RESEARCH FINAL REPORT

on

Amyloid β degradation by the human cell expressing chimeric TTR

by

Associate Professor Dr. Porntip Prapunpoj

Department of Biochemistry, Faculty of Science
Prince of Songkla University

Verayuth Praphanphoj, MD.

The Medical Genetics Research Center
Rajanukul Institute

Dr. Ladda Leelawatwattana

Department of Biochemistry, Faculty of Science
Prince of Songkla University

Granted by

Thai Government Budget 2012-2013

ABSTRACT

Amyloid β peptide (Aβ) is associated and causative of several disorders. It is the major component of senile plaques found deposit in the brain and leptomenings of patients with Alzheimer's disease (AD). Aβ is generated from amyloid β precursor protein (APP) via the activity of two proteases, β- and γ-secretases. Overproduction of Aβ and/or the failure of clearance mechanisms, can lead to self-aggregate of Aβ into oligomers. Balancing of physiological Aβ level has been proposed as a strategy to reduce the accumulation of Aβ and slow down the progression of AD. Recently, transthyretin (TTR), a major distributor protein for thyroid hormone (TH) in human plasma was identified for its neuroprotective activity against Aβ toxicity. The chimeric TTRs with higher proteolytic activity than human native TTR were recent constructed and their potent to disrupt Aβ is partially under investigated *in vitro*. To reveal whether and how the protein could be used as therapeutic agents for AD in such a way of cell therapy, the chimeric TTR producing cell was constructed by using pCI-neo expression vector as the carrier for the TTR gene to be expressed in 3 types of human cells including neuroblast, fibroblast and lymphoblast. Based on RT-PCR and sandwich ELISA, the results showed that the chimeric TTR gene was successfully transfected into the human cells and the gene product was synthesized and extracellular secreted as a fully biologically active TTR. In comparison among cell types, neuroblast provided the highest synthesis level of the recombinant protein. The proteolytic activity of the recombinant TTR was confirmed by *in vitro* and *in situ* degradation of Aβ1-42.

เปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้า (Amyloid β peptide; Aβ) เกี่ยวข้องและเป็นสาเหตุของความผิดปกติหลายชนิด ทั้งเป็นองค์ประกอบหลักใน senile plaques ที่พบในสมองและเลปโตเมนิงจีส์ (leptomenings) ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้านี้เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนขนาดใหญ่คืออะไมลอยด์พรีเคอเซอร์โปรตีน (amyloid precursor protein) ด้วยเอนไซม์ เบต้าซีครีเทส (β-secretase) และแกมม่าซีครีเทส (γ-secretase) ตามลำดับ การมีระดับ

ของเปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้าที่สูงกว่าปกติเนื่องจากการมีการผลิตในปริมาณมากจนเกินไป (over-production) หรือจากความผิดปกติของระบบกำจัดเปปไทด์ดังกล่าวก็ตาม จะส่งผลทำให้เปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้าเกิดการเกาะกลุ่มเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ชนิดโอลิโกเมอร์ (oligomers) ได้ การควบคุมระดับของเปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้าให้อยู่ในระดับปกติ จึงเป็นวิธีการที่เชื่อว่าจะสามารถลดภาวะการคั่งของเปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้าและชะลอการดำเนินอาการของโรคอัลไซเมอร์ได้ เมื่อไม่นานนี้ มีการค้นพบว่าโปรตีนทรานไธรีติน (Transthyretin) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในการกระจายตัวของฮอร์โมนไธรอยด์ (thyroid hormone distributor) ในพลาสมานั้น มีความสามารถในการป้องกันเซลล์ประสาท (neurons) จากพิษของเปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้าได้ ทีมผู้วิจัยเองได้ทำการสร้าง chimeric transthyretin ขึ้นมา โดยโปรตีนทรานไธรีตินนี้ ที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการสลายได้สูงกว่าโปรตีนทรานไธรีตินในธรรมชาติ (native transthyretin) และอยู่ในระหว่างการศึกษาการสลายเปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้าแบบ *in vitro* ในการวิจัยครั้งนี้ทีมผู้วิจัย มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะให้ทราบถึงแนวโน้มในการนำ chimeric transthyretin นี้ไปใช้เพื่อการรักษาโดยแนววิธีการ cell therapy โดยได้ทำการทดลองสร้างเซลล์จากมนุษย์ที่สามารถสังเคราะห์ chimeric transthyretin ขึ้นมา โดยใช้เวคเตอร์ pCI-neo เป็นตัวพายีนของ chimeric transthyretin เข้าสู่เซลล์จากมนุษย์ 3 ชนิด คือ neuroblast, fibroblast และ lymphoblast ซึ่งเมื่ออาศัยเทคนิค RT-PCR และ sandwich ELISA วิเคราะห์ พบว่า สามารถนำยีนดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ทั้ง 3 ชนิดได้ และยีนดังกล่าวมีการแสดงออกและได้ผลผลิตเป็นทรานไธรีตินที่มีความสมบูรณ์ทางชีวภาพ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณทรานไธรีตินที่ได้จาก TTR producing cell ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว พบว่า neuroblast ให้ผลผลิตที่สูงที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษาทั้งแบบ *in vitro* และ *in situ* สามารถยืนยันได้ว่าทราบไธรีตินที่สังเคราะห์จากเซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายเปปไทด์อะมัยลอยด์บีต้า ชนิด 1-42 (Aβ1-42) ได้