วนำไปสู่การเพิ่ม fluorescence ของ ThT (Khurana *et al.*, 2005; Groenning, 2010) เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง TTR ที่เตรียมใหม่กับ TTR บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่า TTR variant มีอัตราการเกิดเป็นเส้นใย amyloid ที่สูงและเร็วมากในขณะที่ L55P และ TTR WT แทบไม่มีความแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 4A, 4B และ 4C และที่ความเข้มข้นเดียวกัน TTR variant มีค่า fluorescence สูงกว่า L55P และ TTR WT อย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4D) เนื่องจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 อยู่ในสาย H ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับสาย H ของอีกหน่วยย่อยเพื่อสร้างเป็น dimer และ สาย H ของแต่ละหน่วยย่อยยังมีส่วนในการจับกับกันระหว่าง dimer เพื่อสร้างเป็น tetramer ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ณ ตำแหน่งดังกล่าว จึงอาจมีผลทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างหน่วยย่อยเปลี่ยนแปลง ส่งผลต่อความเสถียรของโครงสร้าง TTR (Jiang *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2013) ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า TTR variant มีแนวโน้มที่จะเกิดเป็น amyloid ได้เร็วและสูงกว่า L55P นั่นหมายถึงโอกาสที่จะเป็นพิษต่อเซลล์แล้วก่อให้เกิดโรคย่อมมีสูงด้วยเช่นกัน

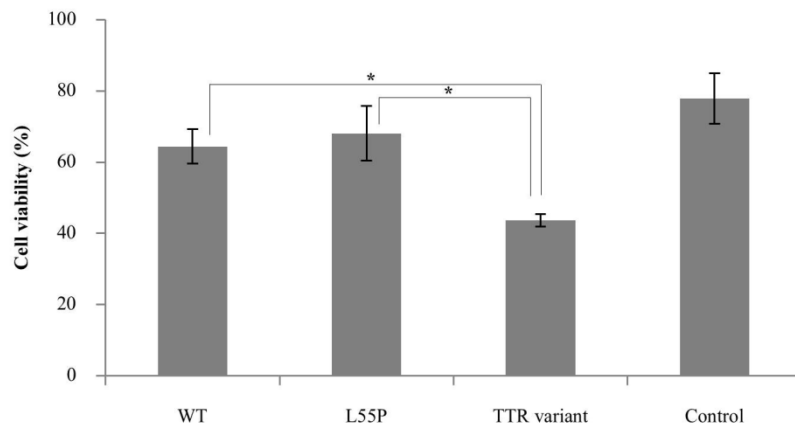


**ภาพที่ 4** การเกิดเป็นเส้นใย amyloid ของโปรตีน TTR แต่ละชนิด ได้แก่ TTR variant, L55P และ TTR WT (WT) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Aged) และโปรตีนที่ไม่ได้บ่ม (Fresh) ดังแสดงในรูป A, B และ C ส่วนรูป D เปรียบเทียบความสามารถของ TTR แต่ละชนิดในการเกิดเป็นเส้นใย amyloid

#### 4. ความเป็นพิษต่อเซลล์ human neuroblastoma (LAN-5) ของ TTR variant

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ TTR variant ต่อ neuroblastoma (LAN-5) โดยบ่ม TTR ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ กับ LAN-5 ที่เลี้ยงใน 96- well plate หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตโดยการวัดกิจกรรมภายในเซลล์ด้วยการทำ MTT assay

ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่บ่มกับ TTR มีอัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (LAN-5 ที่ไม่ได้บ่มกับโปรตีน) แต่เซลล์ที่บ่มด้วย TTR variant มีการตายสูงกว่า L55P และ TTR WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่า TTR variant มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า TTR WT และ L55P



ภาพที่ 5 ผลของ TTR ต่อการมีชีวิตรอดของ LAN-5 หลังจากที่ถูกบ่มเซลล์ด้วย TTR แต่ละชนิดที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดการมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay เป็นค่าเฉลี่ยของการทำ 3 ซ้ำ (\* $p < 0.05$ )

