การยับยั้งการแสดงออกของยีนดีเอสซีอาร์วันโดยเอสไออาร์เอ็นเอในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผู้ป่วยดาวน์ซินโดรม

นางสาว ณัชมน สกุลเดชไพบูลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DSCR1 GENE SILENCING BY siRNA IN FIBROBLAST CELLS FROM PATIENTS WITH DOWN SYNDROME

Miss Natchamon Sakundejpaiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492158

Thesis Title	DSCR1 GENE SILENCING BY siRNA IN FIBROBLAST CELLS FROM PATIENTS WITH DOWN SYNDROME
By	Miss Natchamon Sakundejpaiboon
Field of Study	Genetics
Thesis Advisor	Associated Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Verayuth Praphanphoj, M.D.

Accepted by the Genetics, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of the the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associated Professor Preeda Boon-Long, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associated Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Verayuth Praphanphoj, M.D.)

..... Member

(Associated Professor Mukda Kuhirun)

..... Member

(Teerada Wangsomboondee, Ph.D.)

ณัชมน สกุลเดชไพบูลย์ : การยับยั้งการทำงานของยีนดีเอสซีอาร์วันโดยใช้เอสไออาร์เอ็นเอในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผู้ป่วยดาว์นซินโดรม (*DSCR1* gene silencing by siRNA in fibroblast cells from patient with Down Syndrome) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นพ. วีรยุทธ ประพันธ์พจน์, 104 หน้า

ยีน *DSCR1 (Down Syndrome Critical Region 1 gene)* เป็นยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และการจดจำ โดยในสมองของทารกผู้ป่วยดาว์นซินโดรมจะมีการแสดงออกที่มากเกินปกติ (over-expression) ซึ่งยีน *DSCR1* ในผู้ป่วยจะ translate เป็นโปรตีน calcipressin ที่มากสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่มีส่วนสำคัญในการเรียนรู้และการจดจำ ที่เรียกว่า calcineurin ได้ ดังนั้นหากยับยั้งการทำงานของ *DSCR1* ก็อาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีการเรียนรู้และจดจำที่เป็นปกติได้ เทคนิค RNAi (RNA interfering technology) เป็นกระบวนการยังยั้งการทำงานของยีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ปัจจุบันจึงได้ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีนต่างๆ โดยกุญแจสำคัญของกระบวนการนี้คือ siRNA (small interference RNA) ซึ่งมีลำดับเบสที่ complementary กับ mRNA ของยีนเป้าหมาย โดยจะเกิดการจับและทำลาย mRNA เป้าหมายนี้ ส่งผลให้ยีนไม่สามารถทำหน้าที่ต่อไปได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ เพื่อศึกษาถึงผลของ siRNA ต่อการยับยั้งการทำงานของยีน *DSCR1* ที่มีมากเกินปกติในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผู้ป่วย โดยศึกษาการแสดงออกของยีน *DSCR1* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากคนปกติและผู้ป่วย ทั้งในระดับmRNAและโปรตีน โดยวิธี real time PCR และ western blot ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน คู่กับเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย siRNA ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ พบว่า ในคนปกติ siRNA ทุกระดับ (t test, Pr=0.61, 0.5626 and 0.3947) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ mRNA จากยีน *DSCR1* เนื่องจากระยะเวลาที่นานเกินไปในการเพาะเลี้ยงเซลล์ในเพียงพอต่อการสกัด mRNA ซึ่งเมื่อติดตามอัตราการรับ siRNA สู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยการติดยีนเรืองแสงของ RFP (Red Fluorescent Protein) เข้ากับ vector ของ siRNA พบว่า siRNA จะอยู่ภายในเซลล์ได้ในภายในระยะ 5 วันเท่านั้น เนื่องด้วยข้อจำกัดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีการเจริญช้า จึงทำให้ไม่สามารถทำการสกัดและวัดปริมาณ mRNA ได้ในระยะเวลา 5วันได้ ส่วนการทดลองในเซลล์ของผู้ป่วยนั้นพบว่าการแสดงออกของ mRNA ที่การ treat ด้วย siRNA ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า และ 1 เท่า (t test, Pr=0.0203 and 0.0054) มีการทำงานของยีน *DSCR1* มากเกินกว่าปกติ ส่วนผลของ siRNA ที่ความเข้มข้น 1.5 เท่าต่อเซลล์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในระดับของ mRNA (t test, Pr=0.0627) ถึงแม้ว่า siRNA จะไม่สามารถใช้ยับยั้งการทำงานของยีนในระยะยาวได้ เนื่องจากข้อจำกัดของเซลล์ แต่สามารถทำให้ทราบถึง ผลระยะยาวของ siRNA ต่อการทำงานของยีน *DSCR1* ในเซลล์ ไฟโบรบลาต์ ในผู้ป่วย ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาผลของ siRNA ต่อไปได้

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ณัชมน สกุลเดชไพบูลย์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2549 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

467 2540023 : MAJOR GENETICS

KEYWORD : DSCR1 / siRNA

NATCHAMON SAKUNDEJPAIBOON: DSCR1 GENE SILENCING BY siRNA IN FIBROBLAST CELLS FROM PATEINT WITH DOWN SYNDROME. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: VERAYUTH PRAPANPOJ MD; 104 pp.

