

บทบาทของกลุ่มโปรตีนเอ็มเทอร์ 2 ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีนเทา
ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Role of mTOR complex 2 on tau phosphorylation associated with
Alzheimer's disease

Mr. Narawit Pacharakullanon



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นราวิชญ์ พชรกุลนนท์ : บทบาทของกลุ่มโปรตีนเอ็มเทอร์ 2 ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีนเทาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ (Role of mTOR complex 2 on tau phosphorylation associated with Alzheimer's disease) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ดร.นพัต จันทรวิสูตร, หน้า.

โรคอัลไซเมอร์ เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคสมองเสื่อม เกิดจากโปรตีน A β และ tau ที่ตกตะกอนภายในและภายนอกเซลล์ประสาทตามลำดับ และเกิดเป็น amyloid beta plaques และ neurofibrillary tangles (NFT) โปรตีน mTOR complexes ซึ่งเป็น serine/threonine protein kinase ถูกจัดกลุ่มออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ mTORC1 และ mTORC2 โดย mTORC1 นั้นมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน และการแบ่งตัวของเซลล์ ในขณะที่ mTORC2 นั้นเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่พบหลักฐานการศึกษาว่า mTORC2 มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (hyperphosphorylation) ของโปรตีน tau หรือไม่ ดังนั้น งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง mTORC2 กับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติบนโปรตีน tau โดยตรวจสอบการทำงานของโปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis พบว่า การทำงานที่ลดลงของ mTOR complexes ภายใต้สภาวะบ่มเซลล์ด้วย AZD8055 และสภาวะยับยั้งการแสดงออกของยีน *RICTOR* สามารถลดปริมาณ pTau (Ser214) ได้ นอกจากนี้ จากการศึกษาตำแหน่งของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mTORC2 และ tau พบว่าโปรตีนเหล่านี้น่าจะมีปฏิสัมพันธ์กัน จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง mTORC2 และ tau ด้วยเทคนิค affinity purification mass spectrometry เพื่อค้นหาโปรตีนที่ทำงานร่วมกันเป็นระบบ เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง พบว่า mTORC2 และ tau อาจจะไม่ได้อัปกันโดยตรง อย่างไรก็ตาม มีโปรตีนตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับทั้ง mTORC2 และ tau โดยเฉพาะโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ คือ gelsolin, plectin, cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 และ lamin-B2 นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่อาจจะเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ คือ Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1 และ Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma ดังนั้น งานวิจัยนี้สามารถแสดงให้เห็นว่า mTORC2 มีการทำงานร่วมกันผ่านโปรตีนตัวกลาง และ mTORC2 น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติบนโปรตีน tau ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคอัลไซเมอร์

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

5974008530 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS:

NARAWIT PACHARAKULLANON: Role of mTOR complex 2 on tau phosphorylation associated with Alzheimer's disease. ADVISOR: NAPHAT CHANTARAVISOOT, Ph.D., pp.

The causes of Alzheimer's disease (AD) are amyloid beta plaques and neurofibrillary tangles in neuronal cell that deposited from A β and tau. mTOR is a serine/threonine protein kinase present in two distinct multiprotein complexes. The mTORC1 can regulate many biological processes, such as protein synthesis and cell proliferation while mTORC2 is implicated in cytoskeleton reorganization. However, the relationship between mTORC2 and tau phosphorylation has not been reported. Therefore, the aim of this study is to determine the relationship between mTORC2 and hyperphosphorylation on tau. Protein activities were investigated by western blotting analysis. We found that the decrease of mTOR complexes activities in cells treated with AZD8055 and RICTOR siRNA resulted in reduced phosphorylated tau at Ser214. Colocalizations were investigated by immunofluorescence staining. We found that RICTOR and tau may interact so we further determine protein-protein interactions. Affinity purification mass spectrometry was performed to identify candidate proteins purified by antibodies against RICTOR and tau. The results showed that several cytoskeleton-associated proteins which are gelsolin, plectin, cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 and lamin-B2 were identified. In addition, proteins associated with AD such as Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1 and Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma were also found. However, direct interaction between RICTOR and tau was not observed. Overall results suggested that these proteins may connect mTORC2 and tau. The results from this study suggested that mTORC2 might play an important role in tau hyperphosphorylation that is associated with AD.

Department: Biochemistry Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความกรุณา ความเสียสละ และความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อเฉลิมฉลองในโอกาสที่ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงเจริญพระชนมายุ 60 พรรษา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นพิต จันทวิสูตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิจัย การทดลอง และคำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ในงานวิจัยครั้งนี้ การวิจัยครั้งนี้จะสำเร็จไม่ได้ถ้าไม่ได้รับความกรุณาจากท่าน

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน และ อาจารย์ ดร.กรกมล เลิศสุวรรณ กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ แนวทางแก้ไข และจุดบกพร่องจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ คุณธรรม จริยธรรม ตลอดการศึกษาที่ผ่านมา

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษา และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำวิจัย

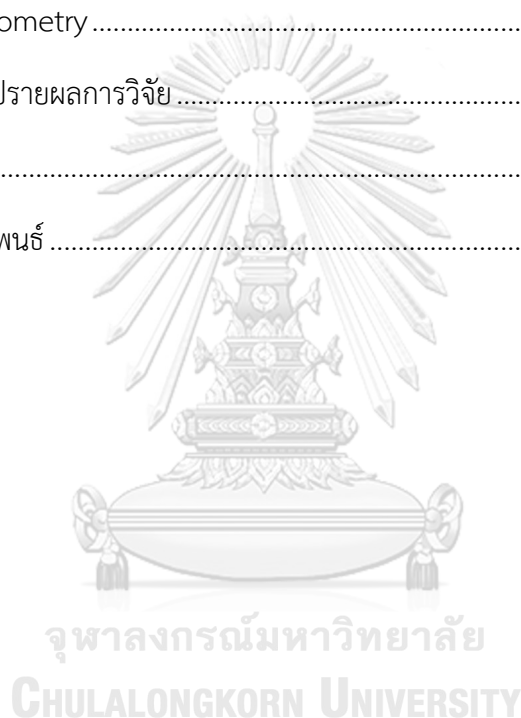
ขอขอบคุณสมาชิก ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ด้านชีววิทยาเชิงระบบ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUSB) ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา และขอบคุณเพื่อนๆ หลักรัฐวิทย์ชีวเคมีทางการแพทย์ ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย	1
1.2. คำถามการวิจัย	2
1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
1.4. สมมติฐานการวิจัย	3
1.5. แนวคิดการวิจัย	3
1.6. ข้อตกลงเบื้องต้น	4
1.7. คำสำคัญ.....	4
1.8. คำนิยามเชิงปฏิบัติการ.....	4
1.9. รูปแบบการวิจัย	4
1.10. ระเบียบวิธีการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 โรควัลไซเมอร์ และ กลไกการเกิด.....	6
2.2 Microtubule และ microtubule-associated proteins (MAPs)	11
2.3 mTOR pathway.....	14
2.4 เทคนิค affinity purification mass spectrometry.....	19

2.5 เทคนิค RNA interference (RNAi).....	21
2.6 mTOR inhibitor และ protein phosphatase inhibitor.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.4 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ.....	29
3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการ treatment เซลล์ด้วย mTOR และ protein phosphatase inhibitor.....	29
3.4.2 การลดการแสดงออกของยีน RICTOR ด้วย RICTOR siRNA.....	30
3.4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค immunoprecipitation (IP).....	30
3.4.4 การตรวจสอบลักษณะของโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry (In-gel trypsin digests และ LC-MS/MS).....	31
3.4.5 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis.....	32
3.4.6 การหาตำแหน่งของโปรตีนด้วยเทคนิค immunofluorescence staining (IF).....	34
3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	35
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	35
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
4.1 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน tau ในเซลล์ประสาทและเซลล์เกลีย.....	36
4.2 การยับยั้งการทำงานของ mTORC2 มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214.....	38
4.3 การกระตุ้นการทำงานของ mTORC2 มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214.....	40

4.4 การลดการแสดงออกของยีน <i>RICTOR</i> ไม่มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214	43
4.5 โปรตีน mTORC2 กับ tau มี localization ร่วมกัน.....	45
4.6 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง <i>RICTOR</i> และ tau ด้วยเทคนิค immunoprecipitation (IP).....	46
4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง <i>RICTOR</i> และ tau ด้วยเทคนิค affinity purification mass spectrometry	47
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	59
รายการอ้างอิง	63
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	69



สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างสมองคนปกติ (ชาย) และสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (ขวา) (13).....	6
รูปที่ 2 แสดงการเกิด A β บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์สมอง (3).....	8
รูปที่ 3 แสดงการแสดงออกของยีน MAPT (4).....	9
รูปที่ 4 แสดง epitope ทั้งหมด บนโปรตีน tau (4).....	9
รูปที่ 5 แสดงการเกิด NFTs ในเซลล์ประสาท (4).....	10
รูปที่ 6 แสดงการสร้างและสลายของไมโครทิวบูลสายยาว (19).....	12
รูปที่ 7 แสดงโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับไมโครทิวบูล (20).....	13
รูปที่ 8 แสดงองค์ประกอบของกลุ่มโปรตีน mTORC1 และ mTORC2 (6).....	14
รูปที่ 9 แสดงกลไกการควบคุม mTOR complexes (5).....	15
รูปที่ 10 แสดงการควบคุม mTOR ผ่าน amino acid และ growth factor (6).....	17
รูปที่ 11 แสดงวิธี direct (ชาย) และ indirect immunoprecipitation (ขวา) (26).....	20
รูปที่ 12 แสดง workflow การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry (25).....	20
รูปที่ 13 แสดงกระบวนการ RNA interference.....	21
รูปที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบการทำงานของ siRNA (27).....	22
รูปที่ 15 แสดงกลไกการทำงานของ rapamycin (29).....	23
รูปที่ 16 แสดงการทำงานของ PP2A (30).....	24
รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของ tau กับ PP2A (31).....	24
รูปที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน tau ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด.....	36
รูปที่ 19 แสดงการทำงานของโปรตีน AKT, S6, tau และ GAPDH ที่สภาวะ mTOR complexes ถูกยับยั้ง.....	38
รูปที่ 20 แสดง localization ของโปรตีน RICTOR, mTOR, Tau และ nucleus.....	39

รูปที่ 21 แสดงการทำงานของโปรตีน AKT, S6, Tau และ GAPDH ที่สภาวะ mTOR complexes ถูกกระตุ้น และมีการเติม OA.....	40
รูปที่ 22 แสดง localization ของโปรตีน RICTOR, tau (Ser214) และ nucleus ในสภาวะกระตุ้นการทำงานของ mTOR complexes	42
รูปที่ 23 แสดงการทำงานของโปรตีน RICTOR, AKT, S6, Tau และ GAPDH ที่สภาวะลดการแสดงออกของยีน <i>RICTOR</i>	43
รูปที่ 24 แสดง localization ของโปรตีน RICTOR, tau (Ser214) และ nucleus ในสภาวะลดการแสดงออกของยีน <i>RICTOR</i>	44
รูปที่ 25 แสดง localization ของโปรตีน mTOR, tau, RICTOR และ nucleus	45
รูปที่ 26 แสดงผลการตรวจสอบ tau IP และ RICTOR co-IP.....	46
รูปที่ 27 แสดงผลการตรวจสอบ RICTOR IP และ tau co-IP.....	47
รูปที่ 28 แสดง band ของ Tau and RICTOR IP บนเจล	48
รูปที่ 29 แสดงจำนวนโปรตีนที่พบใน Tau และ RICTOR IP ในการทดลองครั้งที่ 1	48
รูปที่ 30 แสดงการจัดกลุ่ม Molecular Function ใน 50 candidate proteins.....	51
รูปที่ 31 แสดงการจัดกลุ่ม Biological Process ใน 50 candidate proteins	52
รูปที่ 32 แสดงการจัดกลุ่ม Cellular Component ใน 50 candidate proteins.....	52
รูปที่ 33 แสดงการทำงานของ gelsolin (39).....	54
รูปที่ 34 แสดงจำนวนโปรตีนที่พบใน Tau และ RICTOR IP ในการทดลองครั้งที่ 2	56
รูปที่ 35 แสดงจำนวนโปรตีนที่พบใน Tau และ RICTOR IP ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง	58
รูปที่ 36 แสดงการควบคุมแบบย้อนกลับของ mTORC1 (52)	60
รูปที่ 37 แสดงผลการทดลองจากงานวิจัยของ Frost และคณะ (46).....	62

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดง 50 candidate proteins ที่ได้จาก Tau และ RICTOR IP	49
ตารางที่ 2 แสดง 10 candidate proteins ที่ได้จาก Tau และ RICTOR IP	56



บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

ในปัจจุบันพบว่ามีการระบาดของโรคที่สำหรับผู้สูงอายุประมาณ 1 ใน 4 เสี่ยงต่อการเป็นโรคสมองเสื่อม (dementia) และประมาณร้อยละ 60-80 ในประชากรกลุ่มนั้นเป็นโรคสมองเสื่อมที่เกิดจากโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD) ทำให้ผู้ป่วยมีความจำ ความคิด การใช้เหตุผล การใช้ภาษา และการรับรู้สิ่งแวดล้อม ผิดปกติไป (1, 2) อาการต่าง ๆ เกิดจากเซลล์สมองที่ตายมากผิดปกติ โดยสาเหตุของเซลล์ประสาทที่ตายเกิดจากความผิดปกติของโปรตีน amyloid beta ($A\beta$) และ tau ซึ่งโปรตีนทั้งสองนี้เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิด amyloid beta plaques และ neurofibrillary tangles (NFT) ตามลำดับ ทำให้เกิดภาวะโปรตีนตกตะกอนภายนอกและภายในเซลล์ ส่งผลทำให้ขัดขวางการทำงานของเซลล์สมองบริเวณไซแนปส์ (synapse) และสุดท้ายทำให้เซลล์สมองตายในที่สุด ดังนั้น amyloid beta และ tau จึงเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำงานร่วมกัน และก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (3)

$A\beta$ เกิดจาก amyloid precursor protein (APP) ถูกตัดผิดตำแหน่ง ทำให้กลายเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ มีสาเหตุหลักมาจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ผลิตเอนไซม์ ซึ่งทำหน้าที่ตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ ทำให้ $A\beta$ นั้นมีน้ำหนักโมเลกุลที่หลากหลาย จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า $A\beta$ oligomer โดยเฉพาะ $A\beta_{42}$ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น tau ทำให้หลุดออกจากไมโครทิวบูล เนื่องจากเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต ของโปรตีน tau มากผิดปกติ ส่งผลทำให้ตกตะกอนภายในเซลล์ อย่างที่ทราบกันดีว่า ไมโครทิวบูลนั้น ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนของเซลล์ และมีโปรตีน tau เป็นตัวเหนี่ยวรั้ง ไมโครทิวบูลเกิดสภาวะสมดุล เมื่อเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป (hyperphosphorylation) บนตำแหน่งที่จำเพาะทำให้ tau กลายเป็นโปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ และหลุดออกแล้วจับกันกลายเป็น paired helical filaments (PHF) และ neurofibrillary tangles (NFT) ตามลำดับ และเกิดเป็นตะกอน plaque ภายในเซลล์ประสาทโดยเฉพาะบริเวณไซแนปส์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรตีน tau อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีน mTOR complexes เนื่องจากเป็นโปรตีน kinase หลักที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ (3, 4)

Mechanistic/Mammalian target of rapamycin (mTOR) เป็นโปรตีนกลุ่มเดียวกับ phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases (PI3K หรือ PIKKs) ซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีนอีกหลายชนิด mTOR แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามโปรตีน scaffold คือ mTORC1 และ mTORC2 กลุ่มโปรตีน mTORC1 เป็นกลุ่มโปรตีนที่เปรียบเสมือนเป็นแกนกลางของเมแทบอลิซึม ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน ไขมัน ยับยั้งการสร้างไลโซโซม (lysosome) และการเกิดกระบวนการกลืนกิน

ตัวเองของเซลล์ (autophagy) รวมไปถึงควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของพลังงาน ในขณะที่ mTORC2 เกี่ยวข้องกับโครงสร้างค้ำจุนของเซลล์ โดยกลุ่มโปรตีน mTOR ทั้งสองกลุ่ม สามารถถูกกระตุ้นได้จาก growth factor นอกจากนี้ mTORC1 ยังสามารถถูกกระตุ้นจากสารอาหารต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน และกลูโคส และสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย rapamycin แต่ rapamycin ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ (5, 6) จึงมีสารอีกประเภทหนึ่งที่มีฤทธิ์เป็น ATP-competitive inhibitors มีชื่อว่า AZD8055 มีความสามารถในการยับยั้ง mTOR ทั้งสอง complex ได้ (7) มีรายงานว่า mTORC1 มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน tau ดังนี้ 1) เพิ่มปริมาณโปรตีน tau ผ่านการสังเคราะห์โปรตีน 2) ควบคุมการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) บน tau ที่ตำแหน่งจำเพาะ 3) เกี่ยวข้องกับการเกิด cell cycle re-entry ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์สมองตาย (8) ส่วน mTORC2 เป็นตัวควบคุมของ mTORC1 ผ่าน protein kinase B (AKT) ดังนั้น mTOR complexes จึงอาจมีส่วนช่วยทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ mTOR กับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปบนโปรตีน tau นักวิจัยมุ่งเน้นเฉพาะส่วนของ mTORC1 (9) อย่างไรก็ตามยังไม่พบหลักฐานการศึกษาว่า mTORC2 มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน tau ที่มากเกินไปหรือไม่ เนื่องจากยังไม่ทราบกลไกการควบคุมของ mTORC2 ที่ชัดเจน

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์และกลไกของ mTORC2 กับโปรตีน tau ว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่มากเกินไป ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยทำการศึกษาในเซลล์ SHSY-5Y ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อสมอง (neuroblastoma) ที่มีการแสดงออกของโปรตีน tau มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ (10) และหาก mTORC2 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของโปรตีน tau จริง อาจนำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ งานวิจัยนี้จึงอาจจะเป็นรากฐานสำคัญในการหา biomarker ของโรคอัลไซเมอร์ และอาจนำไปสู่การรักษาโรคอัลไซเมอร์ ผ่านการลดการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไปของโปรตีน tau ซึ่งเป็นการรักษาที่ตรงจุดมากที่สุด เนื่องจากโปรตีน tau พบมากในเซลล์ประสาท (neuronal cells) (4)

1.2. คำถามการวิจัย

mTORC2 มีบทบาทในการควบคุมการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน tau หรือไม่ อย่างไร?

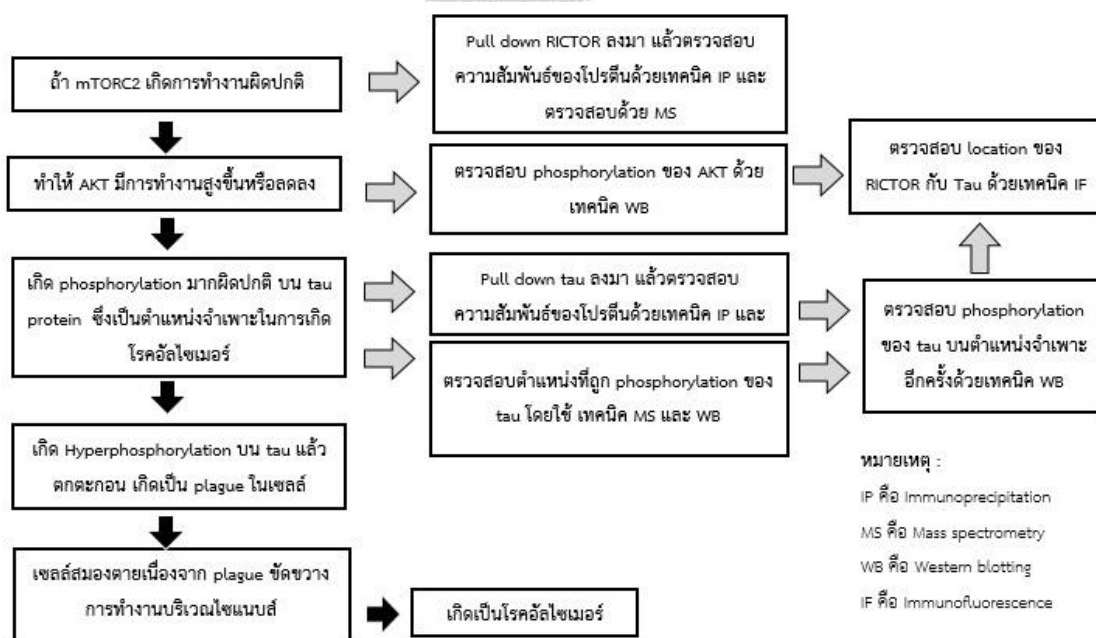
1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง mTORC2 กับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติของโปรตีน tau
- เพื่อศึกษาตำแหน่งที่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่มีความสัมพันธ์กับ mTORC2
- เพื่อเปรียบเทียบการใช้สารยับยั้ง (inhibitor) หรือ การลดการแสดงออกของยีน (gene knockdown) *RICTOR* ต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติของโปรตีน tau ในเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อประสาท

1.4. สมมติฐานการวิจัย

mTORC2 มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน tau บนตำแหน่งจำเพาะของที่มีความสำคัญในการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ และการลดการทำงานของ mTORC2 อาจช่วยลดการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติบนโปรตีน tau ได้

1.5. แนวคิดการวิจัย



1.6. ข้อตกลงเบื้องต้น

เครื่องมือและชุดการทดสอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของการทดสอบเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้น ๆ

1.7. คำสำคัญ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease), ไมโครทิวบูล (Microtubule), tau, phosphorylated tau, mechanistic target of rapamycin (mTOR)

1.8. คำนิยามเชิงปฏิบัติการ

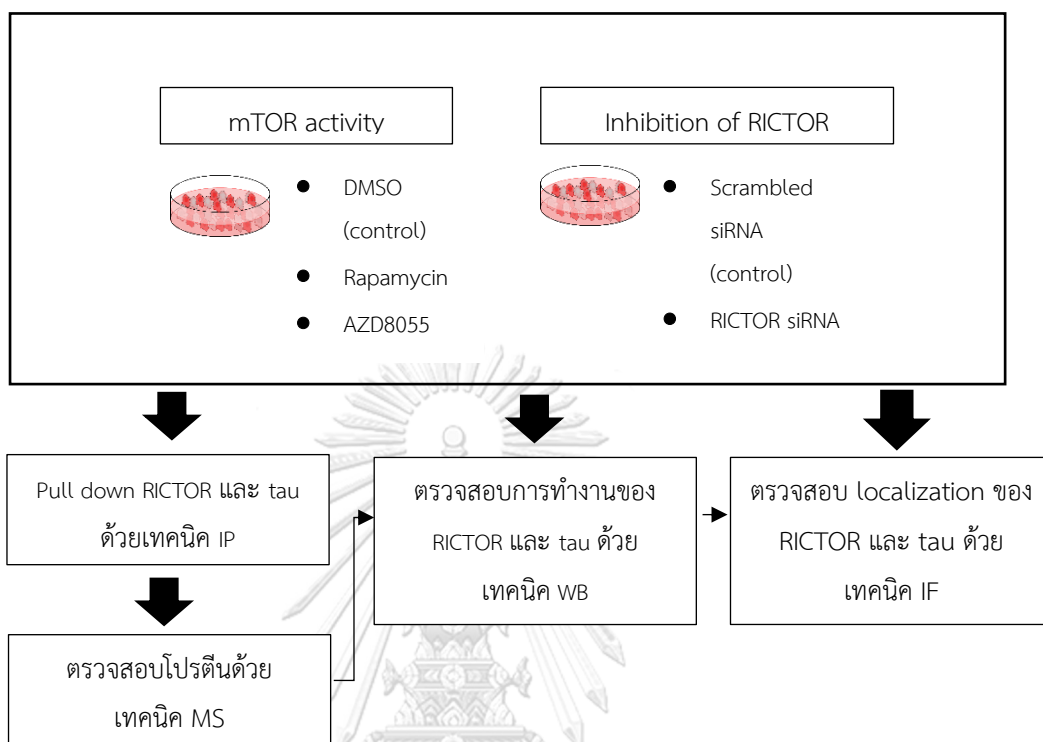
- Western blotting (WB) คือ เทคนิคการ probe antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเป็น antigen ที่อยู่บน nitrocellulose หรือ PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane ที่ได้จากการแยกโปรตีน ด้วย gel electrophoresis ตามขนาดโมเลกุล เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (protein ladder)
- Immunoprecipitation (IP) คือ เทคนิคการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยการตกตะกอนโดยจับกับ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมาย โดยมี matrix เป็นตัวช่วยจับ ได้แก่ agarose หรือ sepharose เป็นต้น
- Mass spectrometry (In-gel trypsin digestion และ LC-MS/MS) เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์ผล การวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุ ใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาค หรือโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล เช่น peptide โดยสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบต้องเป็นสารที่มีประจุเท่านั้น
- Immunofluorescence staining (IF) เทคนิคการ probe antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน ซึ่งเป็น antigen ในเซลล์ แล้ววิเคราะห์หาตำแหน่งของโปรตีนผ่านการเปล่งแสงของฟลูออเรสเซนต์ที่ติดกับ antibody ที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

