

การศึกษาคุณสมบัติของ Iduronate-2-Sulfatase ของผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรค Hunter: พยาธิกำเนิดทางชีวเคมีและโมเลกุล

Characterization of Iduronate-2-Sulfatase in Thai Patients with Hunter Syndrome: Biochemical and Molecular Pathogenesis

วรรัตน์ แชมป์พัฒนชัย^{1*}, รัตนา เจริญวัฒนาเสถียร¹, ลักขณา จิวสระ¹, ศิริพร กิริติจำเริญ¹, พรระณี สว่างอารีตระกูล¹, เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์^{1,2}, ดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล³, สุทธิพงษ์ บังคานนท์⁴, จุฬาลักษณ์ คุปตานนท์⁴, พรสวรรค์ วสันต์⁵, และ ชินนุสรณ์ สวัสดิวัตน์^{1**}

Voraratt Champattanachai^{1*}, Ratana Charoenwattanasatien¹, Lukana Ngisara¹, Siriporn Keeratchamroen¹, Phannee Sawangareetrakul¹, James R. Ketudat-Cairns^{1,2}, Duangurdee Wattanasirichaigoon³, Suthipong Pangkanon⁴, Chulaluck Kuptanon⁴, Pornswan Wasant⁵, and Jisnusun Svasti^{1**}

¹สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ 10210; ²สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000;

³คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400; ⁴สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี กรุงเทพฯ 10400;

⁵คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

¹Chulaborn Research Institute, Bangkok 10210; ²School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000; ³Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University 10400; ⁴Queen Sirikit National Institute of Child Health, Bangkok 10400; ⁵Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University Bangkok 10700

Corresponding author: *voraratt@cri.or.th; **jisnusun.sva@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

Mucopolysaccharoidosis ชนิดที่ 2 หรือ Hunter เป็นโรคพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อย บนโครโมโซมเพศหญิง โดยเกิดจากความบกพร่องของยีน *IDS* ที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ iduronate-2 sulfatase (IDS) ส่งผลให้เกิดการสะสมของ dermatan sulfate และ heparan sulfate ในไลโซโซม เมื่อมีการสะสมของสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นจะทำให้การทำงานของเซลล์และออร์แกนในร่างกายผิดปกติและทำให้เกิดอาการที่รุนแรงตามมา แม้ว่าโรคชนิดนี้พบได้น้อย แต่เด็กแรกเกิดและเด็กทารกที่ป่วยเป็นโรคนี้เป็นสิ่งที่มองข้ามไม่ได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์และคุณสมบัติของยีน *IDS* ที่ผ่าเหล่าที่พบในประเทศไทย ซึ่งพบว่าการผ่าเหล่าของยีน *IDS* จำนวน 23 ชนิด จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรค Hunter จำนวน 26 ราย โดยใช้เทคนิค direct DNA sequencing และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) พบว่าการผ่าเหล่าของยีน *IDS* จำนวน 11 ชนิด เป็นการผ่าเหล่าชนิดใหม่ (novel mutation) ที่ค้นพบครั้งแรกในผู้ป่วยคนไทย ซึ่งประกอบด้วย p.R101C, p.D148V, p.G224A, p.K227E, p.E254X, p.Q310X, p.W337X, p.Y348X, c.440_442delinsTT, p.R468P, and c.720_731delins TTTCAGATGTTCTCCCCAG นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการสร้างโปรตีนลูกผสม iduronate-2 sulfatase ของ wild type และ mutant (p.R88C, p.D148V, p.G224A, p.Y348X, p.R468P, and p.R468Q) เพื่อที่ใช้ศึกษา activity ของเอนไซม์และ protein processing ในเซลล์เพาะเลี้ยง COS-7 ซึ่งพบว่าไม่มี IDS activity ใน mutant ทุกชนิด และเมื่อใช้ human IDS antibody ในการตรวจ protein processing พบว่า wild type มี protein processing ของ IDS ที่มี precursor form (76 kDa) และ mature form (55 kDa) ส่วน mutant อื่นๆ จะพบเฉพาะ precursor form เท่านั้น ยกเว้น p.Y348X มี truncated form ที่ 50 kDa นอกจากนี้ mutant ทุกชนิดถูกนำมาสร้างโมเดลเพื่อใช้ทำนายโครงสร้างสามมิติของ IDS โดยใช้ human arylsulfatase เป็น template และพบว่า mutant ส่วนใหญ่ ยกเว้น p.D148V และ p.Y348X ปรากฏในตำแหน่งที่ใกล้กับ active site (Cys84) ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการผ่าเหล่าของยีนดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ protein processing และส่งผลให้การลดลง/ไม่มีของ IDS activity ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค hunter งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

ABSTRACT

Mucopolysaccharoidosis Type II or Hunter syndrome is an inherited X-linked recessive disorder caused by the deficiency of a *IDS* gene coding iduronate-2 sulfatase (IDS) which results in the lysosomal accumulation of dermatan sulfate and heparan sulfate. As this accumulation continues, it interferes with certain cells and organs in the body and leads to a number of serious symptoms. Although this disease is rare, the number of newborns and children suffering from Hunter syndrome is significant. We have investigated enzyme changes and characterized *IDS* mutants in Thailand. Here, we identified the molecular basis of MPS II in Thailand from 26 Thai patients with Hunter syndrome. A total of 23 different mutations were identified from patient blood samples by using direct DNA sequencing and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Eleven of these were novel and first discovered from Thai patients including p.R101C, p.D148V, p.G224A, p.K227E, p.E254X, p.Q310X, p.W337X, p.Y348X, c.440_442delinsTT, p.R468P, and c.720_731delins TTTCAGATGTTCTCCCCAG. In addition, we constructed the recombinant proteins of wild type and mutants which are severe phenotype (p.R88C, p.D148V, p.G224A, p.Y348X, p.R468P, and p.R468Q) to study enzyme activity and protein processing in COS-7 cells. All mutants had low or no activity compared to the wild type. Anti-human IDS was used to study the processing of IDS. The wild type showed both a precursor form (76 kDa) and a mature form (55 kDa), whereas all mutants revealed only the precursor form except p.Y348X which had a truncated form at 50 kDa. Moreover, all mutants were modeled into the predicted three dimensional models of IDS using human arylsulfatase as a template. Most of mutants except p.D148V and p.Y348X were located near the active site (Cys84). These results indicate that these severe mutants may, at least in part, alter the protein processing and consequently lead to a decrease or absence in IDS activity, causing Hunter disease. This work was supported by Chulaborn Research Institute, Thailand.

คำสำคัญ: โรค Hunter, iduronate-2-sulfatase, การผ่าเหล่า, protein processing, 3D-structure

Keywords: Hunter syndrome, iduronate-2-sulfatase, mutation, protein processing, 3D-structure