ความเป็นพิษของ TTR ต่อเซลล์สัมพันธ์โดยตรงกับความเสถียรทางโครงสร้าง tetramer ที่ลดลงของสายโพลีเปปไทด์ของ TTR (Quintas *et al.*, 2001) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถของเส้นใย amyloid ของ TTR ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและการเกิดภาวะเครียดที่เกิดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) แล่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท (Sousa and Saraiva, 2003) โดยเส้นใย amyloid เหล่านี้สามารถจับกับ lipid moiety ของเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน (Hou *et al.*, 2005) นอกจากนี้การกระตุ้นผ่านตัวรับ (receptor) ก็เป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Sousa *et al.*, 2000) Receptor for advanced glycation end product (RAGE) เป็นตัวรับที่เซลล์ประสาทสามารถผลิตได้ โดยในสภาวะปกติมีการแสดงออกน้อยแต่พบสูงขึ้นในภาวะที่เกิดโรคบางชนิด เช่น เบาหวาน การอักเสบแบบเรื้อรัง หรือโรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาท โดยเส้นใย amyloid เป็นลิแกนด์ชนิดหนึ่งของ RAGE (Schmidt *et al.*, 2000; Kierdorf and Fritz 2013) สำหรับเส้นใย

amyloid ของ TTR มีรายงานว่าสามารถจับกับตัวรับชนิดนี้ได้เช่นกัน โดยพบว่า RAGE มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่อของผู้ป่วย FAP และสามารถจับกับเส้นใย amyloid แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ nuclear transcription factor kB (NF-kB) ซึ่งไปเพิ่มการผลิตสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบและไปกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ แล้วส่งผลให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบประสาทในผู้ป่วย FAP (Sousa *et al.*, 2000; 2001) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเส้นใย amyloid ของ TTR variant อาจกระตุ้นผ่านกลไกใดกลไกหนึ่งแล้วส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์

## สรุป

จากการศึกษาสรุปได้ว่า *P. pastoris* เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตและหลังโปรตีน TTR ถูกผสมออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งง่ายต่อการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ โดย TTR ที่ผลิตได้มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับ TTR ที่แยกมาจากพลาสมาของคน โดย TTR variant ที่พบในคนไทย และทำการศึกษานี้มีความสามารถในการเกิดเป็นเส้นใย amyloid ที่สภาวะปกติได้เร็วกว่า L55P ซึ่งเป็น

TTR กลายพันธุ์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคได้เร็วและรุนแรง และยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ human neuroblastoma อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่า TTR variant มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดโรคได้เช่นเดียวกัน ความเข้าใจในรูปแบบผลกระทบของเส้นใย amyloid ต่อเซลล์และความเสถียรของโครงสร้าง tetramer ของ TTR จะช่วยในการหาวิธีป้องกันหรือรักษาโรคจาก TTR variant นี้ ดังนั้นการศึกษากลไกความเป็นพิษต่อเซลล์และความเสถียรทางโครงสร้างจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2554 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนอุดหนุนโครงการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและเงินทุนสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

สุภาวดี แก้วมีชัย. 2549. การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของ recombinant amyloid transthyretin. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspective for heterologous protein production. **Applied**

**Microbiology Biotechnology** 98(12): 5301-5317.

Ando, Y., Nakamura, M. and Araki, S. 2005. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. **Archives of Neurology** 62(7): 1057-1062.

Arsequell, G. and Planas, A. 2012. Methods to evaluate the inhibition of TTR fibrillogenesis induced by small ligands. **Current Medical Chemistry** 19(1): 1-13.

Babbes, A.R.H., Powers, E.T. and Kelly, J.W. 2008. Quantification of the thermodynamically linked quaternary and tertiary structural stabilities of transthyretin and its disease-associated variants-the relationship between stability and amyloidosis. **Biochemistry** 47(26): 6969-6984.