1.9. รูปแบบการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้ใช้รูปแบบการวิจัยลักษณะ experimental study โดยมีตั้งสมมุติฐาน, ทดสอบสมมุติฐานโดยการทดลองทางวิทยาศาสตร์, สรุปและอภิปรายผลการทดลองจากงานวิจัยก่อนหน้า

1.10. ระเบียบวิธีการวิจัย

Study flow diagram ลำดับการทำงานวิจัยนี้แสดงในแผนภูมิด้านล่าง



บทที่ 2

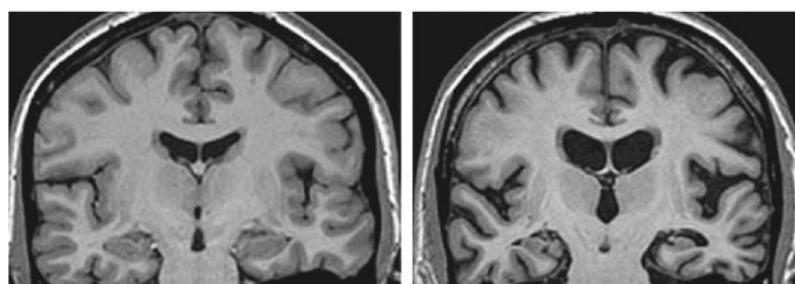
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคอัลไซเมอร์ และ กลไกการเกิด

โรคสมองเสื่อม เป็นภาวะที่สมองเกิดความผิดปกติของสมองในด้านความจำ ความคิด การใช้เหตุผล การใช้ภาษา และการรับรู้จากสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อการใช้ชีวิต และการทำกิจวัตรประจำวัน เมื่ออาการดังกล่าวมีความรุนแรงมากขึ้นจะทำให้ผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมจะไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ และอาจเสียชีวิตลงในที่สุด (1) ในปี 2015 มีประชากรทั่วโลกทั้งสิ้น 7.2 พันล้านคน มีผู้ป่วยเป็นโรคสมองเสื่อมมากกว่า 46.8 ล้านคน และในปี 2050 อาจเพิ่มไปถึง 131.5 ล้านคน (11) ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมส่วนมากเป็นผู้สูงอายุเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ซึ่งร้อยละ 60 – 80 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมนั้นเกิดจากโรคอัลไซเมอร์ (1) ส่วนในประเทศไทยนั้น มีผลการสำรวจในปี พ.ศ.2542-2544 โดยใช้แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้น ในผู้สูงอายุ 23 จังหวัด จำนวน 37,157 คน โดยสถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ ประชากรอายุมากกว่า 60 ปี มีภาวะสมองเสื่อมร้อยละ 11.4 โดยพบอัตราการเกิดโรค ในกลุ่มอายุ 60-69 ปี ประมาณร้อยละ 8.8 และอัตราการเกิดโรค เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 41.4 ในผู้ที่มีอายุมากกว่า 80 ปี (12)

Healthy Control

Alzheimer's Disease



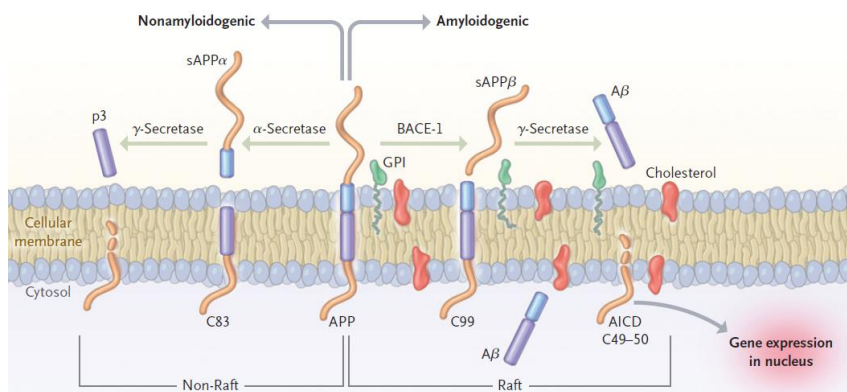
รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างสมองคนปกติ (ซ้าย) และสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (ขวา) (13)

จากอาการดังกล่าวของโรคอัลไซเมอร์ที่สมองทำงานผิดปกตินั้น อันเนื่องมาจากเซลล์ประสาทตายมากกว่าปกติ ทำให้ปริมาตรของสมองลดลง จากการทำ magnetic resonance imaging (MRI) ดังรูปที่ 1 จึงแบ่งอาการของโรคอัลไซเมอร์ตามบริเวณของสมองที่ถูกทำลายออกเป็น 3 ระยะอย่างคร่าว ๆ คือ ระยะเริ่มต้น ระยะกลาง และระยะสุดท้าย ซึ่งระยะสุดท้ายนี้ ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถใช้ชีวิตได้ตามปกติ เนื่องจากความผิดปกติในสมองส่วน cerebral cortex มีหน้าที่เก็บรักษาความจำ ความคิด ภาษา และการเรียนรู้ และสมองในส่วนของ hippocampus ซึ่งเป็นส่วนหนึ่ง

cerebral cortex ที่อยู่ลึกที่สุดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความคิด และความทรงจำระยะยาว (2, 14) การรักษาโรคอัลไซเมอร์จึงจำเป็นที่จะต้องรักษาในระยะแรกเริ่ม เนื่องจากเป็นระยะที่ยังสามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ที่แน่นอน รวมทั้งวิธีการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมกับผู้ป่วยในระยะเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถคัดกรองและวินิจฉัยผู้ป่วยได้อย่างแม่นยำ และยังไม่สามารถหา biomarker ซึ่งเป็นตัวชี้วัดในการคัดกรองโรคได้ ในปัจจุบันจึงวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์หรือไม่ โดยตรวจสอบได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตแล้วเท่านั้น จากการคัดกรองจากเทคนิค immunohistochemistry (IHC) ทำให้สามารถแบ่งลักษณะของเซลล์ตามการติดสีของแอนติบอดีได้ 2 ประเภท คือติดสีภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์ จึงเป็นที่มาของ 2 ทฤษฎีที่ได้รับการเชื่อถือว่าอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เป็นโรคอัลไซเมอร์คือ การเกิด amyloid beta plaques และ neurofibrillary tangles (NFT) ซึ่งเกิดจาก amyloid beta ($A\beta$) และ tau โปรตีนทั้งสองเกิดการตกตะกอนภายนอกและภายในเซลล์ตามลำดับ (3)

Amyloid beta ($A\beta$)

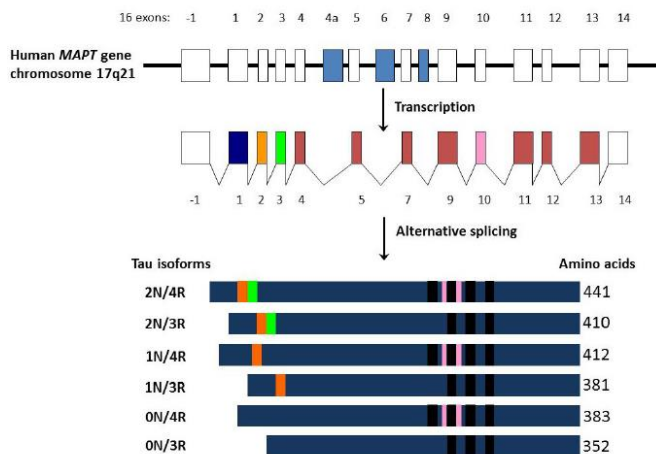
Amyloid beta ($A\beta$) เกิดจาก amyloid precursor protein (APP) เป็น soluble transmembrane glycoprotein ซึ่งหน้าที่โดยตรงของ $A\beta$ นั้นยังไม่ทราบอย่างชัดเจน ส่วนในเซลล์ที่ผลิตปกติมันจะเกิด proteolysis จาก beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE-1) หรือ β -secretase ทำการตัดที่ β -site แล้วได้โปรตีนท่อนขนาด 99 กรดอะมิโน จากนั้น γ -secretase จะตัดที่ตำแหน่งจำเพาะจะได้ $A\beta$ ที่เป็นโปรตีนหลายขนาดตั้งแต่ 36 - 43 กรดอะมิโน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีทั้งชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ $A\beta$ ที่ไม่ละลายน้ำจะตกตะกอนเป็นผลมาจาก $A\beta$ โมเลกุลหนึ่งที่เกิดความผิดปกติในการพับตัวของโปรตีน (misfolding) จะเหนี่ยวนำโมเลกุลอื่น ๆ โดยโมเลกุล $A\beta$ หลัก ๆ คือ $A\beta_{40}$ และ $A\beta_{42}$ ซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโน 40 และ 42 ตามลำดับ มีหลักฐานว่าโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ยีน APP ตำแหน่ง KM670/671NL หรือเรียกว่า Swedish mutation การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าว ส่งผลให้ APP ถูกตัดด้วย β -secretase มากกว่าถูกตัดด้วย α -secretase ส่งผลให้เกิด $A\beta$ ปริมาณมากเช่นกัน หรืออาจเกิดการกลายพันธุ์ที่โปรตีน presenilin ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนประกอบของ γ -secretase ส่งผลทำให้เกิด $A\beta_{42}$ เป็นโมเลกุลที่ละลายน้ำน้อยกว่า $A\beta_{40}$ เนื่องจากความมีขั้วของโมเลกุลที่สูงกว่า หลังจากนั้น $A\beta$ จะจับกันเป็นกลุ่มเรียกว่า $A\beta$ oligomer และขัดขวางการทำงานของเซลล์ประสาทบริเวณไซแนปส์ จึงไม่สามารถขนส่งสารสื่อประสาทได้ เซลล์จึงขาดการสื่อสารกันระหว่างเซลล์ และทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด ซึ่งตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิด $A\beta$ นั้นยังไม่ทราบอย่างชัดเจน (3)



รูปที่ 2 แสดงการเกิด A β บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์สมอง (3)

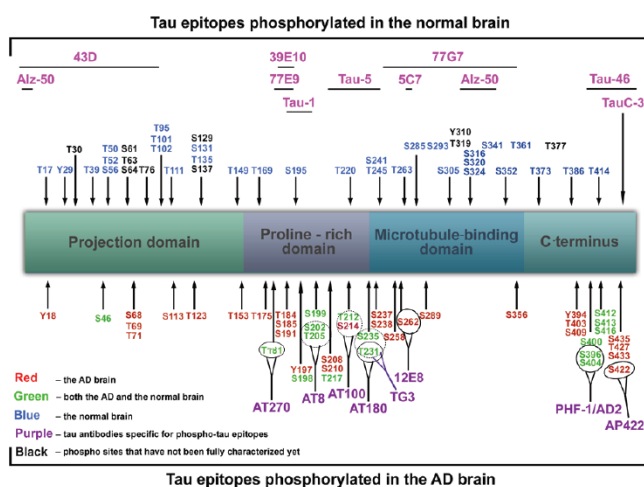
Neurofibrillary Tangles (NFT)

Neurofibrillary tangles (NFT) เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติ (hyperphosphorylation) บนโปรตีน tau ที่กรดอะมิโน serine และ threonine ที่บริเวณ kinase domain ทำให้โปรตีน tau หลุดออกจากไมโครทิวบูลกลายเป็นโมเลกุลไม่ที่ละลายน้ำ แล้วจับกันเป็น paired helical filaments (PHF) และ neurofibrillary tangles (NFT) เกิดเป็นคราบ plaque ภายในเซลล์เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยปกติแล้ว tau เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ มีหน้าที่ในการรักษาโครงสร้างของไมโครทิวบูล โดยไมโครทิวบูลเป็นโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ เช่นเดียวกับ microfilaments, intermediate filaments นอกจากนี้ tau protein ยังเกี่ยวข้องกับ การเกิดสายยาวของไมโครทิวบูล, การควบคุมขนาดและการขนส่งสารที่ปลาย axon ของเซลล์ ประสาท, การสร้างเซลล์ประสาท (neurogenesis) และการรักษาสถิตของโครงสร้างของเซลล์ประสาท (neuronal polarity) อีกด้วย โดยโปรตีน tau นั้น เป็นโปรตีนที่สร้างมาจากยีน *MAPT* (microtubule-associated protein tau) บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (*17q21*) ซึ่งมีทั้งหมด 16 exon พบมากในเซลล์ประสาทของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system หรือ CNS) และพบได้น้อยใน astrocytes, oligodendrocytes และ peripheral tissue ส่วนกลไกการควบคุมการแสดงของยีน *MAPT* ในอวัยวะอื่น ๆ นั้นยังไม่มีหลักฐานชัดเจน (10) จากรูปที่ 2 โปรตีน tau มีทั้งหมด 6 isoforms ที่เกิดจาก alternative splicing บริเวณ exon ที่ 2, 3 และ 10 (15) 2N4R เป็น full isoform ที่ไม่ได้ถูก splicing มีขนาด 441 กรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนส่วนใหญ่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของ tau นั้น ประกอบไปด้วย ปลาย N-terminal ที่เรียกว่า acidic projection domain เริ่มตั้งแต่กรดอะมิโนลำดับที่ 1-150 ต่อมากรดอะมิโนลำดับที่ 151-342 เรียกว่า proline-rich domain และตามมาด้วย microtubule binding domain (MBD) เป็นบริเวณที่จับกับ ไมโครทิวบูล มี flanking regions ที่แยกทั้ง 4 repeated motifs ออกจากกัน และสุดท้ายที่ปลาย C-terminal ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 370-441



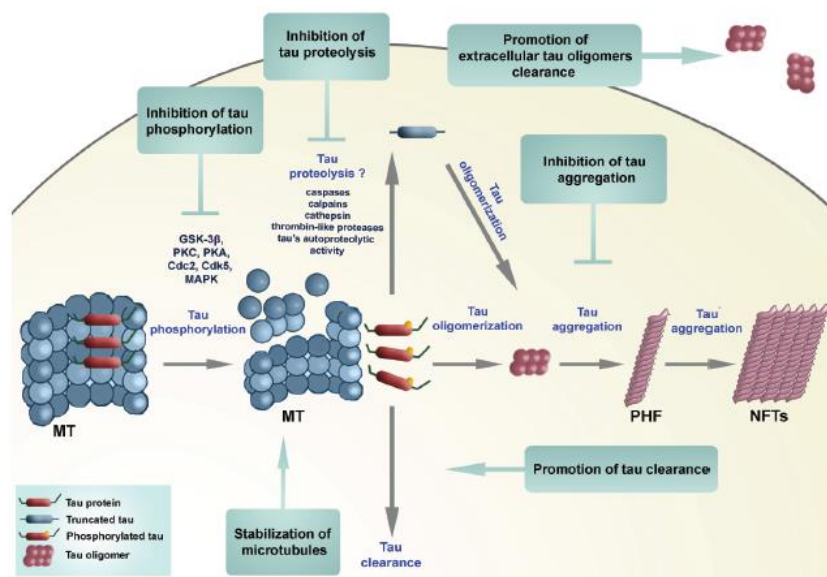
รูปที่ 3 แสดงการแสดงออกของยีน MAPT (4)

โดยปกติแล้วโปรตีน tau จะเกิด modification หลังจากกระบวนการ translation เสร็จแล้ว และถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) บนบางตำแหน่งที่ serine threonine และ tyrosine 45, 35 และ 5 ตำแหน่งตามลำดับ ซึ่งเป็นตำแหน่งจำเพาะต่อการเกิดสายยาวของไมโครทิวบูล แต่ในเซลล์ประสาทของผู้ป่วยอัลไซเมอร์นั้น โปรตีน tau จะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (hyperphosphorylation) บนกรดอะมิโน serine และ threonine ซึ่งเป็นตำแหน่งจำเพาะต่อการเกิดการตกตะกอนของ tau โดยอัตราการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตจะเกิดขึ้นมากกว่า 3 - 4 เท่าเมื่อเทียบกับในเซลล์สมอง เช่น Ser262, Ser293, Ser324 และ Ser356 เป็นตำแหน่งที่อยู่บน microtubule binding repeats ทำให้อัตราการ tau จับกับไมโครทิวบูลลดลง ในการศึกษา *In vitro* พบว่า การเติมหมู่ฟอสเฟตบนตำแหน่ง Ser214 Thr231 และ Ser235 สามารถทำให้อัตราการจับไมโครทิวบูลของ tau ลดลงได้เช่นกัน ดังรูปที่ 3



รูปที่ 4 แสดง epitope ทั้งหมด บนโปรตีน tau (4)

เมื่อเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติ แล้ว tau จะหลุดออกจากไมโครทิวบูล แล้วจับกันเองกลายเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ เรียกว่า PHF core เปรียบเสมือนตัวเหนียวนำที่ทำให้เกิด NFT โดยปกติแล้วเซลล์จะมีกระบวนการป้องกันโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau อีกโมเลกุลหนึ่ง แล้วไปจับกับ PHF core เพื่อนำไปกำจัด ซึ่งถ้ากำจัดไม่สำเร็จจะทำให้ PHF core ดังกล่าว สามารถที่จะเหนียวนำทำให้เกิดโมเลกุลที่เรียกว่า tau oligomers เซลล์จะมีการขนส่งโมเลกุลดังกล่าวผ่านกระบวนการ endocytosis, macropinocytosis และ endocytosis จนเกิดเป็น paired helical filaments (PHF) และ neurofibrillary tangles (NFT) ทำให้เซลล์สมองเกิดการดำเนินงานที่ผิดปกติอันเนื่องมาจากการเกิด oxidative stress เป็นผลมาจากการตอบสนองของเซลล์ในสภาวะเครียด จากการมีโปรตีนสะสมในปริมาณมากเกินไปจนทำให้เกิดความผิดปกติบริเวณไซแนปส์ (synaptic dysfunction) เนื่องจากไม่สามารถขนส่งสารสื่อประสาท และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (4) ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุว่าจุดเริ่มต้นที่ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติบนโปรตีน tau คือสารประเภทอะไร



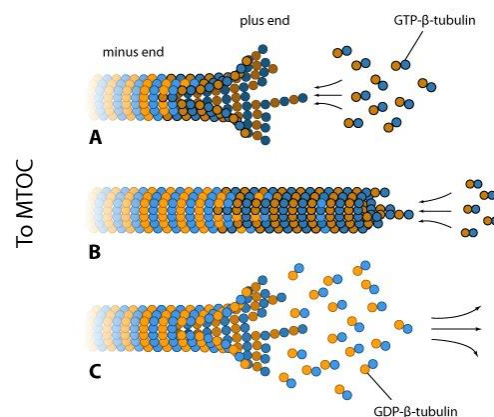
รูปที่ 5 แสดงการเกิด NFTs ในเซลล์ประสาท (4)

ทั้งนี้ มีหลักฐานงานวิจัยที่บ่งชี้ว่ามีโปรตีน kinase บางโมเลกุลสามารถกระตุ้น การเติมฟอสเฟตบน tau ได้ เช่น GSK-3 β , cdk5, p25, MAPK (p25 และ MAPK ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นของ cdk5), PKA และ AKT (3) ในทางตรงข้ามยังมี protein phosphatase เช่น PP2A มีความสามารถในการแย่งจับฟอสเฟตกับโมเลกุลในเซลล์ประสาทมากกว่า 70% โดยเชื่อว่าเป็นโปรตีนที่ช่วยลดการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติของ tau ได้ (9)

นอกจาก $A\beta$ และ tau จะก่อให้เกิดคราบ plaques และ tangles แล้ว มีการรายงานว่า โปรตีนทั้งสองมีการทำงานร่วมกัน โดย $A\beta_{42}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งที่ อาจทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์บน tau ได้แล้ว มีการวิจัยทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* กล่าวว่า hyperphosphorylated tau สามารถย้อนกลับมาควบคุม $A\beta$ ได้อีกด้วย เพราะว่า $A\beta$ และ tau มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายได้ดีในสมองผ่านกระบวนการขนส่งสารระหว่าง เซลล์ (4) และมีรายงานว่า synthetic $A\beta_{42}$, $A\beta_{3pE-42}$ และ $A\beta$ ที่คัดแยกจากเซลล์เพาะเลี้ยงมีความสามารถในการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติของโปรตีน tau มากกว่า $A\beta_{40}$ (16) จึง อาจสรุปได้ว่า $A\beta_{42}$ อาจจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของ tau ดังนั้นการยับยั้งการ กระตุ้นโปรตีนดังกล่าวจึงอาจเป็นแนวทางในการหาวิธีลดหรือยับยั้งการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มาก ผิดปกติบนโปรตีน tau เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

2.2 Microtubule และ microtubule-associated proteins (MAPs)

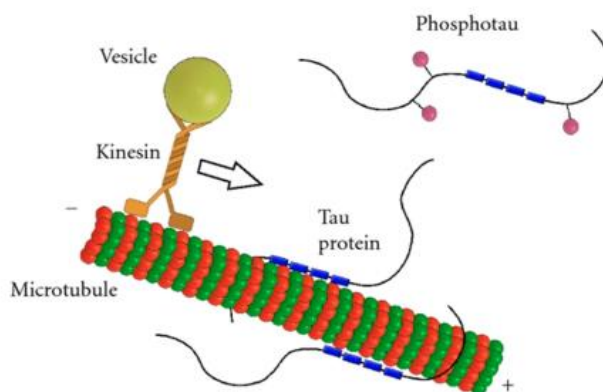
ไมโครทิวบูล (microtubule) เป็นโปรตีนโครงสร้างเช่นเดียวกับ microfilaments และ intermediate filaments ไมโครทิวบูลมีหน่วยย่อยคือ tubulin ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 นาโนเมตร กระบวนการสร้างไมโครทิวบูล เริ่มจาก γ -tubulin ทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำทำให้เกิด เป็น tubulin dimer หรือ heterodimer ที่ประกอบไปด้วย α -tubulin และ β -tubulin เรียกระยะ นี้ว่า nucleation จากนั้น tubulin dimer จะเข้ามาต่อกันเป็นสายยาว เรียกระยะนี้ว่า elongation เมื่อการสร้างเท่ากับการสลายของปลายทั้งสองข้างของไมโครทิวบูล เรียกว่าระยะ steady stage สำหรับ tubulin dimer บริเวณ β -tubulin จะมีตำแหน่งที่ให้ GTP หรือ GDP มาจับ เมื่อ GTP มา จับจะเหนี่ยวนำให้ tubulin dimer มาจับกันเป็นสายยาว เมื่อเซลล์ต้องการสร้างไมโครทิวบูลบริเวณ binding site ของ heterodimer จะจับกับ GTP หากต้องการสลายไมโครทิวบูลบริเวณ binding site ของ tubulin dimer ที่จับกับ GTP จะถูก hydrolyse กลายเป็น GDP ในสถานะที่เซลล์ต้องการ สร้างไมโครทิวบูลจะถูกกระตุ้นผ่าน microtubule organizing centers (MTOCs) โดยที่ tubulin dimer จะเรียงเป็นสายยาว เรียกว่า protofilament เมื่อ protofilament 13 สาย มาเรียงต่อกัน ตามแนวรัศมีจะเรียกว่า ไมโครทิวบูล (17, 18) ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการสร้างและสลายของไมโครทิวบูลสายยาว (19)

หน้าที่ของไมโครทิวบูลนั้นเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ cilia และ flagella และยังเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารภายในเซลล์ เช่น secretory vesicles, organelles และเป็น intracellular macromolecular เช่น dynein และ kinesin และยังเกี่ยวข้องกับการแยกโครโมโซม (กระบวนการ mitosis และ meiosis) ทำหน้าที่เป็น mitotic spindles ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในการแยกโครโมโซม ถ้าเกิดความผิดปกติของไมโครทิวบูลจะมีผลกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์เป็นอย่างมาก (18)

บนพื้นผิวไมโครทิวบูลจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งที่มาเชื่อมต่อ คือ microtubule-associated proteins (MAPs) ช่วยจับกับโมเลกุลของ tubulin เพื่อรักษาสมดุลของไมโครทิวบูล ดังรูปที่ 6 นอกจาก MAPs จะควบคุมการความเสถียรของไมโครทิวบูลแล้ว และยังคงควบคุมกระบวนการสร้างสายยาว ของ tubulin ได้เช่นกัน โดย C-terminal domain ของ MAPs จะจับกับ tubulin subunit ส่วน N-terminal domain จะจับกับ vesicles, intermediate filaments หรือ ไมโครทิวบูลโมเลกุลข้างเคียง ซึ่งการทำงานของ MAPs จะอาศัยการทำงานของ microtubule-affinity-regulating-kinase (MARK) ซึ่งจะการเติมหมู่ฟอสเฟตบน MAPs เหนี่ยวนำทำให้ MAPs จับกับไมโครทิวบูล ทำให้โครงสร้างของไมโครทิวบูลเกิดความเสถียร (17)



รูปที่ 7 แสดงโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับไมโครทิวบูล (20)

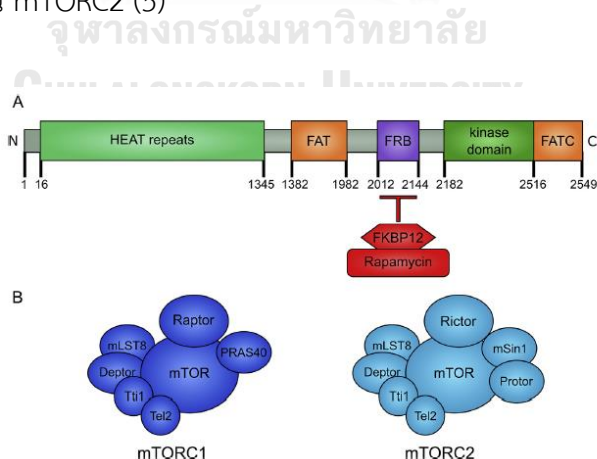
MAPs ถูกค้นพบครั้งแรกในเนื้อเยื่อสมอง สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามน้ำหนักโมเลกุล กลุ่มแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 55-62 kDa มีชื่อเรียกว่า τ (tau) proteins ในการศึกษา *in vitro* พบว่า tau จะจับกับไมโครทิวบูลเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว (nucleation) และป้องกันการสลาย มีความสำคัญในการรักษาสมดุลของไมโครทิวบูล และถูกพบมากที่บริเวณปลาย axon ของเซลล์ประสาท กลุ่มที่สองมีน้ำหนัก 200-1000 kDa ประกอบไปด้วย MAP-1, MAP-2, MAP-3 และ MAP-4 ในส่วนของ MAP-1 ประกอบไปด้วยโปรตีน A, B และ C ซึ่งโปรตีน C จะควบคุม cytoplasmic dynein ส่วน MAP-2 พบได้มากใน cell body และ dendrites ส่วน MAP-4 ถูกพบมากในเซลล์ร่างกาย ต่อมาในปัจจุบันมีการแบ่ง MAPs ออกเป็น 2 ประเภทตาม conserved domain คือ Type I MAP1 family ประกอบไปด้วย MAP1a และ MAP1b โดยที่ C-terminal จะมี microtubule-binding domain เป็นบริเวณที่จับกับไมโครทิวบูล ส่วน N-terminal จะจับกับ cytoskeleton หรือเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ซึ่งพบ MAP-1 family ได้ทั้งใน axons และ dendrites ของเซลล์ประสาท ส่วน Type II ประกอบด้วย MAP2, MAP4 และ MAPT (tau) ซึ่งมี microtubule-binding domain ที่ C-terminal เช่นกัน ส่วน N-terminal จะเป็น projection domain ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่จับกับโปรตีน (21)

MAP-2 ถูกพบมากใน dendrites ส่วน tau จะถูกพบมากใน axon ของเซลล์ประสาท ทำหน้าที่รักษาสมดุลของไมโครทิวบูล โดยที่ MAP-2 จะจับกับไมโครทิวบูล เพื่อให้เกิดการสมดุล ส่วน tau มีหน้าที่คล้ายกับ MAP-2 และยังช่วยในการรวมกลุ่มกันของไมโครทิวบูลในเซลล์ประสาทอีกด้วย เมื่อระดับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau สูงขึ้น จะเรียกโมเลกุลนี้ว่า hyperphosphorylated tau ทำให้เกิดการเสียสมดุลของไมโครทิวบูล ส่งผลทำให้ tau หลุดออกจากไมโครทิวบูล และตกตะกอนภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (4)

2.3 mTOR pathway

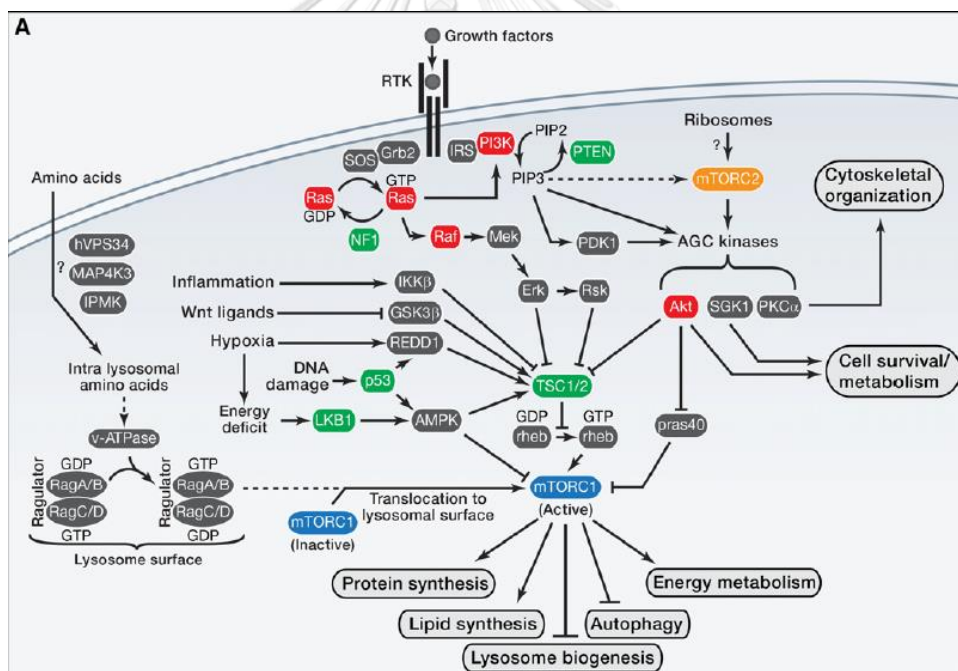
Mechanistic target of rapamycin (mTOR) เป็น serine/threonine protein kinase ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ (multiprotein complex) ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ mTOR complex 1 (mTORC1) และ mTOR complex 2 (mTORC2) ตามลำดับ ทั้งคู่มีโปรตีนหลัก ๆ คือ mTOR, mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8), DEP domain-containing mTOR interacting protein (DEPTOR), Tel two-interacting protein 1 (Tti1) และ telomere maintenance 2 (Tel2) โปรตีนดังกล่าวมีหน้าที่แตกต่างกันออกไป เช่น mLST8 หน้าที่ยังไม่ชัดเจน แต่อาจเกี่ยวข้องกับการแยก kinase domain ออกจากกัน เมื่อขาด mLST8 ใน mTORC2 พบว่าโปรตีนไม่สามารถทำงานได้ DEPTOR นั้นเป็น mTOR inhibitor ส่วน Tti1 และ Tel2 เป็น scaffold protein ที่ควบคุมการทำงานร่วมกันของกลุ่มโปรตีน (5)

mTORC1 นั้นจะมีโปรตีนเฉพาะ คือ regulatory associated protein of mTOR (RAPTOR) และ proline-rich AKT1 substrate 40 kDa (PRAS40) ซึ่ง RAPTOR ทำหน้าที่เป็น scaffold protein, lysosomal localization และ substrate binding เป็นต้น ส่วน PRAS40 ทำหน้าที่เป็น mTORC1 inhibitor ส่วนโปรตีนที่พบเฉพาะใน mTORC2 คือ rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR), mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSIN1) และ protein observed with RICTOR (PROTOR) โดยแต่ละชนิดจะมีหน้าที่แตกต่างกัน เช่น RICTOR เป็น scaffold protein และ substrate binding ส่วน mSIN1 เป็น scaffold protein และเกี่ยวข้องกับ glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) และสุดท้าย PROTOR เป็นตัวกระตุ้น SGK1 ผ่าน mTORC2 (5)



รูปที่ 8 แสดงองค์ประกอบของกลุ่มโปรตีน mTORC1 และ mTORC2 (6)

โปรตีน mTOR ประกอบไปด้วย 2549 กรดอะมิโน โครงสร้างของโปรตีน mTOR ได้ถูกค้นพบมากกว่า 20 ปีที่ผ่านมา จากการใช้เทคนิค cryo-electron microscopy เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของ mTOR พบว่ามี domain ที่สำคัญคือ HEAT ประกอบไปด้วย huntingtin, elongation factor 3, regulatory subunit A of PP2A, TOR1 domain และ FAT ประกอบไปด้วย FRAP, ATM, TTRAP domain และ FRB – FKBP12-rapamycin-binding domain และ FATC – C-terminal domain ลำดับสุดท้ายคือ FKBP12 – FK506-binding protein of 12 kDa ซึ่งเป็น immunophilins ชนิดหนึ่งที่สามารถจับกับ immunosuppressor ถูกประยุกต์ใช้ในผู้ป่วยที่มีการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เพื่อยับยั้ง autoimmune disorders โดยโปรตีนดังกล่าวสามารถจับกับ rapamycin กลายเป็น FKBP12-rapamycin complex มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ FRB domain ที่บริเวณเร่งของ mTORC1 ได้ เพราะฉะนั้น rapamycin จึงสามารถยับยั้งหรือลด kinase activity ของ mTORC1 แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ (6)

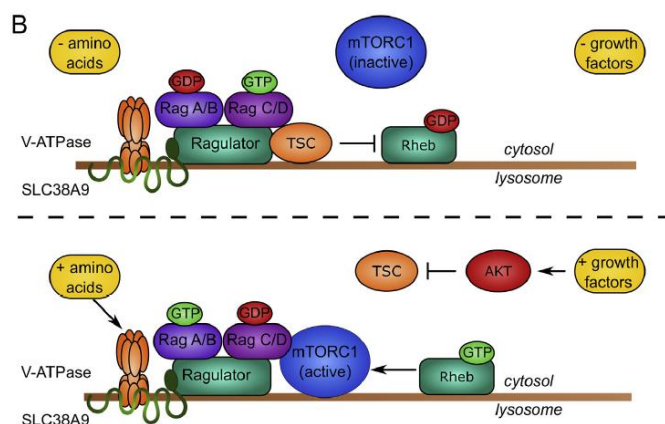


รูปที่ 9 แสดงกลไกการควบคุม mTOR complexes (5)

mTORC1 เป็นตัวกลางสำคัญที่ผลักดันให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์โปรตีนและไขมัน รวมไปถึงยับยั้งการสร้าง lysosome ยับยั้งการเกิด autophagy และยังควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของพลังงานภายในเซลล์ ส่วน mTORC2 นั้นเกี่ยวข้องกับการจัดการโครงสร้างค้ำจุนของเซลล์ โดยทั้ง mTORC1 และ mTORC2 เป็น downstream ของ phosphoinositide 3-kinase (PI3K) เมื่อ tyrosine receptor kinase (RTK) ที่อยู่บนผิวเซลล์

สามารถถูกกระตุ้นจาก hormones (เช่น insulin), growth factors (เช่น epidermal growth factor [EGF] และ insulin-like growth factor 1 [IGF1]), extracellular matrix และ cell adhesion molecules เป็นผลทำให้เกิดกระบวนการกระตุ้น downstream protein ผ่าน 2 กลไก กลไกแรกคือเปลี่ยน PI3K เป็น phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) และ phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) ตามลำดับ ซึ่ง PIP3 จะจับกับ PDK1 และกระตุ้น mTORC2 ให้มาเติมหมู่ฟอสเฟตบน AKT หรือ protein kinase B (PKB) ซึ่ง AKT สามารถยับยั้งการทำงานของ PRAS40 กับ tuberous sclerosis 1 (TSC1 หรือ hamartin) และ TSC2 (tuberin) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งหลักของ mTORC1 ได้ ส่วนกลไกที่สองผ่านการกระตุ้น Ras-GDP ให้เป็น Ras-GTP แล้วกระตุ้นการทำงานของ Raf, MEK และ ERK1/2 ซึ่งมายับยั้งการทำงานของ TSC2 ได้เช่นกัน ในทางตรงข้าม TSC2 สามารถถูกกระตุ้น โดย AMP-activated protein kinase (AMPK) หรือ glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ mTORC1 (5) ดังแสดงในรูปที่ 8

ในสถานะที่ขาด growth factors นั้น TSC จะถูกเหนี่ยวนำให้มาจับบน พื้นผิวของ lysosome แล้ว Rheb-GTP จะถูกเปลี่ยนเป็น Rheb-GDP ซึ่งเป็นภาวะ inactive ส่วนในสถานะที่มี growth factors ซึ่งจะจับกับ RTK แล้วกระตุ้นการทำงานของโปรตีน downstream รวมไปถึง AKT ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ TSC ได้ ทำให้ mTORC1 ถูกเหนี่ยวนำมาที่พื้นผิวของ lysosome แล้วถูกกระตุ้นผ่าน Rheb-GTP ได้ หรืออาจถูกกระตุ้นผ่านกรดอะมิโนที่กระตุ้นโปรตีนบนผิว lysosome เช่น V-ATPase หรือ SLC38A9 ที่มีผลกับ Rag-Regulator complex โดยตรงทำให้ mTORC1 ถูกกระตุ้นได้เช่นกัน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า mTORC2 ไม่ถูกกระตุ้นผ่านกรดอะมิโนได้ เนื่องจาก mTORC2 จะอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป็นหลัก ซึ่งกรดอะมิโนจะกระตุ้นโปรตีนที่พื้นผิว lysosome เท่านั้น (6) ในการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของ mTORC1 และ mTORC2 นิยมวัดการทำงานของ S6K1 หรือ 4E-BP1 กับ AKT ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนดังกล่าวเป็น downstream ของ mTOR complexes นอกจาก growth factors และกรดอะมิโนแล้ว phosphatidic acid (PA) ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ mTOR ได้เช่นกัน



รูปที่ 10 แสดงการควบคุม mTOR ผ่าน amino acid และ growth factor (6)

อาจกล่าวได้ว่าการยับยั้งตัวยับยั้งของ mTOR ทำให้เกิดกระบวนการหลัก ๆ ภายในเซลล์ได้ ดังนั้นถ้าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ mTOR เกิดความผิดปกติ อาจก่อให้เกิดโรคทางเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เช่น โรคอ้วน (obesity) โรคเบาหวาน (type 2 diabetes) ความผิดปกติทางระบบประสาท (neurodegeneration) และโรคมะเร็ง (cancer) เป็นต้น โดยเฉพาะโรคมะเร็งที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ receptor tyrosine kinase (RTK) ทำให้เกิด overexpression ส่งผลต่อ downstream pathway คือ AKT/PI3K/mTOR ที่ถูกกระตุ้นตลอดเวลา หรือเกิด mutations ที่ RTK, PI3K, PTEN และ LKB1 จะทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน AKT มากขึ้น ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งและเพิ่มจำนวนมากผิดปกติจนกลายเป็นมะเร็งในที่สุด ในทางตรงกันข้ามถ้า mTOR ทำงานน้อยกว่าปกติก็ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายมากขึ้นเช่นกัน ดังนั้นการควบคุมการทำงานของ mTOR จึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งเซลล์ในร่างกายมีการควบคุม mTOR ในภาวะที่ mTORC1 ถูกกระตุ้นมากจนเกินไปก็สามารถยับยั้งแบบ negative feedback ไปยัง mTORC2 ได้ผ่านการการเติมหมู่ฟอสเฟตของ IRS1 เนื่องจาก mTORC1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของเซลล์ ในภาวะนั้นเซลล์จึงไม่จำเป็นที่จะเคลื่อนที่ mTORC2 จึงถูกยับยั้ง ซึ่งจะเห็นได้ว่า mTORC1 ถูกกระตุ้นได้หลายทิศทางจากโปรตีนหลายชนิด (5)

ในอดีตที่ผ่านมาสารหรือยาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง mTORC1 นั้นคือ rapamycin ซึ่งเป็น allosteric inhibitor เมื่อ rapamycin ถูกกระตุ้นโดยจับกับ FK506-binding protein of 12 kDa (FKBP12) และรวมกันเป็น rapamycin-FKBP12 complex เมื่อโมเลกุลดังกล่าวจับกับ FKBP12-rapamycin binding domain (FRB) ของ mTOR subunit จะเกิดการยับยั้ง mTORC1 เพราะ rapamycin ไปลดความเสถียรของ mTOR-RAPTOR complex ทำให้ mTORC1 มีรูปร่างที่เปลี่ยนไปส่งผลต่อการทำงานของ kinase activity ดังรูปที่ 7 แต่ rapamycin ไม่สามารถยับยั้ง mTORC2 ยกเว้นในสภาวะที่มี rapamycin ความเข้มข้นสูงหรือได้รับ rapamycin เป็นเวลานานก็สามารถลดการทำงานของ mTORC2 ได้เช่นกัน เนื่องจากการลดระดับการแสดงออกของโปรตีน mTOR แต่ rapamycin นั้นมี

ผลข้างเคียงที่รุนแรง ในปัจจุบันนักวิจัยได้มีการคิดค้นสารยับยั้ง mTOR ชนิดใหม่ขึ้นมา มีการรายงาน ว่า AZD8055 ซึ่งเป็น ATP-competitive inhibitors ของ mTOR มีฤทธิ์เป็น antitumor activity ที่ อยู่ใน phase I clinical มีความสามารถในการลด mTOR kinase activity ซึ่งเป็น small-molecule inhibitors ลดการทำงานจากการแย่งจับฟอสเฟตที่จะมากระตุ้น mTOR อย่างจำเพาะ ดังนั้น AZD8055 จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง mTORC1 และ mTORC2 (7)

แม้ว่าในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ที่ชัดเจน แต่มีงานวิจัยหลายงานได้ พิสูจน์แล้วว่า mTOR pathway กับกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau มีความสัมพันธ์กัน โดย พบว่า A β oligomer (A β O) สามารถกระตุ้น PI3K/AKT pathway ได้ ซึ่งเป็นกลไกที่ควบคุมการทำงาน ของ mTOR โดยในการทดลองให้ neuronal cells ได้รับ A β O ที่ความเข้มข้นสูง พบว่า การทำงานของ mTOR ลดลงและทำให้เซลล์ตาย เนื่องจากความเป็นพิษกับเซลล์ แต่เมื่อเซลล์ได้รับ A β O ที่ความเข้มข้นต่ำ พบว่า การทำงานของ mTOR (Ser2448) และ AKT (Ser243) สูงขึ้น นอกจากนี้ S6K ซึ่งเป็น downstream ของ mTORC1 ก็มีการทำงานสูงขึ้น หลังจาก A β ₄₂ treatment สอดคล้องกับการทดลองในหนูโดยการ ฉีด A β O สังเคราะห์ พบว่า การทำงานของ mTOR สูงขึ้น เช่นกัน แต่เมื่อหนูทดลองได้รับ rapamycin สามารถลดการสะสมของ A β ₄₂ ได้ (22)

มีการรายงานว่าในผู้สูงอายุจะมีการทำงานของ mTOR สูงขึ้น เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์เกิด กระบวนการตายแบบ autophagy และการสร้าง lysosome ลดลง ทำให้การควบคุมการทำลาย โปรตีนนั้นลดลงเช่นกัน จึงอาจเป็นสาเหตุที่สำคัญอีกประการที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ เพราะเมื่อเกิด กระบวนการ autophagy ลดลง ส่งผลให้เกิดการสะสมของ autophagy vesicle มากเกินไป โดยเฉพาะ A β และ tau ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ การเกิด autophagy จึงอาจช่วยลดปริมาณของ A β และ tau และอาจช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกได้ ดังนั้นการยับยั้ง mTOR ซึ่งควบคุมการตายแบบ autophagy อาจสามารถช่วยลดการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในระยะ แรกเริ่มได้ โดยทำให้เพิ่มกระบวนการ autophagy และลดการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติ ของ tau (8)

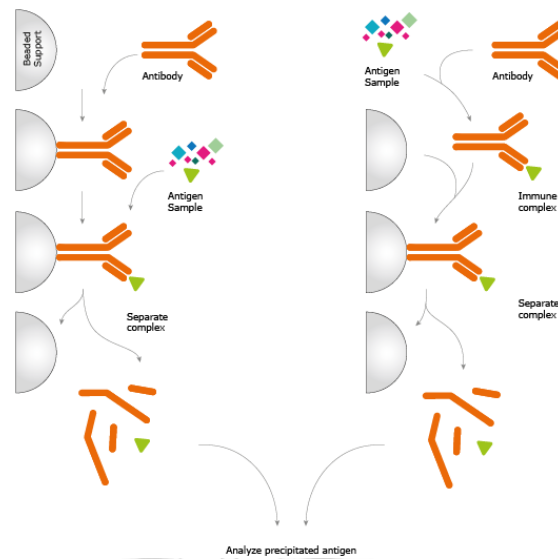
ในทางกลับกันมีการรายงานทางคลินิกว่าผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีระดับการทำงานของ mTORC1 ต่ำ ทำให้เซลล์ประสาทตายมากกว่าปกติ ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองข้างต้นที่ได้ทำการ ทดลองในหนูทดลองแล้วสรุปว่า A β สามารถกระตุ้นการทำงานของ mTORC1 ได้ อย่างไรก็ตามมี งานวิจัยที่กล่าวว่า mTORC1 พบได้ 2 ตำแหน่งภายในเซลล์คือ mTORC1 ที่อยู่บน lysosome และ mTORC1 ที่ interact กับโปรตีนอื่นใกล้เคียงหุ้มเซลล์ อาจสรุปได้ว่าในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ที่มีการ ทำงานของ mTORC1 ต่ำนั้นเป็น mTORC1 ที่อยู่บนไลโซโซม แต่ในส่วนของ mTORC1 ใกล้เคียงหุ้ม

เซลล์ อาจทำงานมากกว่าปกติไปมีผลต่อการการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau (23) ส่วน mTORC2 นั้นยังคงไม่มีหลักฐานงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

นอกจากนี้มีการรายงานว่า AKT สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser212/Thr214 ซึ่งตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งจำเพาะในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ จากการทดลอง *in vitro* kinase study ตำแหน่ง Thr212/Ser 214 บน tau protein ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ละ 1 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งจำเพาะในการเกิดโรคอัลไซเมอร์ และที่สำคัญ AKT ไม่ได้เติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งใด ๆ ของโปรตีน tau เลย เช่น Tau-1, AT8, AT180, 12E8 และ PHF-1 ซึ่งก็เป็นตำแหน่งต่าง ๆ เหล่านี้เป็นตำแหน่งที่จำเพาะในการเกิดโรคอัลไซเมอร์เช่นกัน (24) สอดคล้องกับกลไกการทำงาน mTORC1 ที่ต้องกระตุ้นผ่าน AKT ซึ่งเป็น downstream ของ mTORC2 ดังแสดงข้างต้น เพราะฉะนั้น mTORC2/AKT/mTORC1 จึงอาจเป็นกลไกที่เชื่อมโยงทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau protein จากรายงานผลการทดลองที่ใช้เทคนิค mass spectrometry ของ Zhi Tang และคณะ (2013) พบว่านอกจากตำแหน่ง Ser212/Thr214 ยังมี Thr-231, and Ser-356 บนโปรตีน tau ซึ่งเป็นตำแหน่ง flanking และ repeat regions บน tau ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับไมโครทิวบูลโดยตรง ที่อาจมีความสัมพันธ์กับ mTOR complexes ผ่านการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau แล้วมีผลทำให้ยับยั้งการจับกับไมโครทิวบูล ทำให้กลายเป็น tau ที่พิกซ์กับเซลล์ แต่ผู้วิจัยไม่ได้มุ่งเน้นว่าเป็น mTOR complexes ไต (9) จากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดอาจสรุปได้ว่า mTORC2 อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ก็เป็นไปได้