DSCR1 (Down Syndrome Critical Region 1) is overexpressed in fetal Down Syndrome (DS) brain. *DSCR1* belongs to a highly conserved calcineurin inhibitor family called calcipressin. *DSCR1* can bind to and inhibit calcineurin, a protein important for learning and memory. Small interfering RNA (siRNA) molecules are the key intermediaries in post-transcriptional gene silencing which when exogenously administered can inhibit the expression of any given target gene. Since *DSCR1* is overexpressed in DS fetal brain, it's possible that normalizing *DSCR1* expression may restore normal brain function in DS individual. The goal of this study is to inhibit *DSCR1* gene in fibroblast cells by siRNA. The comparison result of mRNA (by real time PCR) and protein (by western blot) gene expression between untreated and treated with 3 concentrations of siRNAs in control and case samples indicated that siRNAs did not affect to mRNA level of *DSCR1* gene in control samples (t test, Pr=0.61, 0.5626 and 0.3947) due to the long period of post-transfection. The RFP (Red Florescent Protein) gene was cloned into siRNA plasmid vector to indicate the uptake rate and siRNA efficiency. RFP signal was shown that siRNAs were effectively within 5 days of post-transfection but the limitation of cell lines growth could not collect cell within 5 days. The Result of siRNA effect in case samples indicated that siRNA concentration 0.5 fold and 1 fold increased *DSCR1* mRNA level (t test, Pr=0.0203 and 0.0054). By the way, the result of 1.5 fold of siRNAs in case samples indicated that siRNAs at high concentration could not affect to mRNA level of *DSCR1* (t test, Pr=0.0627). Nevertheless, siRNA could not decrease the *DSCR1* expression in fibroblast cell but interestingly, the siRNA effect on DS cell line might lead to understand siRNA actions on fibroblast cell in long term effect.

Department of Botany

Field of study Genetics

Academic year 2006

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I really would like to express my gratitude to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indebted to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul and my co-advisor, Dr. Verayuth Pranphanphoj for their help, interest, suggest all the time I have worked on this thesis. I also thanks to other committee members, Assoc. Prof. Dr. Preeda Boon-Long, Assoc. Prof. Mukda Kuhirun, and Dr. Teerada Wangsomboondee for their helpful suggestion and corrections during my study.

I am so grateful to my colleagues, Miss Watchareeporn Sakonvittayanon, Miss Mattana Maungklom, Miss Woratai Maiseekhow, Miss Sukanya Meesa, Miss Rootjanat Manisi, and Mr. Chalurmphol Srichomthong for their helps. I would like to thank, Mr. Thanatorn Pipatpallop, Mr. Sawang Kaykaw, and Miss Wipa Suwannachairop who give me an encouragement. I would like to thank Mr. Thanyapath Wanichanon, Miss Suratsawadee Ausawarat for their suggestions.

Finally, I would like to thank my family for their love, optimistic suggestions and belief in me which brought me today's success.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)....iv

Abstract (English)....v

ACKNOWLEDGEMENTS....vi

TABLE OF CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....x

LIST OF FIGURES....xii

LIST OF ABBREVIATION....xiii

CHAPTER I INTRODUCTION....1

1.1 Background and Rationale....1

1.2 Research Questions....3

1.3 Objectives....3

1.4 Hypothesis....3

1.5 Conceptual Framework....4

1.6 Methodologies....5

1.7 Limitation....5

1.8 Expected Benefit....5

CHAPTER II REVIEW OF RELATED LITERATURES....7

2.1 Down syndrome....7

2.2 *DSCR1* gene structure and function....12

2.3 RNAi/siRNA technology....15

2.4 Relative quantification....23

Page

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....27
3.1 Research Instruments.....27
3.2 Reagents.....30
3.3 Cell line and cell culture.....33
3.4 siRNA designing and cloning.....34
3.5 siRNA transfection into fibroblast cell lines.....41
3.6 Selection of transfected cell lines.....42
3.7 Uptake rate of siRNA into cell lines.....43
3.8 RNA extranction.....46
3.9 DNase-I treatment.....47
3.10 Reverse transcription.....47
3.11 RT-PCR.....49
3.12 Quantitative realtime-PCR.....50
3.13 Agarose gel electrophoresis.....53
3.14 Protein extraction.....53
3.15 Protein assay.....54
3.16 Calcineurin activity assay.....54
3.17 Western blot.....55
3.18 Coomasie blue gel staining.....57