Balamurugan, V., Reddy, G.R. and Suryanarayana, V.V.S. 2007. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-vaccines. **Indian Journal of Biotechnology** 6: 175-180.

Carr, A.S., Pelayo-Negro, A.L., Jaunmuktane, Z., Scalco, R.S., Hutt, D., Evans, M.R., Heally, E., Brandner, S., Holton, J., Blake, J., Whelan, C.J., Wechlekar, A.D., Gillmore, J.D., Hawkins, P.N. and Reilly, M.M. 2015. Transthyretin V122I amyloidosis with clinical and histological evidence of amyloid neuropathy and myopathy. **Neuromuscular Disorders** 25(6): 511-515.

Cavallaro, T., Martone, R.L., Dwork, A.J., Schon, E.A. and Herbert, J. 1990. The retinal

- pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 31(3): 497-501.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. **FEMS Microbiology Review** 24(1): 45-66.
- Duan, W., Richardson, S.J., Kohrle, J., Chang, L., Southwell, B.R., Harms, P.J., Brack, C.M., Petterson, T.M. and Schreiber, G. 1995. Binding of thyroxine to pig transthyretin, its cDNA structure, and other properties. **European Journal of Biochemistry** 230(3): 977-986.
- Ferreira, P., Anna, O.S., Varejao, N., Lima, C., Novis, S., Barbosa, R.V., Caldeira, C.M., Rumjnek, F.D., Ventura, S., Cruz, M.W. and Foguel, D. 2013. Structure-based analysis of transthyretin involved in familial amyloid cardiomyopathy. **Plos One** 8(12): 1-14.
- Groenning, M. 2010. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. **Journal of Chemical Biology** 3: 1-18.
- Hou, X., Richardson, S.J., Aguilar, M.I. and Small, D.H. 2005. Binding of amyloidogenic transthyretin to the plasma membrane alters membrane fluidity and induces neurotoxicity. **Biochemistry** 44(34): 11618-11627.
- Ikeda, S. 2004. Cardiac amyloidosis: Heterogenous pathogenic backgrounds. **Internal Medicine** 43(12): 1107-1114.
- Jacobson, D.R., Pastore, R.D., Yaghoubian, R., Kane, I., Gallo, G., Buck, F.S. and Buxbaum, J.N. 1997. Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans. **The New England Journal of Medicine** 336(7): 466-473.
- Jiang, X., Buxbaum, J.N. and Kelly, J.W. 2001. The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate-limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98(26): 14943-14948.
- Khurana, R., Coleman, C., Zanetti, C.I., Carter, S.A., Krishna, V., Grover, R.K., Roy, R. and Sing, S. 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. **Journal of Structure Biology** 151: 229-238.
- Kierdorf, K. and Fritz, G. 2013. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. **Journal of Leukocyte Biology** 94: 55-68.
- Lai, Z., Colon, W. and Kelly, J.W. 1996. The acid-mediated denaturation pathway of transthyrtin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. **Biochemistry** 35: 6470-6848.
- Lashuel, H.A., Wurth, C., Woo, L. and Kelly, J.W. 1999. The most pathogenic transthyretin variant, L55P, form amyloid fibrils under acidic conditions and protofilaments under physiological conditions. **Biochemistry** 38: 13560-13573.