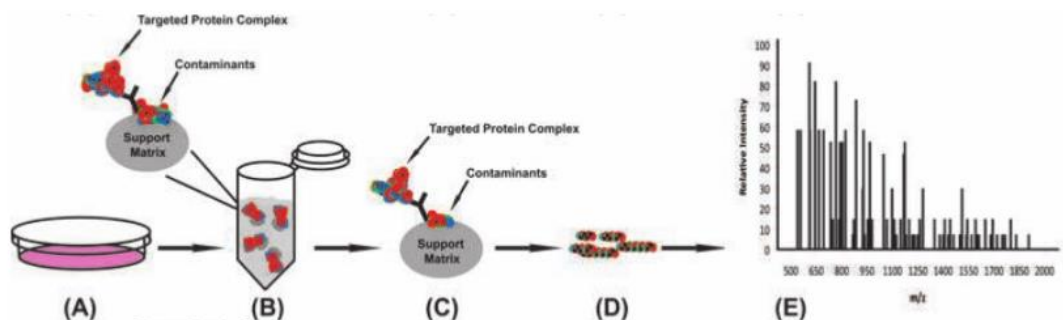
2.4 เทคนิค affinity purification mass spectrometry

Affinity purification เป็นเทคนิคที่ใช้สารประกอบทางชีวภาพ เช่น antibodies ที่ตรึงอยู่กับ solid support (ส่วนมากเป็น agarose หรือ magnetic beads) เพื่อจับกับโมเลกุลเป้าหมาย เรียกเทคนิคนี้ว่า immunoprecipitation (IP) หรือ chromatin immunoprecipitation (ChIP) ขึ้นอยู่กับว่าโมเลกุลเป้าหมายเป็นสารประเภทอะไร ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้ง DNA, RNA (ส่วนมากเป็น oligonucleotides), lipids, peptides หรือ proteins จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค mass spectrometry โดยปกติแล้วตัวอย่างโปรตีนจะต้องถูกแยกด้วย SDS-PAGE แล้วย่อยโปรตีนให้เป็น peptide สายสั้น ๆ และในบางครั้งอาจต้องทำ fractionation เพื่อลดความซับซ้อนของโปรตีน (25)



รูปที่ 11 แสดงวิธี direct (ซ้าย) และ indirect immunoprecipitation (ขวา) (26)

เทคนิค immunoprecipitation (IP) นั้นสามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี คือ direct และ indirect method ส่วนความแตกต่างนั้นจะขึ้นอยู่กับลำดับการทดลองในแต่ละวิธี เช่นวิธี direct method จะเริ่มจากการตรึง antibody ลงบน support matrix ก่อนที่จะจับโปรตีนเป้าหมาย ส่วน indirect method จะเริ่มจากการจับกันระหว่างโปรตีนเป้าหมายกับ antibody ก่อน หลังจากนั้น antibody จะถูกตรึงด้วย support matrix โปรตีนจากทั้งสองวิธีจะถูกชะให้แยกออกจากกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) ต่อไป นอกจากนี้ยังมีอีกหนึ่งเทคนิคที่คล้ายกับ IP นั่นคือ CO-IP ซึ่งเป็นการจับกับโมเลกุลเป้าหมายในทางอ้อม ซึ่งจะทำให้ทราบถึงโปรตีนที่จับกันเป็น complex กับโปรตีนเป้าหมายที่ทำการ IP ลงมา (26)

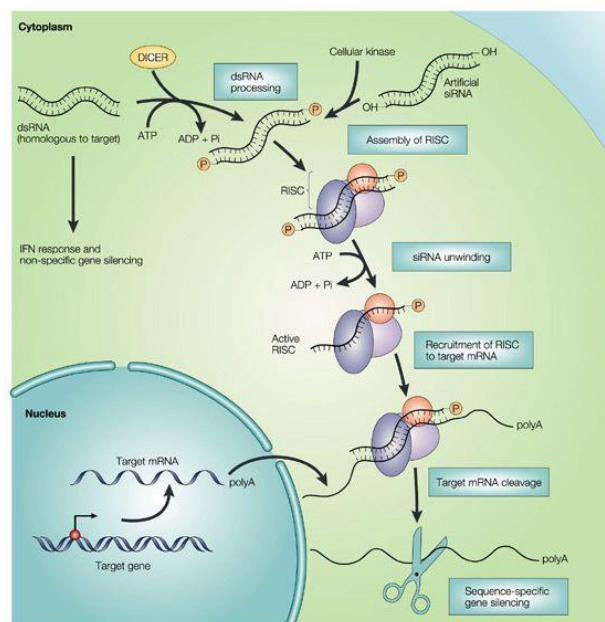


รูปที่ 12 แสดง workflow การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry (25)

จากรูปที่ 12 (A) เซลล์เพาะเลี้ยงหรือเนื้อเยื่อ ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่สนใจ จากนั้นทำให้ตัวอย่างกลายเป็นเนื้อเดียวกัน (B) ทำบริสุทธิ์ด้วย antibody ที่ตรึงอยู่บน support matrix (C) แล้วทำการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่เป้าหมาย รวมทั้งสิ่งเจือปนทั้งหมด (D) ทำการย่อยโปรตีนด้วย protease (E) หลังจากที่ได้ peptide มาแล้วทำการแยกด้วยกระบวนการต่าง ๆ ดังที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้า แล้วนำมาวิเคราะห์และค้นหาโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry (25)

2.5 เทคนิค RNA interference (RNAi)

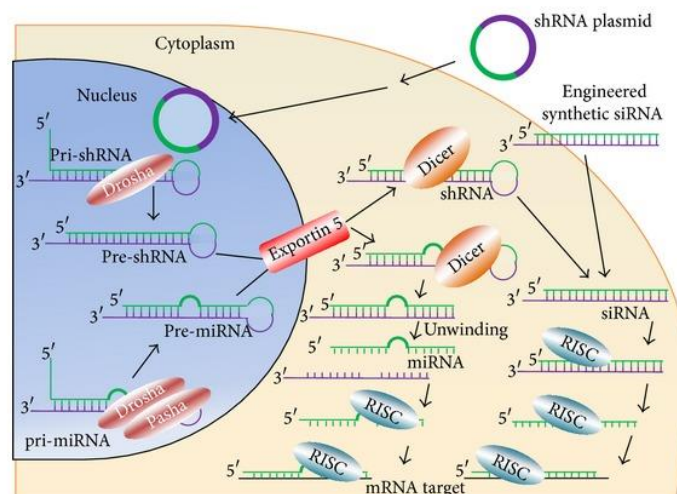
RNA interference เป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนประเภทหนึ่ง โดยอาศัย double strand RNA (dsRNA) ที่ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ทำให้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) โดยปกติแล้วเมื่อสารพันธุกรรม หรือ DNA ถูก transcription กลายเป็น mRNA แล้วจะถูก translation เพื่อแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ในทุก ๆ กระบวนดังกล่าวแล้วแต่ถูกควบคุมเอาไว้ เพราะปริมาณโปรตีนที่ถูกแปลรหัสออกมา นั้น มีความสำคัญกับการทำงานของเซลล์ในสถานะที่แตกต่างกัน ดังนั้น การควบคุมการแสดงออกของยีน จึงจำเป็นต่อการดำรงชีวิตเพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ในสถานะต่าง ๆ ในกระบวนการที่กล่าวมานั้น มีขั้นตอนที่ละเอียดซับซ้อนมากซึ่งจะอธิบายต่อไป



รูปที่ 13 แสดงกระบวนการ RNA interference

จากรูปที่ 13 dsRNA-specific endonuclease ที่จับกับ Dicer จับกันเป็น complex ที่สามารถจับและตัด dsRNA ให้เป็นสายสั้น ๆ มีความยาว 20-24 bp เรียกว่า small interference RNA (siRNA) ต่อมา Argonaute 2 จะเข้ามาจับ siRNA แล้วเกิดเป็น ribonucleoprotein complex (RNP) และทำให้โปรตีนชนิดอื่นเข้ามารวมกันเพื่อสร้างเป็น RNAi-silencing complex (RISC) จากนั้น RISC จะทำการแยก siRNA สายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว โดยสายเดี่ยวที่เป็น siRNA จะเรียกว่า antisense ซึ่งมีเบสคู่สมกับ mRNA เป้าหมาย เรียกสายนี้ว่า sense จากนั้น mRNA จะถูกย่อยโดย slicer ใน RISC complex หลังจากนั้น mRNA ที่ถูกย่อยจะถูกทำลาย เป็นผลให้ไม่มี mRNA ผ่านเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนจากยีนนั้น การทำงานของ RNAi จึงเป็น posttranscriptional regulation of gene expression หรือ posttranscriptional gene silencing (27)

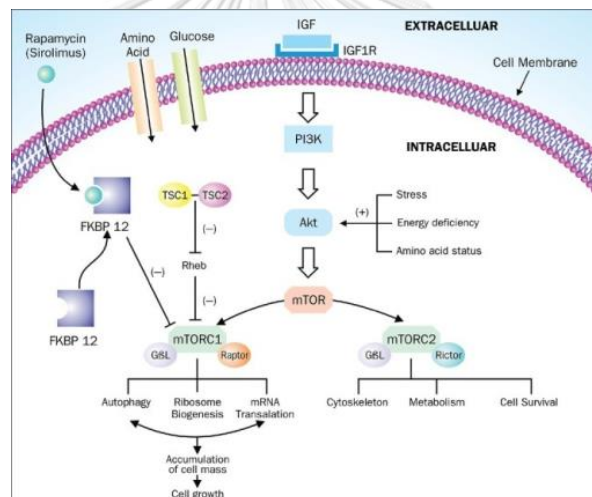
เทคนิค RNAi ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีนผ่านกระบวนการ post-transcription ทำให้ยีนเป้าหมายเกิด gene knockdown (KD) จึงไม่มีผลใด ๆ กับโครงสร้างของยีน ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ synthetic siRNA มาใช้ในการทดลอง ซึ่งมีกระบวนการแตกต่างจาก endogenous siRNA หรือ miRNA คือ ไม่ผ่านกระบวนการที่ทำให้ dsRNA กลายเป็นเป็นท่อนเล็ก ๆ ด้วย Dicer แต่หลังจากกระบวนการดังกล่าวแล้ว synthetic siRNA จะทำงานเหมือนกับ endogenous siRNA ทุกประการ ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบการทำงานของ siRNA (27)

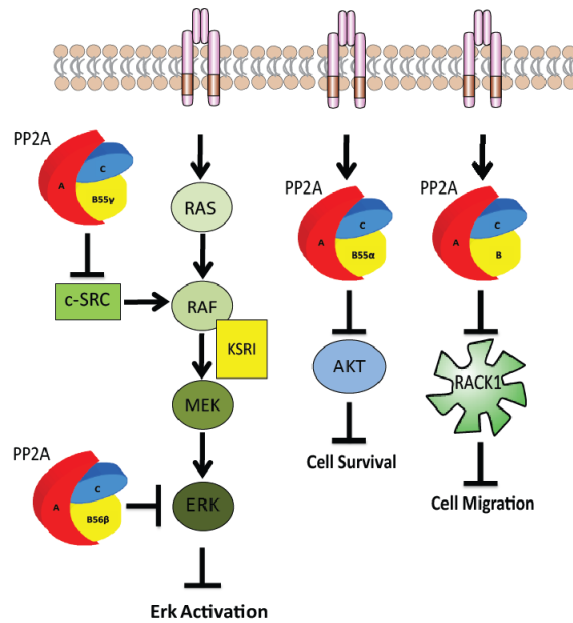
2.6 mTOR inhibitor และ protein phosphatase inhibitor

Rapamycin เป็นสารยับยั้งภูมิคุ้มกัน ซึ่งใช้ในการผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ และยังเป็นสารยับยั้งมะเร็ง ที่ผ่านการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) ที่อยู่ใน clinical phase I ในงานวิจัยต่าง ๆ rapamycin ซึ่งถูกใช้เป็น selective inhibitor ของโปรตีน mTOR และใช้ศึกษาการทำงานของโปรตีน mTOR ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ rapamycin จะจับกับ FKBP-12 แล้วไปแยกหรือลดการจับกันระหว่างโปรตีน mTOR กับ RAPTOR รวมถึงโปรตีนอื่น ๆ ทำให้ mTORC1 ไม่สามารถทำงานได้ แต่ rapamycin ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 15 ในทางตรงข้ามถ้าใช้ rapamycin ที่ความเข้มข้นสูง ๆ หรือเซลล์ได้รับสารเป็นเวลานาน ก็สามารถยับยั้ง mTORC2 ได้เช่นกัน ในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานว่าเหตุใดที่สภาวะดังกล่าวสามารถ ยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ (28)



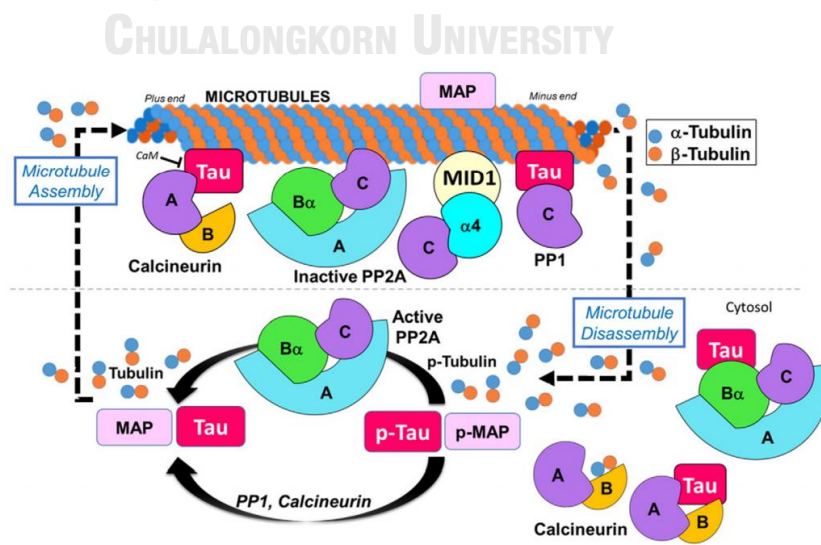
รูปที่ 15 แสดงกลไกการทำงานของ rapamycin (29)

Okadaic acid (OA) เป็น holoenzyme สามารถยับยั้งการทำงานของ protein phosphatase ซึ่งจำเพาะกับ protein phosphatase 2A (PP2A) โดยหน้าที่ของ OA คือ แยก subunit ของ PP2A ออกจากกัน โดย PP2A มี subunit หลัก ๆ ทั้งหมด 3 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 16 PP2A นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนหลายชนิดที่เป็น oncoprotein เช่น โปรตีนใน MAPK pathway, AKT และ RACK1 ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ และการเอาชีวิตรอดของเซลล์ PP2A นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของ AKT ผ่านการดึงหมู่ฟอสเฟตออก (dephosphorylation) ที่ตำแหน่ง Ser 9 บน GSK3 β



รูปที่ 16 แสดงการทำงานของ PP2A (30)

มีหลักฐานที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ protein protease ชนิดต่าง ๆ เช่น PP1 calcineurin และ PP2A กับ tau ว่า สามารถจับกับไมโครทิวบูลสายยาวได้โดยเฉพาะ PP2A ที่มี subunit c เป็น catalytic subunit สามารถจับกับไมโครทิวบูล ทำให้เกิดความสมดุลในสายของไมโครทิวบูลเป็นผลทำให้โมเลกุลของ PP2A หยุดการทำงาน และยังพบอีกว่า PP2A ไม่สามารถจับกับ heterodimer ของ tubulin ได้ ในทางเดียวกันถ้า PP2A เกิดการทำงานจะก่อให้เกิดการดึงหมู่ฟอสเฟตบน MAP หรือ tau ออกได้เช่นกัน ดังนั้น PP2A จึงมีผลต่อการทำงานโปรตีนหลายชนิดที่มีส่วนช่วยป้องกันการเติมหมู่ฟอสเฟตที่มากผิดปกติบน tau ได้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (31)



รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของ tau กับ PP2A (31)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.1.1 Auto pipette (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.2 Autoclave (Hydroclave, USA)
- 3.1.3 Cell culture incubator (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.4 Class II biological cabinet (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.5 Confocal microscopy (ZEISS, Germany)
- 3.1.6 Electrophoresis Chambers set (BIO-RAD, USA)
- 3.1.7 Forceps (Merck, USA)
- 3.1.8 Freezer -20 °C (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.9 Freezer -80 °C (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.10 Heat box (Eppendorf, USA)
- 3.1.11 Imaging systems (LI-COR, USA)
- 3.1.12 Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.13 Microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.14 Multi-channel Pipette (RAININ, USA)
- 3.1.15 Phase contrast microscope (ZEISS, Germany)
- 3.1.16 Refrigerator (TOSHIBA, Japan)
- 3.1.17 Refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- 3.1.18 Refrigerated microcentrifuge (Eppendorf, USA)
- 3.1.19 Single Channel Pipettes (RAININ, USA)
- 3.1.20 Type II Water Purification System (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.1.21 Vortex mixer (Scientific Industries)
- 3.1.22 Water bath (Lab Companion, Korea)
- 3.1.23 Weighing (METTLER TOLEDO, USA)
- 3.1.24 Vacuum centrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.2.1 1.5 ml LoBind tubes (Eppendorf, USA)
- 3.2.2 100 และ 150 mm² cell culture dishes (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.3 6-well plates (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.4 8-well Chamber slides (Merck, USA)
- 3.2.5 Beakers: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml (Pyrex, USA)
- 3.2.6 Centrifuge tubes: 10 ml, 50 ml (Falcon, USA)
- 3.2.7 Coverslides (Menzel Gläser, Germany)
- 3.2.8 Cryo freezing boxes (Lio Lab, Thailand)
- 3.2.9 Cryo tubes (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.10 Cylinders 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)
- 3.2.11 Digital timer (Eppendorf, USA)
- 3.2.12 Disposable gloves (Sri Trung glove, Thailand)
- 3.2.13 Hemacytometer (BOECO, Germany)
- 3.2.14 Kimwipe paper (Kimberley-Clark, USA)
- 3.2.15 LoBind Tubes (Eppendorf, USA)
- 3.2.16 Magnetic bar (BIO-RAD, USA)
- 3.2.17 Microtubes: 0.6 ml, 1.5 ml, 5 ml (Axygen, USA)
- 3.2.18 Nitrocellulose membrane (BIO-RAD, USA)
- 3.2.19 Scraper (SPL LIFE SCIENCES, Korea)
- 3.2.20 Serological pipettes: 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.21 Test tube rack

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.3.1 สารเคมีทั่วไป
 - 3.3.1.1 Acetonitrile (Honeywell)
 - 3.3.1.2 Ammonium persulfate (APS)
 - 3.3.1.3 Anti-fade solution (Invitrogen, USA)
 - 3.3.1.4 Blocking buffer (LI-COR, USA)

- 3.3.1.5 Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.6 Bradford reagent (BIO-RAD, USA)
- 3.3.1.7 Bromophenol blue (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.8 CHAPS (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.9 Coomassie Brilliant Blue (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.3.1.10 DAPI (Invitrogen, USA)
- 3.3.1.11 Dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare, USA)
- 3.3.1.12 DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.13 EDTA (Affymetrix, USA)
- 3.3.1.14 EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, USA)
- 3.3.1.15 Ethanol (Merck, USA)
- 3.3.1.16 Formic acid (FA) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.17 Glycerol (OmniPur, USA)
- 3.3.1.18 Glycine (OmniPur, USA)
- 3.3.1.19 Hepes (Merck, USA)
- 3.3.1.20 Iodoacetamide (GE Healthcare, USA)
- 3.3.1.21 Methanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.22 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 3.3.1.23 Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.24 Polyacrylamide (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.3.1.25 Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.26 Protein A and protein G magnetic beads (BIO-RAD, USA)
- 3.3.1.27 Pyrophosphate
- 3.3.1.28 Sodium chloride (Merck, USA)
- 3.3.1.29 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Affymetrix, USA)
- 3.3.1.30 Sodium fluoride
- 3.3.1.31 Sodium orthovanadate
- 3.3.1.32 Triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.1.33 Trifluoroacetic acid (TFA) (Merck, USA)
- 3.3.1.34 Tris (Affymetrix, USA)
- 3.3.1.35 Tris-buffered saline (TBS) (Affymetrix, USA)

- 3.3.1.36 Tris-HCl (Affymetrix, USA)
- 3.3.1.37 Triton-X-100 (Affymetrix, USA)
- 3.3.1.38 Trypsin: molecular grade (Promega)
- 3.3.1.39 Tween 20 (Affymetrix, USA)
- 3.3.1.40 β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์
 - 3.3.2.1 Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.3.2.2 Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.3.2.3 Ham's F12 Nutrient Mixture (Hyclone, USA)
 - 3.3.2.4 Minimum Essential Medium (MEM) (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.3.2.5 Non-Essential Amino Acids (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.3.2.6 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Hyclone, USA)
 - 3.3.2.7 Sodium pyruvate (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.3.2.8 Trypsin (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.3.3 แอนติบอดี
 - 3.3.3.1 Alexa Fluor 488, anti rabbit IgG (Life Technologies, USA)
 - 3.3.3.2 Anti-Alexa Fluor 568, anti-mouse IgG (Life Technologies, USA)
 - 3.3.3.3 RDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG (LI-COR, USA)
 - 3.3.3.4 IRDye 800RD Goat anti-Mouse IgG (LI-COR, USA)
 - 3.3.3.5 AKT (pan) antibody (Cell Signaling Technology, USA)
 - 3.3.3.6 pAKT (Ser473) antibody (Cell Signaling Technology, USA)
 - 3.3.3.7 GAPDH antibody (Abcam, England)
 - 3.3.3.8 RICTOR antibody (Abcam, England)
 - 3.3.3.9 S6 antibody (Cell Signaling Technology, USA)
 - 3.3.3.10 pS6 antibody (Ser235/236) (Cell Signaling Technology, USA)
 - 3.3.3.11 pTau antibody (Ser214) (Abcam, England)
 - 3.3.3.12 TAU-5 antibody (Abcam, England)

- 3.1.1 mTOR inhibitor และ protein phosphatase inhibitor
 - 3.1.1.1 AZD8055 (STEMCELL Technologies, Canada)
 - 3.1.1.2 Okadaic acid (OA) (Abcam, England)
 - 3.1.1.3 rapamycin (STEMCELL Technologies, Canada)
- 3.1.2 สารเคมีสำหรับลดการแสดงออกของยีน *RICTOR*
 - 3.1.2.1 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.1.2.2 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - 3.1.2.3 RICTOR siRNA (Dharmacon™)
 - 3.1.2.4 scramble siRNA (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.4 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

- 3.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ และการ treatment เซลล์ด้วย mTOR และ protein phosphatase inhibitor
 - 3.4.1.1 เลี้ยงเซลล์ SHSY-5Y (ATCC® CRL 2266™) ซึ่งเป็น neuroblastoma ใน complete media ที่มี MEM: F12 (1:1) ที่มี 1% (v/v) Non-Essential Amino Acids 0.1% (vol/vol) Sodium pyruvate และ supplement ด้วย 10% (vol/vol) FBS และ 1% (vol/vol) Antibiotic-Antimycotic ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C และมี CO₂ 5%
 - 3.4.1.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่น 80-90% จากนั้นทำการ trypsinization แล้วหยุดการทำงานของ trypsin ด้วย complete media
 - 3.4.1.3 นำเซลล์เพาะเลี้ยงลงใน 6-well plate ให้มีปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน
 - 3.4.1.4 เพาะเลี้ยงให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 60-70% แล้วทำการลดซีรัมด้วย serum-free medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 3.4.1.5 จากนั้นเปลี่ยนอาหารที่มี rapamycin, AZD8055, OA หรือ OA+rapamycin, OA+AZD8055 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเทียบกับอาหารปกติ ซึ่งเป็นสภาวะ control

3.4.2 การลดการแสดงออกของยีน *RICTOR* ด้วย RICTOR siRNA

- 3.4.2.1 เลี้ยงเซลล์ตามขั้นตอน 3.2.1.1-3.2.1.2
- 3.4.2.2 นำเซลล์เพาะเลี้ยงปริมาณ 400,000 cells/well ลงใน 6-well plate บ่มเลี้ยง 24 ชั่วโมง
- 3.4.2.3 ล้างเซลล์ด้วย PBS แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น Opti-MEM™ ปริมาตร 1.8 ml/well
- 3.4.2.4 ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ใน microtube 2 หลอด หลอดแรก คือ Lipofectamine™ 3000 ปริมาตร 8 μ l กับ Opti-MEM™ 125 μ l ส่วนหลอดที่สอง siRNA 5 หรือ 10 μ g (โดยมี scrambled siRNA เป็นสภาวะควบคุม) กับ Opti-MEM™ 125 μ l
- 3.4.2.5 นำสารละลายใน microtube ทั้งสองหลอดผสมกับแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 3.4.2.6 นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมต่าง ๆ ใส่ใน well บ่มเป็นเวลา 3 วัน
- 3.4.2.7 เมื่อครบเวลาแล้ว ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน RICTOR ด้วย western blot analysis

