ABSTRACT

Project Code: RMU5080031

Project Title: Transthyretin and Amyloidosis: role of N- and C-termini of transthyretin on prevent fiber forming of the Alzheimer related amyloid protein

Investigators: Associate Professor Dr. Porntip Prapunpoj
Department of Biochemistry
Faculty of Science, Prince of Songkla University

Email Address: porntip.p@psu.ac.th

Project Period: June 2007 to June 2010

Keywords: Amyloid; C-terminus; Fibrillation; N-terminus; Protease; Retinol binding protein; Structure; Transthyretin

To elucidate the catalytic site and role of N- and C-terminal sequences on the proteolysis ability of TTR, the cDNAs coding for four chimeric TTRs i.e. croc/huTTR, hu/crocTTR, pigC/crocTTR and truncated crocTTR, were constructed in pPIC9 under the alcohol oxidase 1 (*AOX1*) promoter. The TTRs were successfully synthesized in *Pichia pastoris* and extracellulary secreted using α-factor mating signal sequence. Sequencing of the N-terminal segments confirmed correct processing of the α-factor signal sequence in pPIC9. These recombinant TTRs had the subunit masses ~15 kDa to ~17 kDa in range, and molecular weights of the tetramers were 50 kDa to 60 kDa in range, which are ~4 times of the subunit mass. In addition, all of them reacted to the antibodies raised against native TTRs. The influence of N- and C-terminal regions on the binding to human retinol binding protein (hRBP) was examined and more influence of the amino acid sequence in the N-terminal region was observed than in the C-terminal region. The proteolysis ability of chimeric TTRs were studied on casein and apolipoprotein A-I (apoA-I). All these chimeric TTRs specifically cleaved substrates with different catalytic rates from the TTR wild type. Amongst, pigC/crocTTR showed 3 to 8 folds higher in the catalysis, on both casein and apoA-I, than the other types including wild type. These experimental results clearly revealed the effect of N- and C-

terminal regions on this ability of TTR. To demonstrate ability to inhibit the cytoxicity induced by amyliod β (Aβ), human fibroblast cells were treated with Aβ. Cell viability and membrane integrity were determine by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction and lactate dehydrogenase (LDH) release assays, respectively. In the presence of chimeic TTR, cell viability and membrane integrity increased ~20% and 33%, respectively. These indicated to the ability of the chimeric TTR to protect cells from the toxicity induced by Aβ, and suggested to the possible use of the chimeric TTR as a therapeutic agent for AD in future

เพื่อให้ทราบถึงบริเวณ active site และบทบาทของโครงสร้างปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิลที่มีต่อความสามารถของ transthyretin (TTR) ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายโปรตีน ผู้วิจัยได้ทำการสร้าง cDNA สำหรับ chimeric TTR จำนวน 4 ชนิด คือ croc/huTTR, hu/crocTTR, pigC/crocTTR และ truncated crocTTR ขึ้นมา และนำเข้าสู่ เวคเตอร์ชนิด pPIC9 เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนในเซลล์ *Pichia pastoris* ภายใต้การควบคุมของ alcohol oxidase1 (*AOX1*) promoter ผลการทดลองพบว่าสามารถสังเคราะห์ TTR ดังกล่าวได้สำเร็จ และ TTR ถูกหลั่งออกนอกเซลล์ยีสต์ได้ โดยอาศัย α-factor mating signal sequence การวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนที่ปลายอะมิโนของ TTR ที่ถูกสร้างขึ้นยืนยันว่าการตัดชิ้นส่วนของ α-factor signal peptide ออก เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้อง Chimeric TTRs ที่สร้างขึ้นมานี้ มีน้ำหนักหน่วยย่อยอยู่ในช่วงประมาณ 15 ถึง 17 กิโลดาลตัน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4 เท่าของน้ำหนักหน่วยย่อย กล่าวคือมีน้ำหนักอยู่ในช่วงประมาณ 50 ถึง 60 กิโลดาลตัน อีกทั้งสามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี้ต่อ TTR ในธรรมชาติ จากการนำ chimeric TTRs มาใช้ในการศึกษาถึงอิทธิพลของโครงสร้างปลายทั้งสองของสายโพลีเปปไทด์หน่วยย่อย ที่มีต่อความสามารถในการเข้าจับกับ retinol binding protein (RBP) พบว่าโครงสร้างทางปลายอะมิโนส่งผลต่อความสามารถในการเข้าจับมากกว่าปลายคาร์บอกซิล นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ปลายทั้งสอง ยังส่งผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายโปรตีนของ TTR อีกด้วย โดย chimeric TTR ทุกชนิดนี้ สามารถสลายโมเลกุลของทั้ง casein และ apolipoprotein A-I (apoA-I) ได้อย่างจำเพาะ แต่มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจาก TTR ที่พบในธรรมชาติ และเมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่า

pigC/crocTTR มีอัตราเร็วของการเร่งปฏิกิริยาสูงกว่า chimeric TTR ชนิดอื่นรวมทั้ง TTR ในธรรมชาติประมาณ 3 ถึง 8 เท่า อีกทั้งจากการศึกษาผลการยับยั้งความเป็นพิษของ amyloid β (Aβ) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast) โดยการ incubate เซลล์กับ Aβ โดยมี chimeric TTR อยู่ด้วย และตรวจหาอัตราการมีชีวิตรอดและความสมบูรณ์ของผนังเซลล์โดยวิธี MTT reduction และ LDH release ตามลำดับ พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดมากกว่าเมื่อไม่มี TTR ถึงประมาณ 33% ชี้ให้เห็นถึงความสามารถของ chimeric TTR ในการป้องกันความเป็นพิษของ Aβ และประโยชน์การนำไปใช้เพื่อการรักษาในอนาคต