CHAPTER IV RESULTS.....58
4.1 RT-PCR.....58
4.2 Realtime RT-PCR.....58
4.2.1 No significant differences among 10 normal control samples.....58
4.2.2 Gene expression using five control samples as calibrators.....60
4.2.3 DSCR1 gene expression in case samples are less than control samples.....67
4.2.4 siRNAs did not affect on control samples.....68
4.2.5 siRNAs affected on case samples at 0.5 and 1 fold but did not affect at 1.5 fold.....70
4.2.6 Effect of siRNA with DSCR1 gene expression at 0.5 fold is higher than 1 fold in case samples.....71
4.3 siRNA designing and cloning.....72
4.4 Selection of transfected cell lines.....73

Page

4.5 Uptake rate of siRNA into cell lines.....73
4.6 Coomasie blue gel staining 75
4.7 Western blot 76

CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION.....77

REFERENCES.....85

APPENDICES.....96

BIBLIOGRAPHY.....104

LIST OF TABLE

Table		Page
1	siRNA sequence as down stream primer construct	36
2	Component for siRNA amplification	37
3	PCR condition	37
4	Component for ligation	38
5	Plasmid DNA and lipofectamine2000 concentration	42
6	Conditions for selection of stable transfectants	43
7	Primer sets for RFP cloning	44
8	Reaction components for PCR	44
9	Reaction component for digestion	45
10	Reaction components for ligation	45
11	Components for RNA-Primer combination and denaturation	48
12	Components for reverse transcription	48
13	Components for RT-PCR	49
14	RT-PCR condition	50
15	Probe-primer mixture preparation	50
16	Genes, primer sets and probes for quantitative real-time PCR	51
17	Multiplexed-PCR components	52
18	Multiplexed PCR condition	52
19	The average c_t of *GAPDH* and *DSCR1*	59
20	Statistic calculation of standard derivative of 10 controls sample	60
21	The average c_t of *GAPDH* and *DSCR1*	61
22	The normalized target gene expression level in normal control and case samples	67
23	ANOVA calculation with controls and case sample groups	68
24	T tests between untreated control samples group and treated with siRNA 0.5 folds in control samples group	69
25	T tests between untreated control samples group and treated with siRNA 1 folds in control samples group	69
26	T tests between untreated control samples group and treated with siRNA 1.5 folds in control samples group	69

LIST OF TABLE (continue)

Table Page

27 T tests between untreated case samples group and treated with

siRNA 0.5 folds in case samples group.....70

28 T tests between untreated case samples group and treated with

siRNA 1 folds in case samples group.....71

29 T tests between untreated case samples group and treated with

siRNA 1.5 folds in case samples group.....71

30 T tests between treated with 0.5 folds in cases sample group and treated with

siRNA 1 folds in cases sample group.....71

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	*DSCR1* gene structure	13
2	Calcineurin pathway	14
3	Anatomy of a synthetic siRNA duplex	17
4	The RNAi/siRNA pathway for gene silencing	18
5	Current model for RISC complex in *Drosophila*	19
6	The miRNA biogenesis pathway in vertebrate cells	21
7	Overview of the siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning Systems procedure	23
8	Amplification plots	24
9	Conventional and duplex RT-PCR from normal and case cDNA samples	58
10	Normal controls *DSCR1* gene expression	60
11	Normal controls gene expression compare with cases gene expression	68
12	Untreated controls gene expression compare with treated controls gene expression	70
13	Untreated cases gene expression compare with treated cases gene expression	72
14	The 300 bp PCR product of siRNA and U6 promoter	73
15	The 700 bp PCR product of RFP gene	74
16	Uptake rate of treated cells with siRNA 0.5x fold	74
17	Uptake rate of treated cells with siRNA 1x fold	75
18	Uptake rate of treated cells with siRNA 1.5x fold	75
19	The coomasie gel staining	76
20	The ~22 KDa of *DSCR1* protein was detected in untreated 5 controls sample	76
21	The ~22 KDa of *DSCR1* protein was detected in untreated 10 cases sample	77
22	The ~22 KDa of *DSCR1* protein was detected in treated 5 controls sample	77
23	The ~22 KDa of *DSCR1* protein was detected in treated 8 cases sample	77

LIST OF ABBREVIATIONS

DS	=	Down syndrome
DSCR1	=	Down syndrome critical region 1
RNAi	=	RNA interference
siRNA	=	small interfering RNA
shRNA	=	short hairpin RNA
RT-PCR	=	Reverse transcriptase polymerase chain reaction