3.4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค immunoprecipitation (IP)

- 3.4.3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่าง ๆ ในขั้นตอนที่ 3.2.1.1-3.2.1.2
- 3.4.3.2 นำเซลล์เพาะเลี้ยงลงใน 150 mm² cell culture dishes ให้มีปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน
- 3.4.3.3 เพาะเลี้ยงให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 60-70%
- 3.4.3.4 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วย 1X PIC (protease inhibitor cocktail) ที่ละลายใน PBS แล้วเก็บ cell ใน -80 °C
- 3.4.3.5 ทำการเตรียม lysis buffer (40 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM pyrophosphate, 10 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM orthovanadate และ 0.3% CHAPS)
- 3.4.3.6 ปิเปต Protein A หรือ G magnetic beads ปริมาตร 40 μ l กับ RICTOR หรือ tau antibody 4 μ l แล้วใส่ lysis buffer ให้มีปริมาตรรวม 1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง บน rotating mixer

- 3.4.3.7 เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้าง antibody ที่ไม่จับ bead โดยใช้ magnetic bar ในการดูดแม่เหล็ก ดูดส่วนใสออก แล้วล้างด้วย lysis buffer 3 ครั้ง
- 3.4.3.8 ใส่ lysis buffer 1 ml ลงใน plate แล้วทำการขูดเซลล์ด้วย scraper ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วใส่ลงใน tube
- 3.4.3.9 ทำการปั่นตกตะกอนเพื่อให้ได้ lysate ที่ 16,000xg แล้วนำส่วนใสใส่ใน tube ที่มี Protein A/G กับ antibody บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4 °C
- 3.4.3.10 ทำการแยกโปรตีนที่ไม่จับกับ antibody โดยใช้ magnetic bar แล้วเก็บส่วนตะกอนไว้
- 3.4.3.11 ล้าง beads ด้วย lysis buffer 500 μ l (โดยใช้ lysis buffer ที่มี 150 mM NaCl 3 รอบ และ 300 mM NaCl 1 รอบ)
- 3.4.3.12 จากนั้นใช้ magnetic bar เพื่อนำเอา lysis buffer ออกแล้วใส่ 1x Laemmli buffer ที่มี 5% β -mercaptoethanol ปริมาตร 40 μ l
- 3.4.3.13 ให้ความร้อนประมาณ 95 °C 10 นาที เพื่อแยก antibody, ตัวอย่างโปรตีน และ beads ออกจากกัน
- 3.4.3.14 ทำการวิเคราะห์ด้วย western blot analysis เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของโปรตีนโดยการ probe α -TAU-5 หรือ α -RICTOR ลงบน membrane หรือทำ SDS-PAGE แล้วย้อม Coomassie Brilliant Blue เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย MS ในขั้นตอนต่อไป
- 3.4.4 การตรวจสอบลักษณะของโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry (In-gel trypsin digests และ LC-MS/MS)
- 3.4.4.1 หลังจากทำ SDS-PAGE แล้ว ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue แล้วตัด gel บริเวณขนาดโปรตีนที่สนใจ
- 3.4.4.2 นำชิ้นเจลที่ตัดแล้วมาล้างด้วย 100 mM ammonium bicarbonate กับ acetonitrile ความเข้มข้น 1:1
- 3.4.4.3 Destain ด้วย 100% acetonitrile แล้วนำมาละลายน้ำด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมความดัน (vacuum centrifugation)

- 3.4.4.4 นำโปรตีนมาลดพันธะ disulfide โดยการเติม 10 mM Dithiothreitol (DTT) แล้วบ่มที่ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใส่ 50 mM iodoacetamide ที่ 45 °C เป็นเวลา 45 min เพื่อให้เกิด alkylation
- 3.4.4.5 ล้างด้วย 100 mM ammonium bicarbonate กับ acetonitrile ความเข้มข้น 1:1 ดูดออก แล้วใส่ 100 mM ammonium bicarbonate ตั้งไว้ 10 นาที แล้วดูดออกเช่นกัน ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง
- 3.4.4.6 ย่อยโปรตีนด้วย trypsin โดยให้ความเข้มข้นของ trypsin ไม่เกิน 300 ng ต่อ เจล 1 tube แล้วบ่มที่ 37°C ซ้ำคืน
- 3.4.4.7 สกัด peptide ที่ได้ออกจากเจล โดยเติม 50 % acetonitrile กับ 1 % Trifluoroacetic acid (TFA) (1: 1) แล้วดูด peptide ใส่ LoBind tube ทำเช่นนี้อีก 2 รอบ
- 3.4.4.8 Peptide ที่ผ่านการสกัดแล้ว นำมาเติม 0.1 % formic acid 30 µl จากนั้นทำการ desalting ด้วย C18 column
- 3.4.4.9 นำตัวอย่าง peptide ตัวอย่างเข้าเครื่อง LC-MS/MS
- 3.4.4.10 วิเคราะห์ผลการทดลองจากเครื่อง LC-MS/MS ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) บนโปรตีน tau
- 3.4.5 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค western blot analysis
- 3.4.5.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง
- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1X PIC (ใน PBS)
 - ใส่ lysis buffer ประมาณ 70 µl ใน plate แล้วขูดเซลล์ออกมาใส่ใน microtube
 - บั่นเหวี่ยงที่ 16,000×g เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมาใส่ microtube อันใหม่
 - ทำการวัดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่างด้วย Bradford reagent โดยใส่โปรตีนตัวอย่าง 1 µl กับ Type I H₂O 9 µl ลงใน 96-well plate
 - จากนั้นใส่ Bradford reagent 200 µl /well
 - บ่ม 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₅₉₅ ด้วยเครื่อง microplate reader เทียบค่าความเข้มข้นโดยใช้ 1 mg/ml BSA เป็นสารมาตรฐาน

- ทำการปรับความเข้มข้นสารละลายโปรตีนให้ได้ 25 µg protein ด้วย Type I H₂O ให้ได้ปริมาตรรวม 20 µl
- ใส่ 5x Laemmli ปริมาตร 5 µl ใน microtube แล้วให้ความร้อนที่ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง heat box
- นำมาปั่น pull down ทันทีเมื่อครบเวลา แล้วรอให้เย็น

3.4.5.2 การเตรียม Tris-glycine SDS-PAGE

- เตรียมสารละลายดังตาราง

	Stacking (ml)		Separating (ml)
Gel (%)	4	Gel (%)	10
40% Polyarylamide	0.625	40% Polyarylamide	2.5
1M Tris pH6.8	0.625	1.5M Tris pH8.8	2.5
10% APS	0.05	10% APS	0.1
10% SDS	0.05	10% SDS	0.1
TEMED	0.005	TEMED	0.004
H ₂ O	3.65	H ₂ O	4.796
Total volume	5	Total volume	10

- ประกอบเครื่อง set gel แล้วใส่ separating gel รอประมาณ 30 นาที
- เมื่อ separating gel แข็งแล้วเท stacking แล้วเสียบหัวที่ขึ้นที่ รออีกประมาณ 30 นาที

3.4.5.3 Run gel

- ใส่ 1x running buffer ให้ถึงระดับที่กำหนดในเครื่อง western blot tank
- ใส่ marker (4 µl/well) และตัวอย่างโปรตีนประมาณ 35-40 µl/well
- ตั้งค่า voltage ประมาณ 90 voltage แล้ว run ให้ band เลยขึ้น staking จึงเพิ่มเป็น 130 voltage เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3.4.5.4 Transfer โปรตีนสู่ membrane

- เตรียม pack ของ gel กับ nitrocellulose membrane
- เตรียม transfer buffer โดยมีส่วนผสมคือ 10x Towbin buffer + 20% methanol + Type I H₂O
- ทำการ transfer ที่สภาวะ 30 Voltage ที่ 4 °C 15 ชั่วโมง
- หลังจาก transfer เสร็จแล้ว ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการ transfer โดยล้าง membrane ด้วย Type I H₂O แล้วย้อม ด้วยสารละลาย Ponceau S สังเกต band โปรตีนที่เกิดขึ้น
- ล้าง Ponceau S ด้วย wash buffer (1x Towbin + 0.1% tween 20)

3.4.5.5 Blocking โปรตีนบน membrane

- ผสมน้ำยา blocking buffer (Odyssey buffer) กับ 1x TBS อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 10 ml
- เทลงบน membrane ให้ครอบคลุมทั้งหมด บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C

3.4.5.6 Probe antibody ลงบน membrane

- เตรียม primary antibody ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 : 500 μ l เจือจางใน blocking buffer
- บ่ม primary antibody ใน membrane ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4°C
- ล้าง antibody ด้วย wash buffer ประมาณ 3 รอบ รอบละ 10 นาที
- เตรียม secondary antibody 1 : 10,000 μ l ที่จำเพาะต่อ primary antibody ใน blocking buffer
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ล้าง antibody ด้วย wash buffer ประมาณ 3 รอบ รอบละ 10 นาที
- แช่ว membrane ด้วย Type I H₂O แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง Odyssey® CLx Imager

3.4.6 การหาตำแหน่งของโปรตีนด้วยเทคนิค immunofluorescence staining (IF)

- 3.4.6.1 เลี้ยงเซลล์ 5,000 cells/well ใน chamber slide แล้วบ่มเลี้ยง 24 ชั่วโมง
- 3.4.6.2 ทำการลดซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารที่มี rapamycin, AZD8055, OA หรือ OA+rapamycin, OA+AZD8055 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเทียบกับอาหารปกติ ซึ่งเป็นสถานะ control
- 3.4.6.3 ดูดอาหารทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง
- 3.4.6.4 ใส่ fixing reagent (4% paraformaldehyde) ใน chamber slide แล้วบ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อตรึงเซลล์ให้ติดกับ slide
- 3.4.6.5 ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
- 3.4.6.6 ใส่ 0.2% triton X-100 แล้วบ่ม 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเจาะรูเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง

- 3.4.6.7 Blocking โปรตีนด้วย 1% BSA ใน PBS แล้วบ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ บ่มข้ามคืนที่ 4 °C
- 3.4.6.8 ใส่ primary antibody ความเข้มข้น 1 : 200 แล้วบ่ม 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4°C แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
- 3.4.6.9 ใส่ secondary antibody โดยให้มีความเข้มข้น 1 : 200 แล้วบ่ม 1 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4 °C แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
- 3.4.6.10 ย้อมเซลล์ด้วย DAPI (1:500) บ่ม 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
- 3.4.6.11 ทำการถอด chamber ออกจากตัว slide
- 3.4.6.12 จุ่มสไลด์ใน 100% เอทานอล อย่างเร็ว จากนั้นรอให้แห้ง
- 3.4.6.13 หยด anti-fade solution แล้วปิด cover slide ให้แน่น เก็บที่ 4 °C ในที่มืด
- 3.4.6.14 นำสไลด์ที่ได้มาส่องภายใต้ confocal microscopy

3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลองทำการเก็บรวบรวมโดยการจดบันทึกและบันทึกลง คอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เป็นสถิติที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรวบรวมข้อมูล และการนำเสนอข้อมูล โดยจะแสดงเป็น ค่ากลาง (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ในรูปแบบกราฟและตาราง

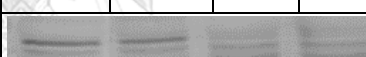
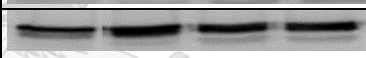
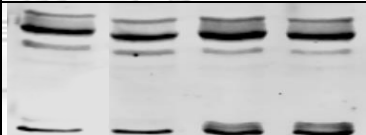
สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เป็นสถิติที่ใช้สรุปผลของประชากร โดยในการทดลอง ได้มีการแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (control) และ กลุ่มตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้มีกลุ่ม ตัวอย่างมีขนาดเล็ก ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ จึงใช้สถิติแบบ unpair t-test เพื่อเปรียบเทียบ กลุ่มประชากร 2 กลุ่ม หรือใช้ One-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มประชากรมากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไป แต่ในกรณีที่ข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติจะใช้สถิติ Mann-Whitney U test โดยถือว่าความ แตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$


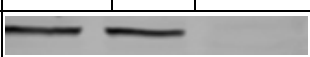
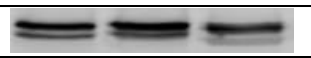
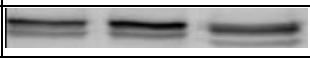
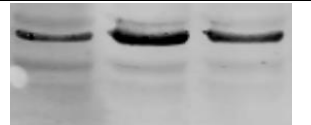
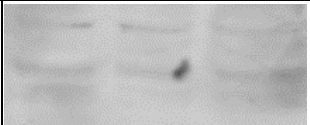
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน tau ในเซลล์ประสาทและเซลล์เกลีย

ขั้นแรกผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน tau ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด คือ SHSY-5Y (เซลล์ประสาท), U87-MG และ H4 (เซลล์เกลีย) เพื่อยืนยันหลักฐานที่กล่าวไว้ว่า โปรตีน tau แสดงออกในเซลล์ประสาทเท่านั้น และยังศึกษาการแสดงออกของโปรตีน AKT ซึ่งเป็น downstream ของ mTORC2 ในสภาวะที่มี mTOR inhibitor นั่นคือ rapamycin และ AZD8055 แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค western blot analysis โดย probe ด้วย TAU-5 antibody บนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง epitope 210 - 241 บริเวณ proline-rich domain

cell line	SHSY-5Y			
condition	normal	Rapa	AZD8055	
Conc. (μ M)	-	0.1	0.1	0.5
pAKT (Ser473)				
AKT (pan)				
Tau-5				

cell line	U87-MG			H4		
condition	normal	Rapa	AZD8055	normal	Rapa	AZD8055
Conc. (μ M)	-	0.1	0.5	-	0.1	0.5
pAKT (Ser473)						
AKT (pan)						
Tau-5						

รูปที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน tau ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด

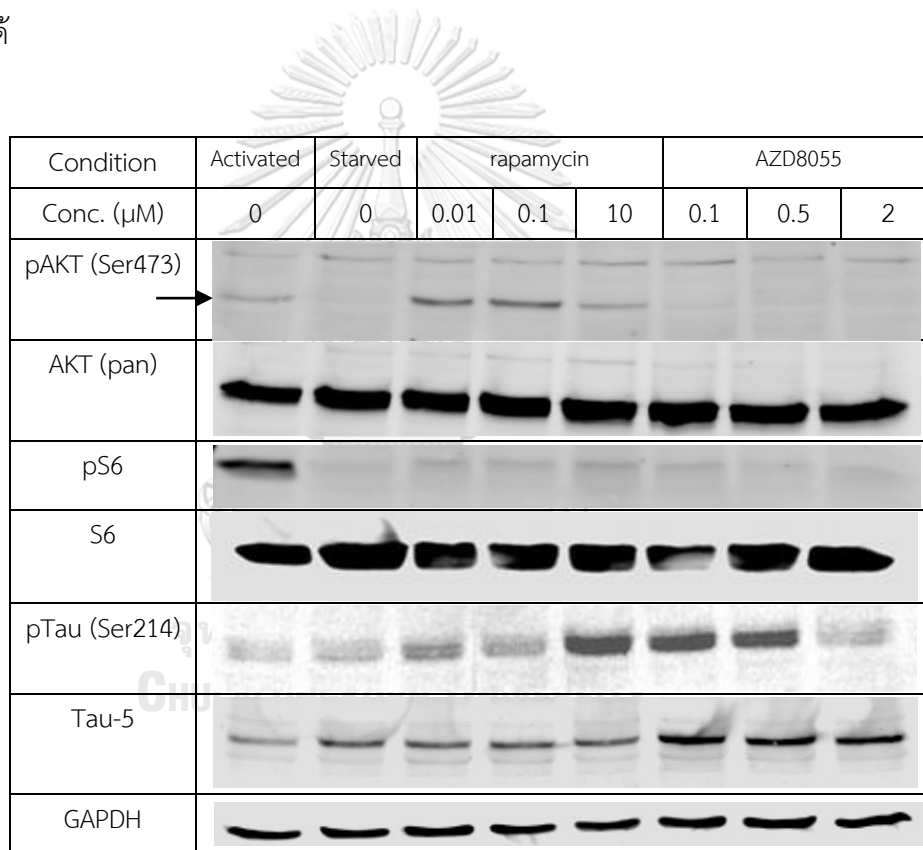
จากรูปที่ 18 พบว่า ในสภาวะปกติ มีการทำงานของโปรตีน tau ในเซลล์ SHSY-5Y และ U87-MG ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa แต่ไม่พบการทำงานของโปรตีน tau ในเซลล์ H4 และเป็นน่าสังเกตว่าในเซลล์ SHSY-5Y นั้นมีการทำงานของโปรตีน tau ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน คือที่ประมาณ 50 และ 35 kDa เมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วย rapamycin ที่ความเข้มข้น 0.1 μ M พบว่า ในเซลล์ SHSY-5Y มีการทำงานของโปรตีน tau เท่าเดิม แต่ในเซลล์ U87-MG กลับพบการทำงานของโปรตีน tau มากขึ้น และเมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วย AZD8055 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 μ M แล้วนั้น พบว่าโปรตีน tau มีการทำงานมากขึ้น แต่ในเซลล์ U87-MG เมื่อบ่มเซลล์ด้วย AZD8055 ที่ความเข้มข้น 0.5 μ M นั้นพบว่าการทำงานของโปรตีน tau เท่าเดิมเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม

ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการทำงานของ mTORC2 โดยตรวจสอบผ่านการทำงานของ AKT ซึ่งเป็นโปรตีน kinase ที่เป็นโปรตีน downstream ของ mTORC2 เช่นนั้น การทำงานของ AKT นั้นจะถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต ที่ตำแหน่ง Ser473 จากรูปที่ 18 ผู้วิจัยได้ทำการ probe pAKT(Ser473) antibody และ AKT antibody เพื่อเป็น internal control โดยทำการบ่มเซลล์ด้วย 0.1 และ 0.5 μ M AZD8055 ผลปรากฏว่า AZD8055 สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ในเซลล์ SHSY-5Y ส่วนในเซลล์ U87-MG และ H4 นั้น ที่ความเข้มข้น 0.5 μ M AZD8055 ก็สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้เช่นกัน สังเกตได้จากความเข้มของ band โปรตีน แต่ rapamycin ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม

จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า ทั้งเซลล์ SHSY-5Y และ U87-MG มีการทำงานของโปรตีน tau เช่นกัน แต่มีขนาดที่ต่างกัน ส่วนเซลล์ H4 นั้นไม่พบการทำงานของโปรตีน tau เนื่องจากอาจไม่มีการแสดงออกของโปรตีน tau ในเซลล์ neuroglioma ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ SHSY-5Y ซึ่งเป็น neuroblastoma ใช้เป็น model ในงานวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน tau และ RICTOR ซึ่งเป็นโปรตีน scaffold ของ mTORC2

4.2 การยับยั้งการทำงานของ mTORC2 มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214

เมื่อได้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการวิจัยแล้ว ทำการเปรียบเทียบในแต่ละสภาวะของเซลล์ว่ามีผลอย่างไรกับการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ในการทดลองได้ทำการลดซีรัมเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น แบ่งเซลล์ออกเป็น condition คือ สภาวะกระตุ้น, สภาวะลดซีรัม (48 ชั่วโมง) และสภาวะ treatment ด้วย mTOR inhibitor คือ rapamycin และ AZD8055 แล้วตรวจสอบการทำงานของโปรตีนด้วย western blot analysis ในสภาวะลดซีรัม ซึ่งเป็นการลดการทำงานของ mTOR complexes พบว่า สามารถลดการทำงานของ AKT, S6 ได้ เมื่อเทียบกับ total AKT และ S6 แต่ไม่สามารถลดการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้

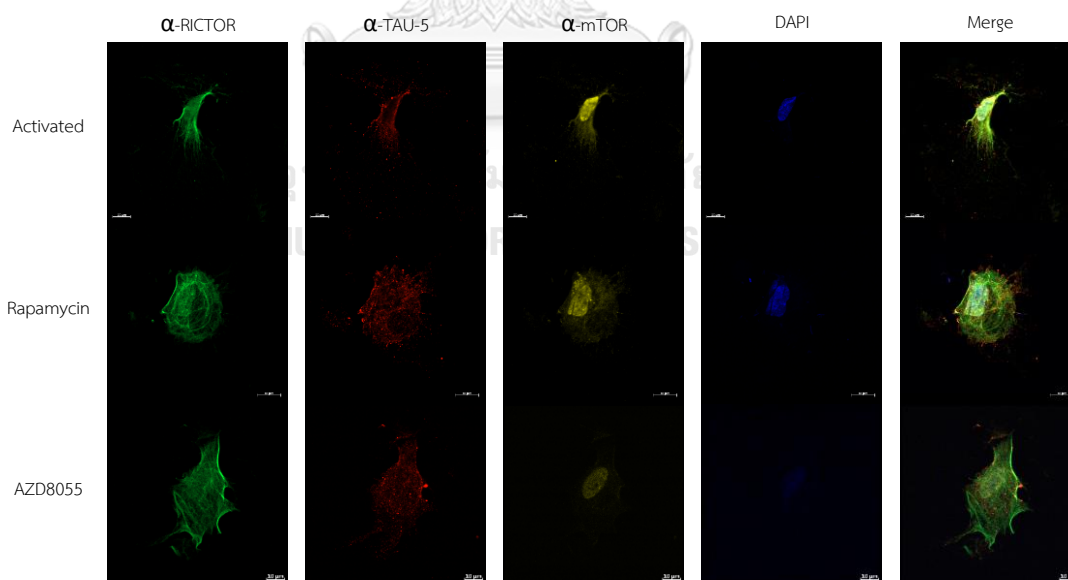


รูปที่ 19 แสดงการทำงานของโปรตีน AKT, S6, tau และ GAPDH ที่สภาวะ mTOR complexes ถูกยับยั้ง

ในสภาวะที่มีการบ่มเซลล์ด้วย rapamycin ซึ่งสามารถลดการทำงานของ mTORC1 ได้ทุกความเข้มข้นสังเกตได้จาก band ของ pS6 ที่มีความเข้มลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น แต่ไม่สามารถลดการทำงานของ mTORC2 ได้ที่ความเข้มข้น 0.01 กับ 0.1 μM Rapamycin สังเกตได้จาก band ของ pAKT ที่มีความเข้มเท่าเดิม แต่เมื่อเซลล์ได้รับ rapamycin ที่ความเข้มข้นสูง คือที่ความ

เข้มข้น 10 μM สามารถลดการทำงานของ mTORC2 สังเกตได้จากความเข้ม band ของ pAKT ที่ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าเมื่อเซลล์ได้รับ rapamycin ที่ความเข้มข้นสูง หรือในระยะเวลาสั้น ๆ สามารถลดการทำงานของ mTORC2 ได้เช่นกัน แต่ rapamycin ไม่สามารถลดการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้ และที่ความเข้มข้น 10 μM rapamycin กลับพบว่า rapamycin สามารถกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้

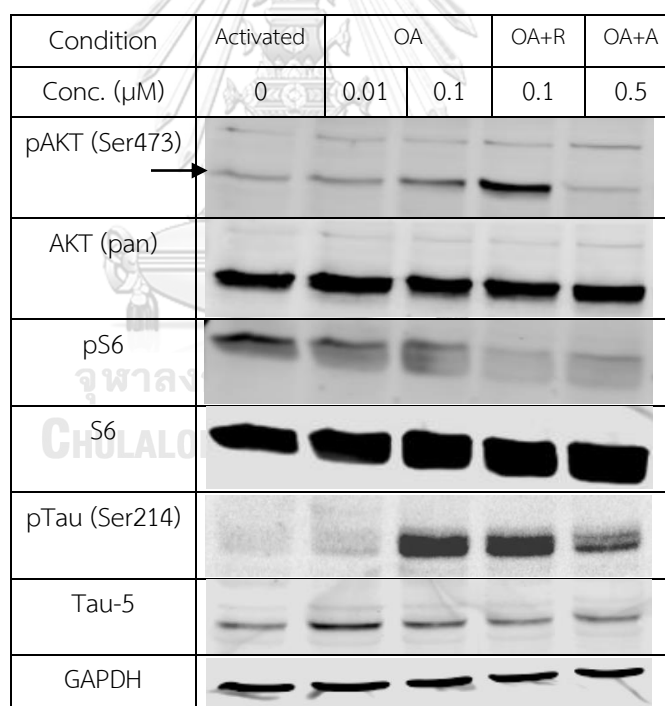
ในสภาวะที่บ่ม เซลล์ด้วย AZD8055 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 2 μM พบว่า mTOR ทั้ง 2 complexes นั้นไม่เกิดการ ทำงาน สังเกตได้จากความเข้ม band ของ pAKT และ pS6 ลดลงเช่นกัน แต่ในทางตรงข้าม AZD8055 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 μM กลับเพิ่มการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น แต่ AZD8055 ที่ความเข้มข้น 2 μM กลับไม่มีผลใด ๆ ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อบ่ม เซลล์ด้วย AZD8055 ที่ทุกความเข้มข้น สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีน tau อย่างเห็นได้ชัดจาก band ที่ probe ด้วย TAU-5 antibody ในการทดลองนี้ได้ใช้ GAPDH ซึ่งเป็นยีน house keeping ที่แสดงออกปริมาณมากเป็น internal control เพื่อเป็นตัวแปรควบคุมโปรตีนให้มีปริมาณเท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 20 แสดง localization ของโปรตีน RICTOR, mTOR, Tau และ nucleus