- Leelawatwattana, L., Praphanphoj, V. and Prapunpoj, P. 2011. Effect of the N-terminal sequence on the binding affinity of transthyretin for human retinol-binding protein. **FEBS Journal** 278(18): 3337-3347.
- Palha, J.A. 2002. Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** 40(12): 1292-1300.
- Patrick, S.M., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast** 22: 249-270.
- Prapunpoj, P., Leelawatwattana, L., Schreiber, G. and Richardson, S.J. 2006. Change in structure of the N-terminal region of transthyretin produces change in affinity of transthyretin to T4 and T3. **FEBS Journal** 273(17): 4013-4023.
- Prapunpoj, P., Richardson, S.J. and Schreiber, G. 2002. Crocodile transthyretin: structure, function, and evolution. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology** 283(4): R885-R896.
- Quintas, A., Sariava, M.J.M. and Brioto, R.M.M. 1997. The amyloidogenic potential of transthyretin variants correlates with their tendency to aggregate in solution. **FEBS Letters** 418(3): 297-300.
- Quintas, A., Sariava, M.J.M. and Brioto, R.M.M. 1999. The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A NOVEL MODEL FOR AMYLOIDOGENESIS. **Journal of Biological Chemistry** 274(46): 32943-32949.
- Quintas, A., Vaz, D.C., Cardoso, I., Sariava, M.J.M. and Brioto, R.M.M. 2001. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. **Journal of Biological Chemistry** 276(29): 27207-27213.
- Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J.W. and Buxbaum, J.N. 2004. Tissue damage in the amyloidosis: 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.
- Sant'anna, R.O., Braga, C.A., Polikarpov, I., Ventura, S., Mauricio, L., Lima, T.R. and Foguel, D. 2013. Inhibition of human transthyretin aggregation by non-steroidal anti-inflammatory compounds: A structural and thermodynamic analysis. **International Journal of Molecular Sciences** 14(3): 5284-5311.
- Schmidt, A.M., Yan, S.D., Yan, S.F. and Stern, D.M. 2000. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. **Biochimica et Biophysica Acta** 1498: 99-111.
- Schreiber, G. 2002. The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. **Clinical**

- Chemistry and Laboratory Medicine** 40(12): 1200-1210.
- Sebastião, M.P., Saraiva, M.J. and Damas, A.M. 1998. The crystal structure of amyloidogenic Leu55Pro transthyretin variant reveals a possible pathway for transthyretin polymerization into amyloid fibrils. **Journal of Biological Chemistry** 273(38): 24715-24722.
- Sousa, M.M., Fernandes, R., Palha, J.A., Taboada, A., Vieira, P. and Saraiva, M.J. 2002. Evidence for early cytotoxic aggregates in transgenic mice for human transthyretin Leu55Pro. **The American Journal of Pathology** 161(5): 1935-1948.
- Sousa, M.M. and Saraiva, M.J. 2003. Neurodegeneration in familial amyloid polyneuropathy: from pathology to molecular signaling. **Progress in Neurobiology** 71(5): 385-400.
- Sousa, M.M., Yan, S.D., Fernandes, R., Guimaraes, A., Stern, D. and Sariaiva, M.J. 2001. Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathway. **The Journal of Neuroscience** 21(19): 7576-7586.
- Sousa, M.M., Yan, S.D., Stern, D. and Sariaiva, M.J. 2000. Interaction of the receptor for advanced glycation end product (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. **Laboratory Investigation** 80(7): 1101-1110.
- Terry, C., Damas, A.M., Oliveira, P., Saraiva, M.J., Alves, I., Costa, P., Sakaki, Y. and Blake, C. 1993. Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. **The EMBO Journal** 12(2): 735-741.
- Ueda, M. and Ando, Y. 2014. Recent advances transthyretin amyloidosis therapy. **Translational Neurodegeneration** 3(19): 1-10.
- Westen, M.W.T., van der Bosch, T.J., Wind, R.D., Mooibroek, H. and de Wolf, F.A. 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast** 15(11): 1087-1096.
- Xiang, Q., Bi, R., Xu, M., Zhang, D.F., Tan, L., Zhang, C., Fang, Y., Yao, Y.G. 2017. Rare genetic variants of the transthyretin gene and associated with Alzheimer's disease in Han Chinese. **Molecular Neurobiology** 54(7): 5192-5200.
- Yang, M., Lei, M. and Huo, S. 2003. Why is Leu55→Pro55 transthyretin variant the most amyloidogenic: Insight from molecular dynamics simulations of transthyretin monomers. **Protein Science** 12: 1222-1