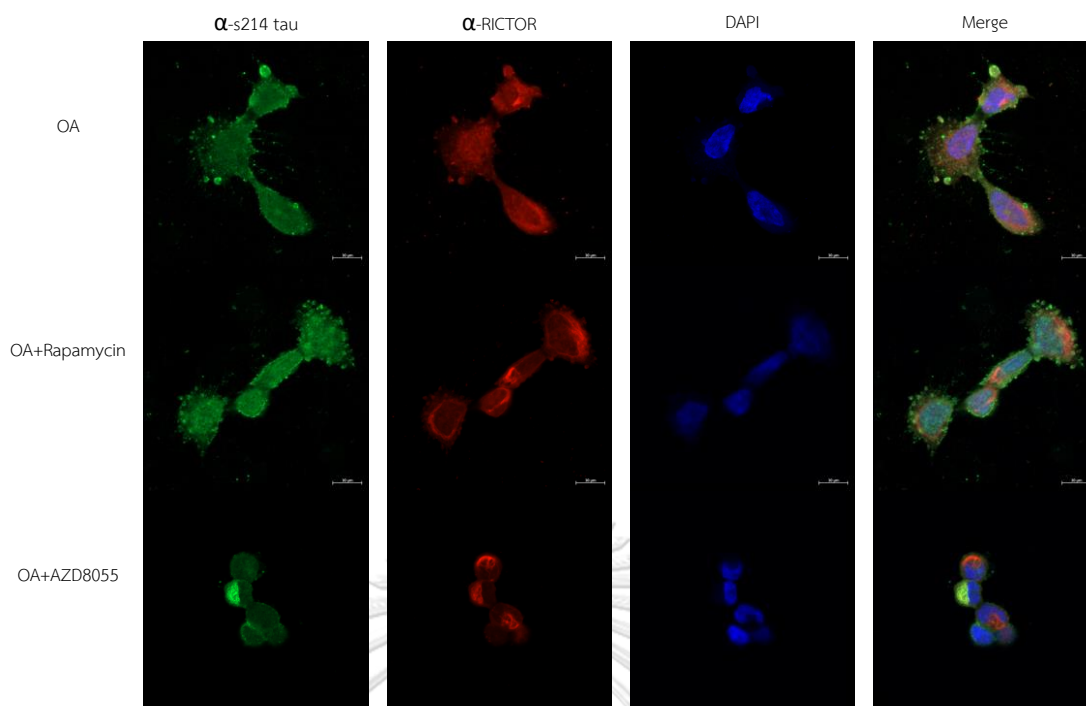
จากนั้นทำการยืนยันผลการทดลองด้วย immunofluorescence staining เพื่อศึกษา localization ของโปรตีน พบว่าเมื่อเซลล์ถูกบ่มด้วย 0.5 μM AZD8055 โปรตีน mTOR ภายในเซลล์ ลดลงอย่างชัดเจน เปรียบเทียบกับสภาวะกระตุ้น หรือสภาวะบ่มเซลล์ด้วย rapamycin โดยเฉพาะ บริเวณ cytoplasm ส่วนเซลล์ที่บ่มด้วย rapamycin ที่ความเข้มข้น 0.1 μM นั้นมีปริมาณเท่าเดิม เมื่อนำภาพมา merge กันจะพบว่า mTORC2 ใน cytoplasm ลดลงอย่างชัดเจน และพบได้ส่วนน้อย ในนิวเคลียส ส่วนสภาวะบ่มเซลล์ด้วย rapamycin นั้นกลับพบว่าไม่แตกต่างจากสภาวะกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 20 เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองร่วมกับ western blot analysis พบว่า ผลการทดลอง ยังมีความขัดแย้งกันอยู่จึงยังไม่อาจสรุปผลการทดลองได้

4.3 การกระตุ้นการทำงานของ mTORC2 มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214



รูปที่ 21 แสดงการทำงานของโปรตีน AKT, S6, Tau และ GAPDH ที่สภาวะ mTOR complexes ถูกกระตุ้น และมีการเติม OA

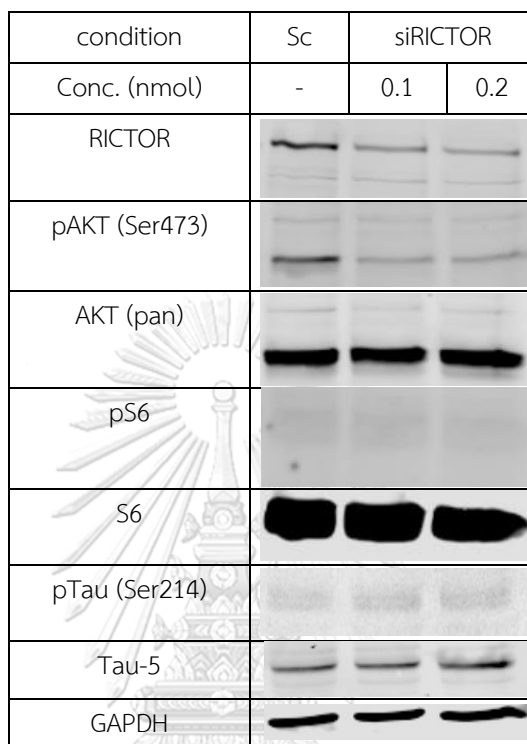
จากการทดลองที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้อย่างชัดเจน ผู้วิจัยจึงทำการบ่มเซลล์ด้วย okadaic acid (OA) ซึ่งเป็น selective inhibitor ของ protein phosphatase 1 (PP1) และ protein phosphatase 2A (2A) เมื่อเซลล์ได้รับ OA จะทำให้ PP2A ถูกยับยั้งทำให้เกิดการทำงานของ AKT มากขึ้นกว่าปกติ รวมถึงโปรตีน kinase อื่น ๆ เช่น โปรตีนใน MAPK pathway และเป็นผลทำให้โปรตีน downstream ของ AKT มีการทำงานสูงขึ้นอีกด้วย ในการทดลองได้ทำการบ่มเซลล์ด้วย OA ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 μM พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 μM สามารถเพิ่มการทำงานของ AKT และ S6 ได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น และยังเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น จากนั้นทำการทดลองบ่มเซลล์ด้วย 0.1 μM OA ร่วมกับ 0.1 μM rapamycin พบว่า สามารถเพิ่มการทำงานของ AKT ได้สูงขึ้นอย่างชัดเจน และสามารถลดการทำงานของ S6 ได้เช่นกัน เมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น และสภาวะบ่มเซลล์ด้วย 0.1 μM OA การบ่มเซลล์ด้วย 0.1 μM OA ร่วมกับ 0.1 μM rapamycin นั้นไม่สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 สังเกตได้จาก band โปรตีนที่มีความเข้มเท่าเดิมเมื่อเทียบกับ band ของ 0.1 μM OA ส่วนการบ่มเซลล์ด้วย 0.1 μM OA ร่วมกับ 0.1 μM AZD8055 พบว่า สามารถลดการทำงานของ AKT และ S6 ได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสภาวะที่เซลล์ได้รับ 0.1 μM OA และที่น่าสนใจคือ 0.1 μM AZD8055 สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้อย่างเห็นได้ชัด จึงอาจสรุปได้ว่าในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นการทำงานของโปรตีน mTOR complexes ด้วย OA ซึ่งบ่มร่วมกับ AZD8055 ซึ่งเป็น mTOR ATP-competitive inhibitor สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟต บน tau ได้ และในการทดลองนี้ได้ใช้ GAPDH ซึ่งเป็นยีน house keeping ที่แสดงออกปริมาณมาก เป็น internal control เพื่อเป็นการตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ศึกษาว่ามีปริมาณเท่ากัน ดังรูปที่ 21



รูปที่ 22 แสดง localization ของโปรตีน RICTOR, tau (Ser214) และ nucleus ในสภาวะกระตุ้นการทำงานของ mTOR complexes

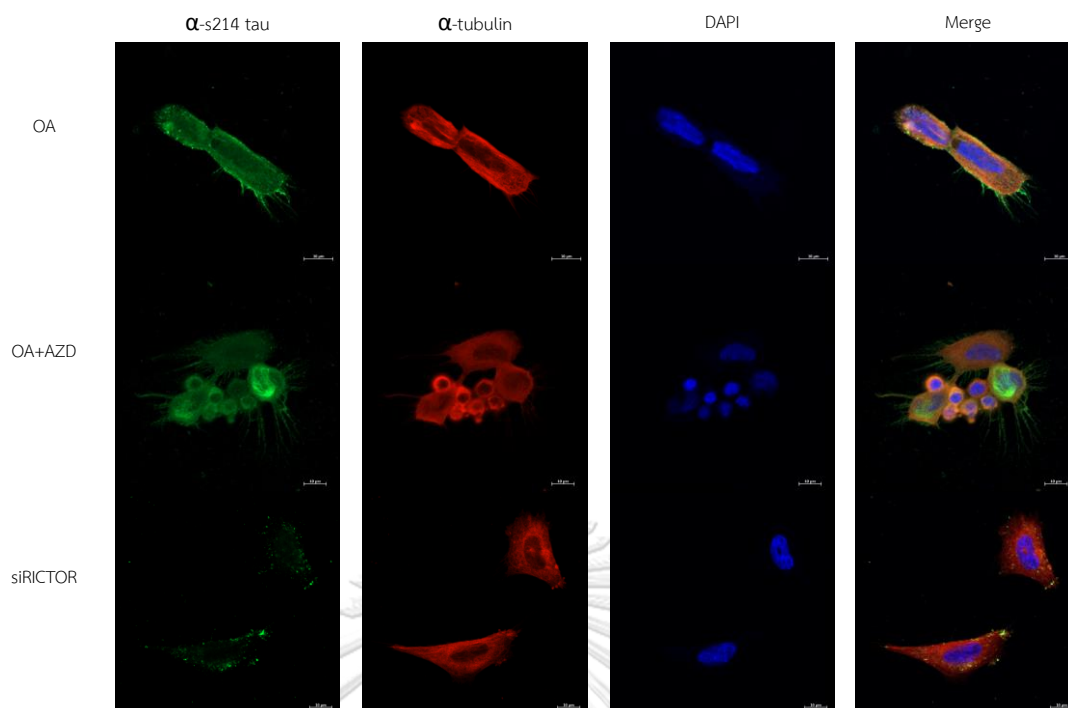
จากการวิเคราะห์ผลด้วย western blot analysis ที่ผ่านมา สามารถสรุปได้ว่า AZD8055 มีความสามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตได้ ผู้วิจัยจึงยืนยันผลการทดลองอีกครั้งด้วย ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการย้อม tau ที่ตำแหน่ง Ser214 กับ RICTOR พบว่า เมื่อทำการ treatment เซลล์ด้วย OA ที่ความเข้มข้น $0.1 \mu\text{M}$ ส่งผลให้เซลล์เกิดการหดตัวมากขึ้น และเมื่อทำการบ่มเซลล์ด้วย $0.1 \mu\text{M}$ OA ร่วมกับ $0.1 \mu\text{M}$ rapamycin หรือ $0.5 \mu\text{M}$ AZD8055 พบ RICTOR ที่บริเวณเยื่อหุ้ม nucleus ปริมาณมากกว่าบริเวณอื่น เมื่อลองสังเกตสภาวะบ่มเซลล์ด้วย OA ร่วมกับ AZD8055 ทำให้ทราบว่า pTau (Ser214) มีมากขึ้นใน nucleus เมื่อนำภาพมาซ้อน จะสามารถเห็นได้อย่างชัดเจนว่า pTau (Ser214) ที่บริเวณขอบเซลล์นั้นหายไป เมื่อเทียบกับสภาวะกระตุ้น ดังรูปที่ 22

4.4 การลดการแสดงออกของยีน *RICTOR* ไม่มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214



รูปที่ 23 แสดงการทำงานของโปรตีน RICTOR, AKT, S6, Tau และ GAPDH ที่สภาวะลดการแสดงออกของยีน *RICTOR*

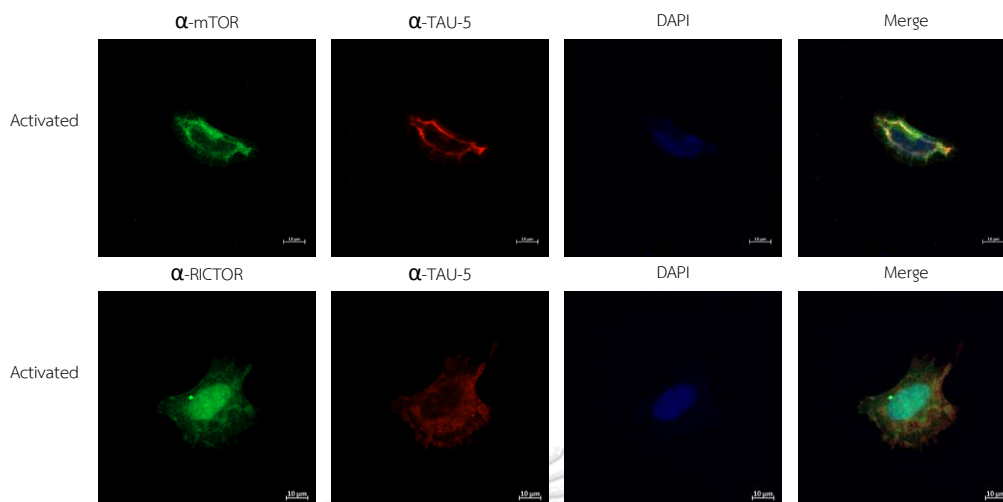
ในการทดลองนี้ได้ทำการลดการแสดงออกของยีน *RICTOR* ด้วยเทคนิค RNA interference เพื่อดูผลการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ขั้นแรกทำการศึกษาปริมาณของ siRNA ที่เหมาะสม พบว่า ปริมาณ siRNA ที่ 0.1 และ 0.2 nmol สามารถลดการแสดงออกของยีน *RICTOR* ได้อย่างชัดเจน และไม่แตกต่างกัน การลดการแสดงออกของยีน *RICTOR* นั้น มีผลโดยตรงกับการทำงานของ AKT ทำให้ การทำงานของ AKT ลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ ซึ่งเป็นสภาวะที่เซลล์ได้รับ scramble siRNA ส่วนการทำงานของ S6 นั้นก็ลดลงเช่นกัน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการทำงานของ S6 ลดลงหรือหายไปในสภาวะปกติ ส่วนการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 นั้น พบว่า มีปริมาณเท่าเดิม เมื่อเทียบกับสภาวะปกติ ในการทดลองนี้ได้ใช้ GAPDH ซึ่งเป็นยีน house keeping ที่แสดงออกปริมาณมาก เป็น internal control เพื่อเป็นการตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ศึกษาว่ามีปริมาณเท่ากัน ดังรูปที่ 23



รูปที่ 24 แสดง localization ของโปรตีน RICTOR, tau (Ser214) และ nucleus ในสภาวะลดการ แสดงออกของยีน *RICTOR*

ต่อมาทำการยืนยันผลการทดลองด้วยการทำ immunofluorescence staining เช่นเดิม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 กับการลด การแสดงออกของยีน *RICTOR* ด้วย siRNA พบว่า pTau (Ser214) ลดลง เมื่อเทียบกับสภาวะที่ OA treatment หรือสภาวะบ่มเซลล์ด้วย OA-AZD8055 ซึ่งการทดลองนี้กลับไม่สอดคล้องกับผลที่ได้จาก western blot analysis เป็นไปได้ที่การทดลองอาจความผิดพลาด ซึ่งต้องทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง แต่สามารถสรุปได้คร่าว ๆ ว่า การลดการแสดงออกของยีน *RICTOR* ทำให้การเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 24 ดังนั้น จึงต้องทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง tau และ RICTOR เพิ่มเติมต่อไป เพื่อให้ทราบถึงการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งสอง

4.5 โปรตีน mTORC2 กับ tau มี localization ร่วมกัน

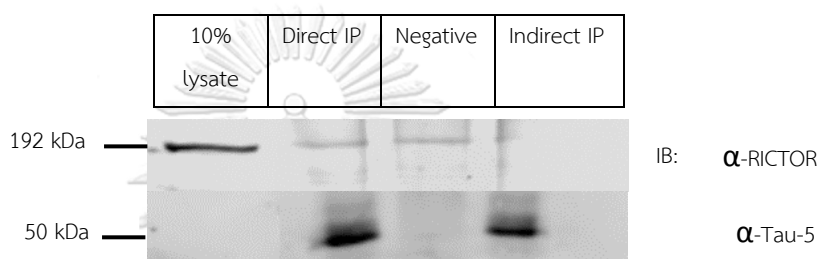


รูปที่ 25 แสดง localization ของโปรตีน mTOR, tau, RICTOR และ nucleus

จากรูปที่ 25 รูปแถบบนเป็นการย้อมเซลล์ด้วย mTOR กับ tau antibody ในสภาวะกระตุ้น โดยผ่านการลดซีรัมด้วย serum-free medium เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น complete medium พบโปรตีน mTOR และ tau ทั้งใน nucleus และ cytoplasm โดยเฉพาะที่ขอบเซลล์จะพบ tau มากเป็นพิเศษ สังเกตได้จากการเปล่งสีแดง ดังนั้น ทำให้ทราบว่า mTOR complexes กับ tau อาจมีความสัมพันธ์กันไม่ทางใดก็ทางหนึ่ง เพื่อต้องการพิสูจน์ถึงความสัมพันธ์ของ mTORC2 กับ tau จึงทำการย้อมเซลล์ด้วย RICTOR กับ tau antibody ในสภาวะกระตุ้นเช่นกัน พบว่า RICTOR ซึ่งเป็นโปรตีน scaffold ของ mTORC2 มี colocalization ซึ่งกันและกัน สังเกตได้จากภาพที่ซ้อนทับกันพอดีในรูป merge เพราะฉะนั้น จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า mTORC2 อาจมีหน้าที่บางอย่างที่เกี่ยวข้องกับ tau สังเกตได้จากการมี colocalization ของโปรตีนดังกล่าว

4.6 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง RICTOR และ tau ด้วยเทคนิค immunoprecipitation (IP)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน RICTOR และ tau ซึ่งเป็น microtubule associated protein โดยเทคนิค immunoprecipitation (IP) ในการ pull-down โปรตีนในเซลล์ SHSY-5Y ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อประสาทที่มีการแสดงออกของโปรตีน tau ที่สูงกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ การทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ทำการบ่มสารในเซลล์ เนื่องจากต้องการทราบถึงการแสดงออกและการทำงานของโปรตีนในสภาวะปกติว่าโปรตีนทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างไร

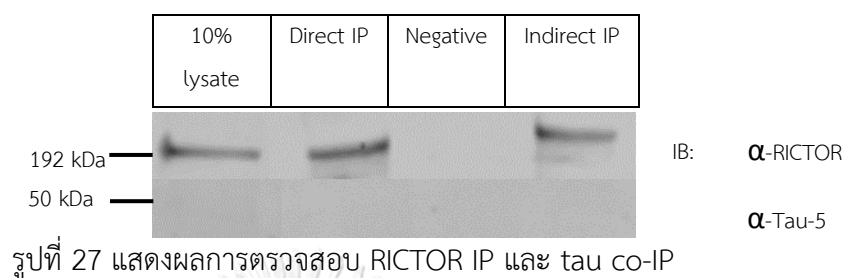


รูปที่ 26 แสดงผลการตรวจสอบ tau IP และ RICTOR co-IP

ผู้ทดลองได้ทำการ IP โปรตีน tau ลงมาแล้วนำมาตรวจสอบการทำงานด้วยเทคนิค western blot analysis และ probe TAU-5 antibody เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการ IP และยัง probe RICTOR antibody ลงบน membrane ที่มีการแยกโปรตีนที่ได้จาก tau IP เช่นกัน เรียกว่าการกระทำเช่นนี้ว่า เทคนิค Co-IP สามารถแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนได้ เนื่องจากโปรตีนนั้นจะอยู่ในรูป complex และมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน เมื่อทำการ IP โปรตีนที่สนใจลงมา โปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์เหล่านั้นจะตกตะกอนลงมาด้วย ทำให้ทราบถึงการทำงานซึ่งกันและกันระหว่างโปรตีนที่สนใจที่อยู่ในรูป complex ว่ามีกลไกอย่างไรในการควบคุมการทำงานของเซลล์

จากรูปที่ 26 พบว่า สามารถ pull down โปรตีน tau ลงมาได้ด้วยเทคนิค direct และ indirect IP ในปริมาณพอ ๆ กัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ 10% lysate ซึ่งเป็นสภาวะควบคุมเชิงบวกที่ใช้เป็นสัดส่วนในการเปรียบเทียบกับ IP product พบว่า ไม่เจอการทำงานของโปรตีน tau เนื่องจากโปรตีน tau นั้นเป็นโปรตีนที่แสดงออกน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ถ้าต้องการเห็นการทำงานของโปรตีน tau จึงจำเป็นที่จะต้องเพิ่มปริมาณ protein ตั้งแต่ขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE ต่อมาทำการตรวจสอบการทำงานของ mTORC2 โดยการ probe RICTOR antibody พบ band ของ RICTOR ใน 10% lysate ซึ่งเป็นสภาวะควบคุมเชิงบวก และพบ band ของ RICTOR ใน direct IP ของ tau แต่กลับไม่พบ band ของ RICTOR ใน indirect IP แต่ที่น่าสงสัยกลับพบ

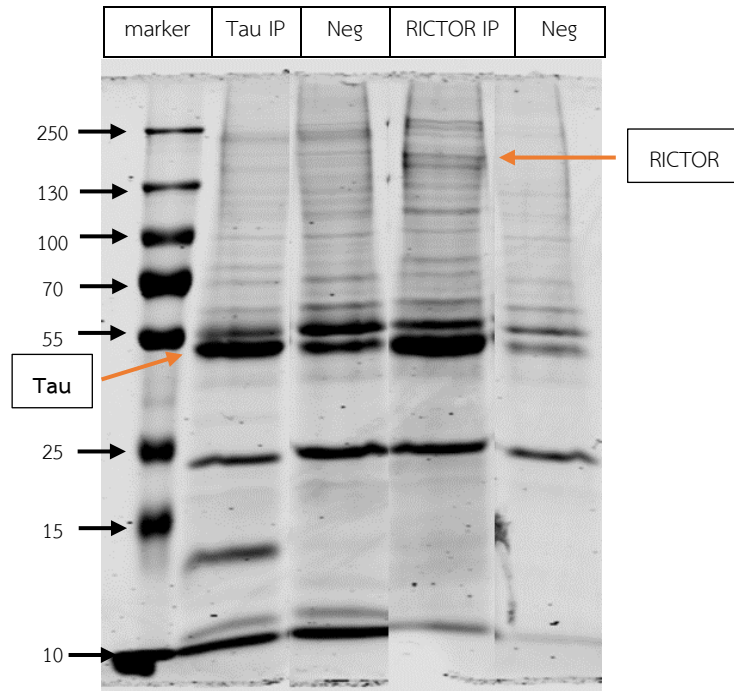
band ของ RICTOR ในสถานะควบคุมเชิงลบ คือ สภาวะที่ไม่มีการเติม antibody ลงไปในการทำ IP ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ band ของ RICTOR ใน direct IP ของ tau อาจจะเป็น non-specific band จึงต้องทำการตรวจสอบต่อไป



จากนั้นทำการยืนยันความสัมพันธ์ของโปรตีน tau และ RICTOR อีกครั้งด้วยเทคนิค IP เช่นเดิม แต่ทำการ pull down โปรตีน RICTOR ในวิธี direct และ indirect IP พบว่า band ของ RICTOR มีความเข้มพอ ๆ กับ 10% lysate และไม่พบ band ของ RICTOR ในสถานะควบคุมเชิงลบ จึงมั่นใจได้ว่า RICTOR IP นั้นมีความแม่นยำสูง ในส่วนของ tau co-IP นั้นกลับไม่พบ band ของโปรตีน tau เลย ทั้งใน สภาวะควบคุมเชิงบวก (10% lysate), สภาวะควบคุมเชิงลบ หรือ IP product จากทั้ง 2 วิธี ดังแสดงรูปที่ 27 จึงอาจเป็นไปได้ว่า ทั้ง RICTOR และ tau อาจไม่มีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันโดยตรงจึงต้องทำการทดลองเพื่อหาคำตอบว่าโปรตีนอะไรที่อาจจะเป็นตัวกลางในการควบคุมการทำงานของ mTORC2 และ tau

4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง RICTOR และ tau ด้วยเทคนิค affinity purification mass spectrometry

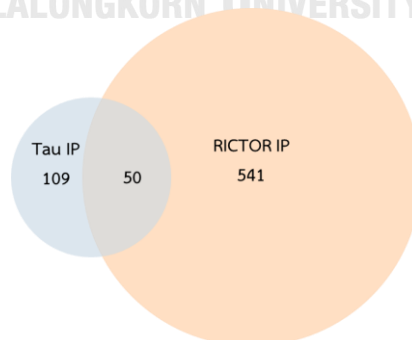
จากการทดลองก่อนหน้านี้ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ของ mTORC2 และ tau ได้จึงต้องทำการค้นหาโปรตีน ด้วยเทคนิค affinity purification mass spectrometry โดยการ pull down โปรตีนลงมา ด้วยเทคนิค IP แล้วนำมาทำ SDS-PAGE เพื่อแยกโปรตีนด้วยน้ำหนักรวมแล้ว ย้อม band protein และตัดเจล เพื่อทำ in-gel digestion และสกัดโปรตีนออกมา แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS เมื่อได้ข้อมูลออกมาแล้ว ที่อยู่ในรูป mass spectra แล้ว นำข้อมูลมาค้นหาโปรตีนด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software โดยเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน UniProt ขั้นตอนสุดท้ายจะได้รายชื่อโปรตีนออกมา แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป



รูปที่ 28 แสดง band ของ Tau and RICTOR IP บนเจล

จากรูปที่ 28 แสดงให้เห็นถึง band โปรตีนบนเจลที่ผ่านการแยกด้วยน้ำหนักรีดด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยลูกศรชี้ให้เห็นถึง band ของ tau และ RICTOR ส่วน band อื่น ๆ นั้น คาดว่าอาจจะเป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กันกับ IP product ในการทดลองได้เปรียบเทียบกับสถานะควบคุมเชิงลบที่ไม่ใส่ antibody จะสังเกตได้ว่า band ของสถานะควบคุมเชิงลบใน tau IP นั้นมีความเข้ม band สูงกว่าปกติ ซึ่งอาจเป็น non-specific band ของโปรตีน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 29 แสดงจำนวนโปรตีนที่พบใน Tau และ RICTOR IP ในการทดลองครั้งที่ 1

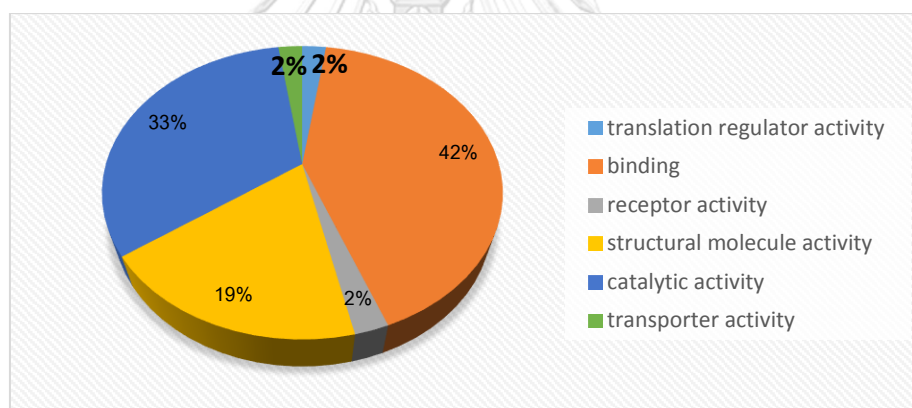
เมื่อผ่านกระบวนการค้นหาโปรตีนที่ได้จาก tau และ RICTOR IP ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software แล้ว จนได้รายชื่อโปรตีนออกมาเป็นข้อมูลดิบแล้ว ผู้วิจัยได้สร้างเกณฑ์การคัดเลือกของโปรตีนที่ได้ คือ ต้องมีสัดส่วนระหว่าง IP product ต่อ negative control มากกว่า 10 เท่า ในขั้นแรกได้ทำการทดลองครั้งที่ 1 (n=1) พบว่า มีโปรตีนที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือก 159 และ 591 ชนิด ใน tau และ RICTOR IP ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลโปรตีนทั้งสองมาซ้อนทับกัน กลับไม่พบโปรตีน tau ในรายชื่อโปรตีนของ RICTOR IP และไม่พบโปรตีน RICTOR ใน tau IP เช่นกัน แต่ผลที่ได้กลับพบโปรตีนทั้งหมด 50 ชนิด ที่อาจจะมึปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 29 และ ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง 50 candidate proteins ที่ได้จาก Tau และ RICTOR IP

No.	Description	Accession No.
1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 [OS=Homo sapiens]	Q9Y2W1
2	Isoform 3 of Polyadenylate-binding protein 4 [OS=Homo sapiens]	Q13310
3	Keratin, type II cytoskeletal 1 - Homo sapiens (Human).	P04264
4	Carboxypeptidase A4 [OS=Homo sapiens]	Q9UI42
5	probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 [OS=Homo sapiens]	P17844
6	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 [OS=Homo sapiens]	A8K2U0
7	Isoform 2 of Extended synaptotagmin-1 [OS=Homo sapiens]	Q9BSJ8
8	ATP-dependent RNA helicase DDX3X [OS=Homo sapiens]	O00571
9	plectin [OS=Homo sapiens]	Q15149
10	eukaryotic translation initiation factor 6 [OS=Homo sapiens]	P56537
11	Keratin, type I cytoskeletal 18 - Homo sapiens (Human).	P05783
12	alpha-internexin [OS=Homo sapiens]	Q16352
13	Eukaryotic initiation factor 4A-III [OS=Homo sapiens]	P38919
14	Complement C4-A [OS=Homo sapiens]	P0C0L4
15	Keratin type II cuticular Hb5 - Homo sapiens (Human).	P78386
16	Ras-related protein Rab-4A [OS=Homo sapiens]	P20338
17	Neurosecretory protein VGF [OS=Homo sapiens]	O15240
18	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 [OS=Homo sapiens]	P51116
19	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S20 [OS=Homo sapiens]	P60866

20	Isoform 2 of Histone H2B type 2-F [OS=Homo sapiens]	Q5QNW6
21	Calpain-1 catalytic subunit [OS=Homo sapiens]	P07384
22	keratin, type I cuticular Ha4 [OS=Homo sapiens]	O76011
23	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [OS=Homo sapiens]	P06576
24	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 [OS=Homo sapiens]	P26196
25	Protein CASC3 [OS=Homo sapiens]	O15234
26	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type [OS=Homo sapiens]	P17858
27	RNA-binding protein 33 [OS=Homo sapiens]	Q96EV2
28	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase [OS=Homo sapiens]	Q13724
29	Polyadenylate-binding protein 1 [OS=Homo sapiens]	P11940
30	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 [OS=Homo sapiens]	O00425
31	DNA mismatch repair protein MSH2 [OS=Homo sapiens]	P43246
32	60S ribosomal protein L27 [OS=Homo sapiens]	P61353
33	40S ribosomal protein S15a [OS=Homo sapiens]	P62244
34	Serine/threonine-protein kinase D2 [OS=Homo sapiens]	Q9BZL6
35	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2 [OS=Homo sapiens]	Q9UN86
36	Regulator of nonsense transcripts 1 [OS=Homo sapiens]	Q92900
37	40S ribosomal protein S27 [OS=Homo sapiens]	P42677
38	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 [OS=Homo sapiens]	Q14204
39	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 [OS=Homo sapiens]	Q92841
40	Heat shock cognate 71 kDa protein [OS=Homo sapiens]	P11142
41	60S ribosomal protein L12 [OS=Homo sapiens]	P30050
42	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M [OS=Homo sapiens]	P52272
43	Isoform 2 of AP-2 complex subunit beta [OS=Homo sapiens]	P63010
44	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 [OS=Homo sapiens]	Q6P2Q9
45	Lamin-B2 [OS=Homo sapiens]	Q03252
46	60S ribosomal protein L7 [OS=Homo sapiens]	P18124
47	Gelsolin [OS=Homo sapiens]	P06396
48	AP-2 complex subunit alpha-1 [OS=Homo sapiens]	O95782
49	Transferrin receptor protein 1 [OS=Homo sapiens]	P02786
50	Atypical kinase ADCK3, mitochondrial [OS=Homo sapiens]	Q8NI60

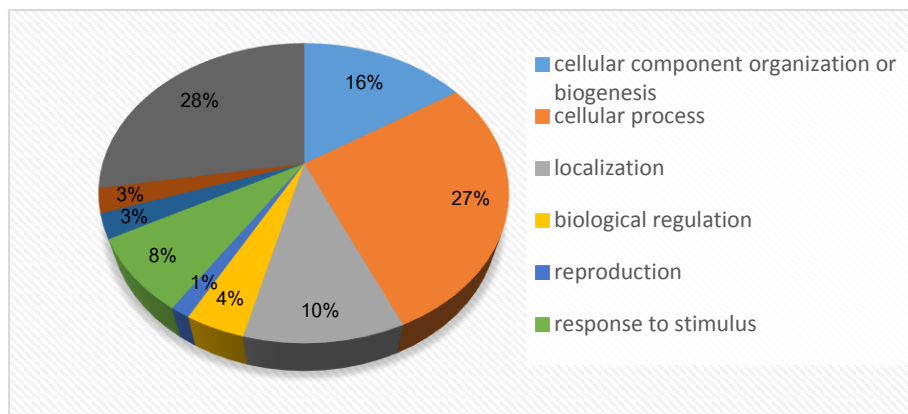
จากนั้นทำการจัดกลุ่มโปรตีนที่ได้ 50 ชนิดด้วยโปรแกรม PANTHER classification system (version 13.1) เพื่อศึกษา molecular functions, biological processes และ cellular components ตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ข้างต้น การจัดกลุ่มแบบแรกคือ Molecular Function (MF) เป็นการจัดกลุ่มตามหน้าที่ของโปรตีน พบว่า โปรตีนทั้ง 50 ชนิดอยู่ในกลุ่ม binding activity (GO:0005488), catalytic activity (GO:0003824), และ structural molecule activity (GO:0005198) ประมาณ 41.9 % 32.6 % และ 18.6 % ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 30 ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มโปรตีนในครั้งนี้ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน tau และ RICTOR ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาโปรตีนกลุ่มนี้อย่างละเอียด โดยพบว่า gelsolin (P06396) และ plectin (Q15149) ถูกพบในกลุ่มโปรตีน cytoskeletal protein binding (GO:0008092) และ structural constituent of cytoskeleton (GO:0005200) ซึ่งโปรตีนทั้งสองมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของ actin filament และอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของ microtubule อีกด้วย



รูปที่ 30 แสดงการจัดกลุ่ม Molecular Function ใน 50 candidate proteins

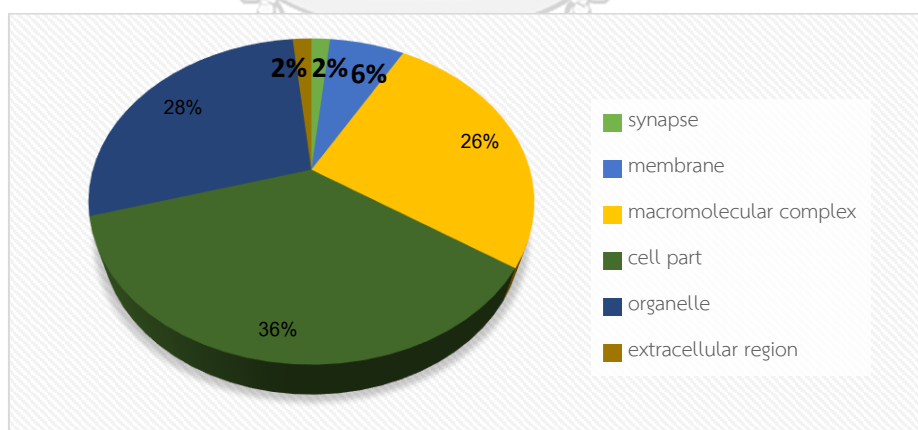
ต่อมาทำการแบ่งกลุ่มโปรตีนตาม Biological Process (BP) เป็นการอธิบายเกี่ยวกับการเกิดเหตุการณ์ต่าง ๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง พบโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม cellular process (GO:0009987) และ metabolic process (GO:0008152) 27.6% และยังพบ cellular component organization or biogenesis (GO:0071840) และ localization (GO:0051179) 15.8 % และ 10.5 % ตามลำดับ ซึ่งพบโปรตีนที่น่าสนใจ ในกลุ่มย่อยของ cellular process (GO:0009987) นั่นคือ cellular component movement (GO:0006928) พบ Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (Q14204) และ Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 (P51116) และยังพบ gelsolin (P06396), fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 (P51116) และ lamin-

B2 (Q03252) ในกลุ่มของ cellular component morphogenesis (GO:0032989) อีกด้วยจากรายชื่อโปรตีนที่กล่าวมาที่มีความสำคัญในกระบวนการ cell reorganization ทั้งสิ้น



รูปที่ 31 แสดงการจัดกลุ่ม Biological Process ใน 50 candidate proteins

พบโปรตีนในกลุ่มของ cell part (GO:0044464), organelle (GO:0043226), macromolecular complex (GO:0032991) 36.1 %, 27.9 % และ 26.2 % ซึ่งพบ gelsolin, cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 และ Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2 เช่นกันในกลุ่มของ cytoskeleton (GO:0005856) ในกลุ่มของ organelle (GO:0043226)

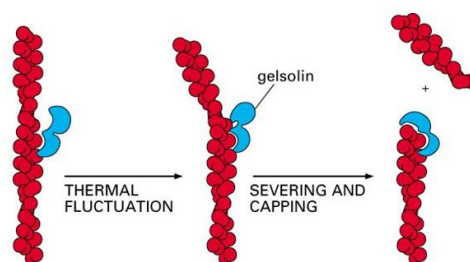


รูปที่ 32 แสดงการจัดกลุ่ม Cellular Component ใน 50 candidate proteins

Gelsolin

Gelsolin เป็น actin-binding protein ชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ actin filament ถูกพบมากใน cytoplasm และ blood plasma เรียกว่า cytoplasmic gelsolin และ plasma gelsolin ตามลำดับ มีหลักฐานมากมายกล่าวไว้ว่า ถ้าการทำงานร่วมกันของ gelsolin กับ actin เกิดความผิดปกติแล้วจะก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น cancer, chronic inflammatory disease, acute injury และ Alzheimer's disease (32) ยังไม่พบหลักฐานที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ของ gelsolin/tau/mTORC2 แต่อย่างใด แต่จากการค้นคว้าหาข้อมูลแล้ว gelsolin อาจจะเป็นตัวแปรที่สำคัญในการยับยั้งเกิดโรคอัลไซเมอร์ ทั้ง cytoplasmic gelsolin และ plasma gelsolin นั้น เกิดจาก alternative splicing ที่ทำให้ plasma gelsolin มีปริมาณโปรตีนที่มากกว่า cytoplasmic gelsolin ถึง 25 กระจดอะมิโน (33) plasma gelsolin มีหน้าที่หลัก ๆ คือ เป็น actin-scavenging system ที่ช่วยป้องกันการไหลเวียนของไหลในร่างกายจากผลกระทบของ actin polymers ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ที่เป็นบาดเจ็บหรืออักเสบ (34) ส่วน cytoplasmic gelsolin มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ actin filament ภายในเซลล์ โดยมันจะยับยั้งการเกิด actin polymer ที่ปลายบวก โดยจับและตัด actin สายยาวให้เป็นท่อนเล็ก ๆ ดังรูปที่ 33 ในทางตรงกันข้ามมันยังกระตุ้นการเกิดกระบวนการ nucleation ของ actin filament อีกด้วย (33) cytoplasmic gelsolin ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ (35) ดังนั้น cytoplasmic gelsolin จึงมีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมการทำงานของเซลล์ในด้านการเคลื่อนที่ และรักษาสมดุลของเซลล์ เพราะฉะนั้นในเซลล์มะเร็งถ้าเกิดความผิดปกติของ gelsolin จะก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอย่างรวดเร็ว

ส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างโรคอัลไซเมอร์และ gelsolin นั้น มีหลักฐานได้กล่าวไว้ว่ายีน *GSM* ที่แสดงออกในเซลล์ระบบประสาทส่วนกลาง ทำหน้าที่เป็น neuroprotective ใน *in vivo* model ในสภาวะที่เซลล์กำลังเกิด apoptosis นั้น cytoplasmic gelsolin สามารถถูกตัดด้วย caspase หรือ calpain ได้เป็น carboxyl-terminal fragment of gelsolin (gelsolin-CTF) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48 kDa (36) มีการทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิด apoptosis ด้วย H_2O_2 แล้ววัดปริมาณ gelsolin-CTF พบว่า มีปริมาณสูงกว่าสภาวะควบคุม และที่น่าแปลกใจคือ gelsolin-CTF ยังมีความสามารถในการจับ actin filament ได้อีกด้วย (37) ดังนั้น gelsolin-CTF ที่ถูกตัดด้วยกระบวนการ apoptosis นั้นอาจเป็น biomarker สำคัญในการตรวจวัดโรคอัลไซเมอร์ในได้อนาคต (38)



รูปที่ 33 แสดงการทำงานของ gelsolin (39)

จากการศึกษาของ Nie และคณะมีการรายงานถึง ความเครียดที่เกิดจาก Atf3-gelsolin cascade มีผลทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของ tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) หรือ TSC2 มีผลทำให้โปรตีนในเซลล์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น อันเนื่องมาจากการทำงานของโปรตีน mTOR ที่มากเกินไป กล่าวคือ gelsolin ไปมีผลต่อการเกิด transcription ของยีน *ATF3* ในการศึกษาดังกล่าวได้ใช้เซลล์ประสาทของหนูเป็น model ในการทดลอง ในเซลล์ที่สูญเสียการทำงานของยีน *TSC* พบว่า ปริมาณของ Atf3 ภายในเซลล์ลดลง จึงสรุปได้ว่า gelsolin อาจจะมีผลทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียด แล้วไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน *TSC* เป็นผลทำให้เกิดการทำงานของโปรตีน mTOR ที่มากเกินไป (40)

จากการศึกษาของ Guo และคณะได้ทำการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน gelsolin ในเซลล์ YTS ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด natural killer/T-cell lymphoma (NKTCL) มีผลทำให้ระดับของ PI3K ลดลงส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน AKT ลดลง ส่งผลทำให้ลดการแบ่งตัวของเซลล์ และยังเหนี่ยวนำทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis อีกด้วย (41) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Flanagan และคณะได้สรุปไว้ว่า Gelsolin และ tau สามารถจับกับ phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) และมีผลต่อการตกตะกอนของ PIP2 (42) ซึ่ง PIP2 เป็นตัวควบคุม mTORC1 และเป็น upstream ของ PI3K อีกด้วย จากข้อมูลปฏิสัมพันธ์ระหว่าง tau และ RICTOR IP จึงอาจสรุปได้ว่า gelsolin อาจจับกับ tau และ mTORC2 เพื่อควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยการยับยั้งการทำงานแบบ negative feedback ของ mTORC1 และอาจควบคุมการตายแบบ apoptosis อีกด้วย

Plectin

Plectin เป็น โปรตีนขนาดใหญ่ ประมาณ 500 kDa ที่เชื่อมโยงโปรตีนโครงร่างค้ำจุน actin microfilaments, microtubules และ intermediate filaments เข้าด้วยกัน และนอกเหนือจากนั้นแล้ว plectin ยังสามารถจับกับ transmembrane receptors, ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส และโปรตีน kinase ต่าง ๆ ซึ่งมีผลอย่างมากต่อกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ plectin นั้นสามารถจับ MAPs เพื่อควบคุมการรวมกลุ่มของไมโครทิวบูลได้อีกด้วย (43) ดังนั้น ความสัมพันธ์ระหว่าง mTORC2/tau/plectin จึงเป็นความรู้ใหม่ที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

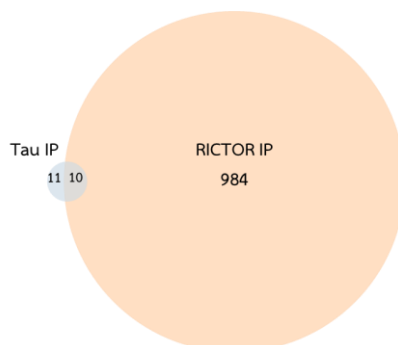
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1

เป็นโปรตีนโครงสร้างเป็นส่วนประกอบของ dynein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ขนส่ง vesicle ภายในเซลล์ จากงานวิจัยของ Chen และคณะ ได้กล่าวสรุปสั้น ๆ ไว้ว่าการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau มากผิดปกติร่วมกับ ความไม่สมดุลของโครงร่างของเซลล์ อาจเกิดจากความผิดปกติของ dynein ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ tau และ APP และเหนี่ยวนำทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (44)

Lamin-B2

Lamin-B2 นั้นเป็น intermediate filament ชนิดหนึ่งซึ่งมีหน้าที่เป็นโครงร่างค้ำจุนของเซลล์โดยเชื่อมโยงทั้ง actin filament และ microtubule เข้าด้วยกัน นอกจากนั้นยังควบคุมการ transcription ของเซลล์อีกด้วย (45) มีงานวิจัยฉบับหนึ่งได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของ lamin-B กับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติบนโปรตีน tau โดยใช้ *Drosophila* เป็น model ในการทดลอง เนื่องจากเซลล์ของมันมีการแสดงออก lamin-B เช่นเดียวกับมนุษย์ จากนั้นตัดแต่งพันธุกรรมที่ยีน *MAPT^{R406W}* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ พบว่า ปริมาณของ lamin ภายในเซลล์ลดลง และยังกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser214 บนโปรตีน tau อีกด้วย ดังนั้น เมื่อวิเคราะห์กับผล MS แล้วพบว่า lamin-B2/tau/mTORC2 เป็นอีกหนึ่งโปรตีนที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (46)

ต่อมาทำการทดลองอีกครั้ง (n=2) เพื่อยืนยันผลการค้นหาและระบุโปรตีนในการทดลองครั้งแรก พบโปรตีนใน tau และ RICTOR IP จำนวน 21 และ 994 ชนิด ตามลำดับ พบโปรตีน 10 ชนิดที่ซ้อนทับกัน ดังแสดงในรูปที่ 34 และตารางที่ 2



รูปที่ 34 แสดงจำนวนโปรตีนที่พบใน Tau และ RICTOR IP ในการทดลองครั้งที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง 10 candidate proteins ที่ได้จาก Tau และ RICTOR IP

No.	Description	Accession No.
1	Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1 [OS=Homo sapiens]	Q92896
2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma [OS=Homo sapiens]	Q15102
3	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2 [OS=Homo sapiens]	Q7Z417
4	Tetratricopeptide repeat protein 14 [OS=Homo sapiens]	Q96N46
5	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 [OS=Homo sapiens]	Q9BVK6
6	Transmembrane emp24 domain-containing protein 4 [OS=Homo sapiens]	Q7Z7H5
7	Protein CASC3 [OS=Homo sapiens]	O15234
8	FACT complex subunit SPT16 [OS=Homo sapiens]	Q9Y5B9
9	ataxin-2-like protein [OS=Homo sapiens]	Q8WWM7
10	Zinc finger CCHC domain-containing protein 3 [OS=Homo sapiens]	Q9NUD5

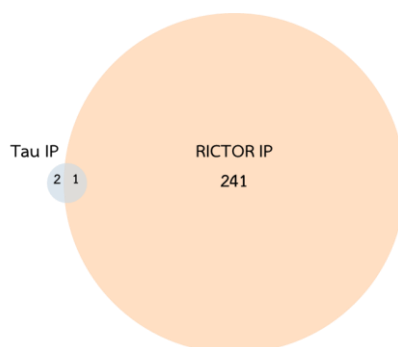
Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1

Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1 เป็นโปรตีนที่ถูกพบใน Golgi apparatus ซึ่งยังไม่มีการรายงานถึงโปรตีนนี้ว่าสัมพันธ์กับ tau กับ mTORC2 โดยตรง มีเพียงงานวิจัยที่กล่าวถึง Golgi apparatus แบบกว้าง ๆ เท่านั้นว่า การแสดงของโปรตีน Golgi apparatus ที่เปลี่ยนแปลงไป อาจก่อให้เกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติบนโปรตีน tau สังเกตได้จากขนาดของ Golgi apparatus และรูปร่างเซลล์ที่ใหญ่ขึ้นในโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรก (47) ในการทดลองในเซลล์ประสาทของหนู พบว่าโปรตีน tau สามารถจับกับเยื่อหุ้มของ Golgi apparatus ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นอกจากนี้การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน tau ใน primary hippocampal neurons มีผลทำให้เกิด golgi vesicle มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ (48) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานที่บ่งชี้ว่า Golgi apparatus มีความสัมพันธ์กับ mTORC2 แต่อย่างใด ดังนั้น จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค MS ความสัมพันธ์ของ Golgi apparatus/tau/mTORC2 นั้นอาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในกระบวนการขนส่ง vesicle และการกำจัดโปรตีนที่เป็นพิษภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์

Platelet-activating factor acetylhydrolase IB

Platelet-activating factor acetylhydrolase IB (PAFAH-IB) subunit gamma เป็น catalytic subunit ของ PAFAH โดยการตัดหมู่ acetyl group ออก มีหลักฐานมากมายเกี่ยวกับการทำงานของ PAFAH-IB subunit alpha ว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ประสาท ส่วน PAFAH-IB subunit beta และ subunit gamma มีหลักฐานว่าสามารถยับยั้ง wnt pathway ได้ (49) การกวดการแสดงออกของยีน PAFAH-IB subunit beta และ subunit gamma ในหนูทดลองที่เป็น PAFAH-IB subunit beta knockout สามารถลดการหลั่ง $A\beta$ ได้ แต่ในหนูที่เป็น PAFAH-IB subunit gamma knockout กลับไม่ได้ช่วยลดปริมาณ $A\beta$ ดังนั้น การกวดการแสดงออกของยีน PAFAH-IB subunit beta จึงอาจเป็นแนวทางสำคัญในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรกได้ (50)

สุดท้ายนำการทดลองทั้งสองครั้งมารวมกัน (n=3) และวิเคราะห์ผลอีกครั้งพบโปรตีนใน tau และ RICTOR IP จำนวน 2 และ 241 ชนิด ตามลำดับ เมื่อนำรายชื่อโปรตีนของทั้งสองกลุ่มข้อมูลมาซ้อนทับกัน พบโปรตีน 1 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 35 ได้แก่ Protein CASC3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ splicing ของ mRNA จากการค้นคว้าหาข้อมูล ยังไม่พบถึงความสัมพันธ์ของโปรตีนนี้กับ tau และ mTORC2 แต่อย่างใด แต่อาจเกี่ยวข้องกับ tau ที่ทำให้ tau เกิด alternative splicing ได้ 6 isoforms



รูปที่ 35 แสดงจำนวนโปรตีนที่พบใน Tau และ RICTOR IP ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง

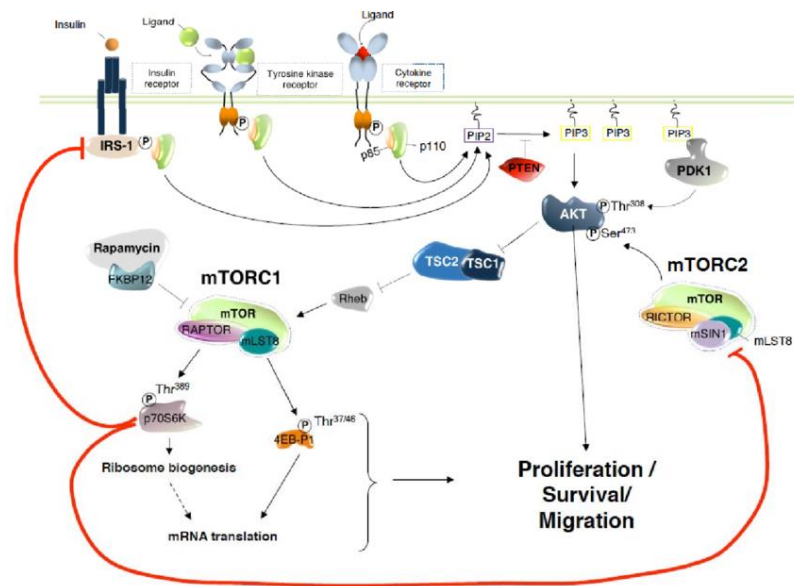


บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง mTORC2 กับการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติบนโปรตีน tau ในชั้นแรกนั้นผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเซลล์ SHSY-5Y ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อประสาท (neuroblastoma) เป็น model ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีน tau สูงกว่าเซลล์อื่น ๆ (10) อีกทั้งงานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้เซลล์นี้ในการศึกษาโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสามารถเปรียบเทียบผลการทดลองกับงานวิจัยอื่น ๆ ได้เพราะ model ที่ใช้ในการทดลองเป็น model ชนิดเดียวกัน อีกทั้งการศึกษาในเซลล์ผู้ป่วยที่ตายแล้ว หรือยังมีชีวิตอยู่นั้น ยังไม่เป็นที่ยอมรับ เนื่องจากยังไม่มีวิธีการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม อีกทั้งในปัจจุบันการตรวจหาโรคอัลไซเมอร์ยังไม่ชัดเจน ทำให้ผู้ป่วยบางรายไม่ทราบว่าตนเองเป็นโรค จึงไม่ได้เข้ารับการรักษาที่ถูกต้อง จากการทดลอง พบว่า SHSY-5Y เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากพบการแสดงออกของโปรตีน tau มาก เมื่อเทียบกับ U87-MG (glioblastoma) และ H4 (neuroglioma) และพบ band ที่เป็น isoform (น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 kDa) ของโปรตีน tau ที่ไม่พบเจอใน band ของโปรตีน tau ในเซลล์ U87-MG และ H4 แต่อย่างไรก็ตาม SHSY-5Y นั้นยังเป็นเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อประสาท ที่มีการ differentiation อยู่ตลอดเวลา ทำให้คุณสมบัติความเป็นเซลล์ลดลงตามอายุของเซลล์ (51)

ต่อมาทำการตรวจสอบการทำงานของโปรตีนด้วย western blot analysis ในสถานะที่มี mTOR inhibitor พบว่า rapamycin ที่ความเข้มข้นสูง เป็นสถานะที่สามารถเพิ่มการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ซึ่งในสถานะนี้เป็นสถานะที่ mTORC1 ถูกยับยั้งการทำงาน จึงอาจไปมีผลทำให้เกิดการควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) ซึ่งทำให้ IRS-1 ไม่ถูกยับยั้งการทำงาน (52) ดังแสดงกลไกในรูปที่ 36 มีผลทำให้กระตุ้นการทำงานของ mTORC2 ซึ่งมีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 สังเกตได้จาก band ที่เข้มข้น เมื่อเทียบกับสถานะกระตุ้น



รูปที่ 36 แสดงการควบคุมแบบย้อนกลับของ mTORC1 (52)

ตรงกันข้ามกับ AZD8055 ที่ความเข้มข้นสูง สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้ แต่ผลการทดลองที่บ่มเซลล์ด้วย rapamycin นี้ยังหาข้อสรุปไม่ได้ชัดเจน เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการทดลองในสภาวะเดียวกันคือ มีการบ่มเซลล์ด้วย rapamycin ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับงานวิจัยนี้ คือ 0.1, 1 และ 10 μM พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 μM สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 (53)

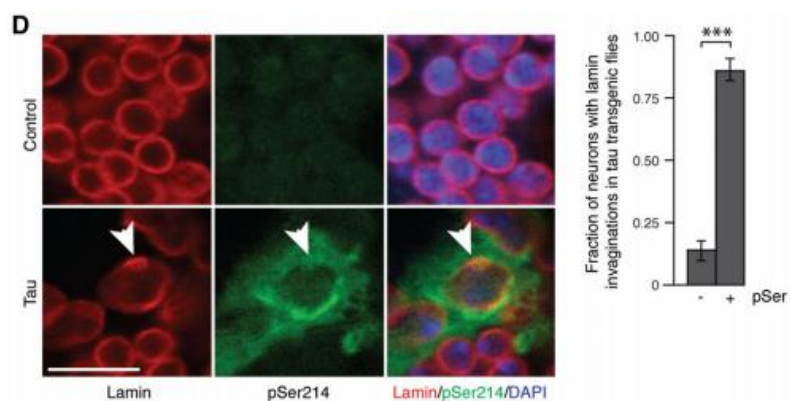
ส่วนของผลที่มีการบ่มเซลล์ด้วย okadaic acid (OA) สามารถเพิ่มการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้ และการบ่มเซลล์ด้วย OA ร่วมกับ rapamycin หรือ AZD8055 พบว่า สภาวะบ่มเซลล์ด้วย OA ร่วมกับ AZD8055 สามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้ ส่วนสภาวะบ่ม OA ร่วมกับ rapamycin กลับไม่แตกต่างจากสภาวะบ่มเซลล์ด้วย OA แสดงให้เห็นว่า mTORC2 มีบทบาทสำคัญในการช่วยลดการเติมหมู่ฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า สภาวะบ่มเซลล์ด้วย OA ร่วมกับ rapamycin นั้นสามารถลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 ได้ (53) ดังนั้น ผู้ทดลองจึงควรทำซ้ำใหม่อีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลอง แต่ในสภาวะบ่มเซลล์ด้วย OA ร่วมกับ AZD8055 นั้นเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ซึ่งยังไม่มีผู้วิจัยเคยทดลองมาก่อน จากทุกการทดลองที่มีการบ่มเซลล์ด้วย OA ผู้วิจัยสามารถสังเกตเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ว่า เซลล์มีการหดตัว ลักษณะความเป็นเซลล์ประสาทลดลง และปลาย dendrite และ axon หายไปแทนที่จะแผ่ขยาย กลับกลายเป็นรูปทรงรีหรือกลม มีรายงานว่า OA มีสามารถในการทำให้ในเซลล์ SHSY-5Y เป็นพิษจากการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติที่ตำแหน่ง Ser202 (54) จึงเป็นไปได้ที่เซลล์อาจได้รับความเครียดจากกลไกดังกล่าวจนทำให้เซลล์มีสัญญาณที่

เปลี่ยนไป และผลกระทบของ OA อีกประการหนึ่งคือ เหนี่ยวนำทำให้เซลล์ประสาทเข้าสู่ cell cycle re-entry โดยปกติแล้วเซลล์สมองซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญวัยจะไม่เกิดการแบ่งตัวอีก เนื่องจากขาดโปรตีนบางชนิดที่เหนี่ยวนำให้เข้าสู่ cell cycle เช่นนั้น เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มี OA กระตุ้นเซลล์จะเข้าสู่กระบวนการ apoptosis จึงเป็นสาเหตุอีกประการที่ทำให้เซลล์ที่ใช้ในการทดลองตายในปริมาณมาก (55) ในการวิจัยในอนาคตอาจพิจารณาการยับยั้ง PP2A ด้วยสารประกอบชนิดอื่น เนื่องจาก OA เป็น inhibitor ที่ทำงานแบบไม่จำเพาะ จึงเป็นไปได้ที่โปรตีนอีกหลาย ๆ ชนิดที่ได้รับผลกระทบจาก OA รวมไปถึงผลกระทบจากกระบวนการ apoptosis ที่อาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน โดยสรุปจากการทดลองที่ผ่านมาทั้งหมด แสดงให้เห็นแล้วว่า การยับยั้งการทำงานของ mTORC2 มีส่วนช่วยการลดการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน tau ในสภาวะที่มี OA ยับยั้งการทำงานของ PP2A

ส่วนผลการลดการแสดงออกของยีน RICTOR พบว่า ในการวิเคราะห์ผลด้วย western blot analysis ไม่ส่งผลใด ๆ กับการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 แต่ในผลการศึกษา localization พบว่าปริมาณของ pTau (Ser214) ลดลงอย่างสังเกตเห็นได้ชัดเจน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ทั้งการบ่มเซลล์ด้วย AZD8055 ภายใต้สภาวะที่เซลล์ถูกยับยั้ง PP2A ด้วย OA หรือการยับยั้งการแสดงออกของ RICTOR อาจมีผลต่อการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser214 บนโปรตีน tau

จากผลการทดลองทั้งหมดยังมีบางการทดลองที่ไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ RICTOR และ tau เพิ่มเติมโดยการตรวจสอบ localization ของ mTOR กับ tau พบว่า mTORC2 นั้นมีตำแหน่งซ้อนทับเดียวกับ tau อย่างชัดเจน หมายความว่าทั้ง mTOR/RICTOR/tau นั้นอาจมีความสัมพันธ์กันไม่ทางใดก็ทางหนึ่ง ต่อมาทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของ RICTOR และ tau ด้วยเทคนิค immunoprecipitation (IP) แล้วตรวจสอบประสิทธิภาพและปริมาณโปรตีนที่ได้จาก IP เทียบกับ ปริมาณ input ซึ่งเป็นสภาวะควบคุมเชิงบวก พบว่า โปรตีนทั้งสองไม่ได้จับกันโดยตรง แต่อาจมีโปรตีนตัวกลางมาจับกันเป็น complex จึงต้องทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองเพิ่มเติมด้วยเทคนิค mass spectrometry (MS) แล้วนำข้อมูลที่ได้จาก mass spectra มาค้นหาโปรตีนด้วย Proteome Discoverer™ Software แล้วทำการคัดเลือกโปรตีนที่สนใจ โดยตั้งเกณฑ์การคัดเลือก คือ สัดส่วนของ IP product และ negative control จะต้องมีความมากกว่า 10 เท่า ชั้นแรกผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพียง 1 ครั้ง พบโปรตีนทั้งหมด 50 ชนิด ผู้วิจัยจึงเลือกคัดเลือกโปรตีนที่น่าสนใจที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงร่างค้ำจุนของเซลล์ พบว่า gelsolin เป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์ระหว่างโรคอัลไซเมอร์มาก เนื่องจากมีการรายงานอย่างชัดเจนในงานวิจัยของ Farah และคณะ พบว่า gelsolin เป็น neuroprotective เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis มันจะถูกตัดจนกลายเป็น carboxyl-terminal fragment of gelsolin (gelsolin-CTF) ซึ่งเป็น marker สำคัญที่เกี่ยวข้องในการตรวจหาโรคอัลไซเมอร์ (38)

ส่วน lamin-B นั้นก็เป็นโปรตีนโครงร่างค้ำจุนเช่นกัน จากงานวิจัยของ Frost และคณะ ที่ศึกษา Ser214 บนโปรตีน tau พบว่า ปริมาณของ lamin-B ลดลงส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tau ที่ตำแหน่ง Ser214 (46) ดังแสดงในรูปที่ 37



รูปที่ 37 แสดงผลการทดลองจากงานวิจัยของ Frost และคณะ (46)

ต่อมาทำการทดลองเพิ่มอีก 2 ครั้ง เนื่องจากการ IP แล้วตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค MS นั้นมีความแปรปรวนสูงมาก ทำให้ได้โปรตีนหลาย ๆ ชนิดที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยได้คัดเลือกโปรตีนที่น่าสนใจ เช่น Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1 เป็นโปรตีนองค์ประกอบของ Golgi apparatus การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน tau ส่งผลทำให้ Golgi apparatus (48) มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ ส่วน Platelet-activating factor acetylhydrolase IB (PAFAH-IB) subunit gamma ก็ยังมีหลักฐานไม่ชัดเจนเนื่องจากการทดลองของ Page และคณะ ได้สรุปไว้ว่า การลดการแสดงออก PAFAH-IB subunit beta มีผลทำให้ปริมาณของ A β ลดลง ไม่ใช่ PAFAH-IB subunit beta (49)

หลังจากนั้นนำข้อมูลทั้ง 3 ครั้งมาวิเคราะห์อีกครั้ง เพื่อหาความสัมพันธ์ของโปรตีน tau และ mTORC2 พบ Protein CASC3 เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งไม่มีหลักฐานใด ๆ กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่าง Protein CASC3 กับ tau หรือ mTOR จากการวิเคราะห์ทั้งหมดแล้ว โปรตีนที่กล่าวมานั้นยังไม่มีหลักฐานโดยตรงเกี่ยวข้องความสัมพันธ์กับ tau และ mTORC2 โดยเฉพาะ mTORC2 เนื่องจากยังมีหลักฐานงานวิจัยน้อย งานวิจัยในอนาคตจึงจำเป็นต้องศึกษาโปรตีนชนิดนี้เพิ่มเติมต่อไป

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ทั้งหมดยังไม่มีการยืนยันว่า mTORC2 ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของเซลล์นั้นมีความสัมพันธ์อย่างไรกับโปรตีน tau ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์โดยตรง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีในการศึกษากลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในประเทศไทย

รายการอ้างอิง

1. Association As. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2017;13(4):325-73.
2. Gómez-Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*. 1996;16(14):4491-500.
3. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(4):329-44.
4. Šimić G, Babić Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, et al. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. *Biomolecules*. 2016;6(1):6.
5. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
6. Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*. 2017;341:112-53.
7. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer research*. 2010;70(1):288-98.
8. Oddo S. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2012;4:941.
9. Tang Z, Bereczki E, Zhang H, Wang S, Li C, Ji X, et al. Mammalian target of rapamycin (mTor) mediates tau protein dyshomeostasis implication for Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(22):15556-70.
10. Caillet-Boudin M-L, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B. Regulation of human MAPT gene expression. *Molecular neurodegeneration*. 2015;10(1):28.
11. Prince MJ. World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends: Alzheimer's Disease International; 2015.
12. Meenan S. Alzheimer's disease: AD. 2002.

13. Institute TL. Brain imaging for psychiatrists 2018 [Available from: <https://institute.progress.im/en/content/brain-imaging-psychiatrists>.
14. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of neural science: McGraw-hill New York; 2000.
15. Luna-Muñoz J, Harrington CR, Wischik CM, Flores-Rodríguez P, Avila Js, Zamudio SR, et al. Phosphorylation of tau protein associated as a protective mechanism in the presence of toxic, C-terminally truncated tau in Alzheimer's disease. Understanding Alzheimer's Disease: InTech; 2013.
16. Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. JAMA neurology. 2014;71(4):505-8.
17. Mandelkow E, Mandelkow E-M. Microtubules and microtubule-associated proteins. Current opinion in cell biology. 1995;7(1):72-81.
18. Roostalu J, Surrey T. Microtubule nucleation: beyond the template. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2017;18(11):702.
19. What is microtubule dynamic instability? [Internet]. Available from: <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-the-cytoskeleton/what-are-microtubules/what-microtubule-dynamic-instability/#ITEM-1214-0>.
20. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Rícný J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. International journal of Alzheimer's disease. 2012;2012.
21. Drewes G, Ebneth A, Mandelkow E-M. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. Trends in biochemical sciences. 1998;23(8):307-11.
22. Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and tau effects on cognitive impairments. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(17):13107-20.
23. Saci A, Cantley LC, Carpenter CL. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. Molecular cell. 2011;42(1):50-61.
24. Ksiezak-Reding H, Pyo HK, Feinstein B, Pasinetti GM. Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2003;1639(3):159-68.

25. Dunham WH, Mullin M, Gingras AC. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. *Proteomics*. 2012;12(10):1576-90.
26. Immunoprecipitation [Available from: www.proteinatlas.org.
27. Torrecilla J, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. *BioMed research international*. 2014;2014.
28. Lamming DW. Inhibition of the mechanistic target of rapamycin (mTOR)-rapamycin and beyond. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(5).
29. Madke B. Topical rapamycin (sirolimus) for facial angiofibromas. *Indian dermatology online journal*. 2013;4(1):54.
30. Kiely M, Kiely PA. PP2A: the wolf in sheep's clothing? *Cancers*. 2015;7(2):648-69.
31. Hoffman A, Taleski G, Sontag E. The protein serine/threonine phosphatases PP2 A, PP1 and calcineurin: A triple threat in the regulation of the neuronal cytoskeleton. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2017.
32. Li GH, Arora PD, Chen Y, McCulloch CA, Liu P. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Medicinal research reviews*. 2012;32(5):999-1025.
33. Yin H, Kwiatkowski D, Mole J, Cole FS. Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. *Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(8):5271-6.
34. Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *New England Journal of Medicine*. 1992;326(20):1335-41.
35. Harms C, Bösel J, Lautenschlager M, Harms U, Braun JS, Hörtnagl H, et al. Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2004;25(1):69-82.
36. Endres M, Fink K, Zhu J, Stagliano NE, Bondada V, Geddes JW, et al. Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(3):347-54.
37. Ji L, Chauhan A, Wegiel J, Essa MM, Chauhan V. Gelsolin is proteolytically cleaved in the brains of individuals with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2009;18(1):105-11.
38. Ji L, Zhao X, Hua Z. Potential therapeutic implications of gelsolin in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;44(1):13-25.

39. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular cell biology 4th edition. National Center for Biotechnology Information, Bookshelf. 2000.
40. Nie D, Chen Z, Ebrahimi-Fakhari D, Di Nardo A, Julich K, Robson VK, et al. The stress-induced Atf3-gelsolin cascade underlies dendritic spine deficits in neuronal models of tuberous sclerosis complex. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(30):10762-72.
41. Guo Y, Zhang H, Xing X, Wang L, Zhang J, Yan L, et al. Gelsolin regulates proliferation, apoptosis and invasion in natural killer/T-cell lymphoma cells. *Biology open*. 2018;7(1):bio027557.
42. Flanagan LA, Cunningham CC, Chen J, Prestwich GD, Kosik KS, Janmey PA. The structure of divalent cation-induced aggregates of PIP2 and their alteration by gelsolin and tau. *Biophysical journal*. 1997;73(3):1440-7.
43. Castanón MJ, Walko G, Winter L, Wiche G. Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochemistry and cell biology*. 2013;140(1):33-53.
44. Chen X-J, Xu H, Cooper HM, Liu Y. Cytoplasmic dynein: a key player in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Science China Life Sciences*. 2014;57(4):372-7.
45. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, et al. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & development*. 2008;22(7):832-53.
46. Frost B, Bardai FH, Feany MB. Lamin dysfunction mediates neurodegeneration in tauopathies. *Current Biology*. 2016;26(1):129-36.
47. Ishunina TA, Swaab DF. Increased expression of estrogen receptor α and β in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2001;22(3):417-26.
48. Farah CA, Perreault S, Liazoghli D, Desjardins M, Anton A, Lauzon M, et al. Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cytoskeleton*. 2006;63(11):710-24.
49. Livnat I, Finkelshtein D, Ghosh I, Arai H, Reiner O. PAF-AH catalytic subunits modulate the Wnt pathway in developing GABAergic neurons. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2010;4:19.

50. Page RM, Münch A, Horn T, Kuhn P-H, Colombo A, Reiner O, et al. Loss of PAFAH1B2 reduces amyloid- β generation by promoting the degradation of amyloid precursor protein C-terminal fragments. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(50):18204-14.
51. Cheung Y-T, Lau WK-W, Yu M-S, Lai CS-W, Yeung S-C, So K-F, et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 2009;30(1):127-35.
52. Fouqué A, Jean M, van de Weghe P, Legembre P. Review of PI3K/mTOR inhibitors entering clinical trials to treat triple negative breast cancers. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 2016;11(3):283-96.
53. Liu Y, Su Y, Wang J, Sun S, Wang T, Qiao X, et al. Rapamycin decreases tau phosphorylation at Ser214 through regulation of cAMP-dependent kinase. *Neurochemistry international*. 2013;62(4):458-67.
54. Zhang Z, Simpkins JW. Okadaic acid induces tau phosphorylation in SH-SY5Y cells in an estrogen-preventable manner. *Brain research*. 2010;1345:176-81.
55. Valdiglesias V, Laffon B, Pásaro E, Méndez J. Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011;13(6):1831-40.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ (ภาษาไทย): นายนราวิชญ์ พชรกุลนนท์
 ชื่อ (ภาษาอังกฤษ): Mr. Narawit Pacharakullanon
 ที่อยู่: 99/168 หมู่ 6 ตำบลสำโรง อำเภอบางบาล
 จังหวัดสมุทรปราการ 10130

เบอร์โทรศัพท์: 085-144-5152

E-mail: pa.narawit@gmail.com

ประวัติการศึกษา:

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2559-2560)

วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร (พ.ศ. 2555 - 2558)

ทุนการศึกษา:

ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อเฉลิมฉลองในโอกาสที่ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงเจริญพระชนมายุ 60 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2559 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่งานวิจัย:

เรื่อง “Investigation of mTOR complex 2 and Tau Interaction by Affinity Purification Mass Spectrometry” ในงาน The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology 2018 (BMB 2018) ระหว่างวันที่ 20-22 มิถุนายน 2561 จังหวัดระยอง