

INHIBITION OF α -GLOBIN GENE EXPRESSION BY RNAi

ORAWAN SARAKUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-5655-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การยับยั้งการแสดงออกของอัลฟาโกลบินยีนด้วยอาร์เอ็นเอไอ (INHIBITION OF α -GLOBIN GENE EXPRESSION BY RNAi)

อรรวรรณ สาระกุล 4537287 MTMT/M

วท.ม.(เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์, Ph.D.(Biochemistry),

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D. (Biochemistry), สุทัศน์ ฟูเจริญ, M.D.

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นภาวะโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินทำให้การสังเคราะห์สายโกลบินสายใดสายหนึ่งลดลงหรือไม่มีการสังเคราะห์เลย การรักษาโรคธาลัสซีเมียมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นการสร้างหรือลดการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงเพื่อให้เพียงพอต่อการนำออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกาย เบต้าธาลัสซีเมียเป็นภาวะที่มีการลดลงของสายเบต้าโกลบินทำให้มีสายอัลฟาโกลบินที่ไม่มีคู่เหลือและตกตะกอน ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงง่ายต่อการถูกทำลาย ดังนั้นการลดการสร้างสายอัลฟาโกลบินอาจทำให้ความรุนแรงของภาวะการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง

ในการศึกษานี้ อัลฟาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอถูกทำให้ลดลงด้วยเทคนิค RNAi โดยศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในหลอดทดลอง ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ pronormoblast เซลล์จำนวน 1×10^6 เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มี siRNA ที่จำเพาะต่อ อัลฟาโกลบิน หลังจาก 48 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงในภาวะที่มี siRNA ปริมาณ 1.0 ไมโครกรัม มีการลดระดับของอัลฟาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะที่ไม่มี siRNA และที่ 96 ชั่วโมง เซลล์ที่เลี้ยงในภาวะที่มี siRNA มีจำนวนเซลล์ที่มีฮีโมโกลบินน้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะที่ไม่มี siRNA

จากการศึกษานี้แสดงว่า siRNA สามารถลดปริมาณของอัลฟาโกลบินเอ็มอาร์เอ็นเอได้ และอาจใช้เป็นตัวอย่งเพื่อศึกษาเซลล์อัลฟาธาลัสซีเมียและประยุกต์ใช้เพื่อลดการสร้างสายอัลฟาโกลบินในเบต้าธาลัสซีเมียเพื่อลดความรุนแรงของโรคที่มีสาเหตุจากสายอัลฟาโกลบินที่ไม่มีคู่ได้ต่อไป

INHIBITION OF α -GLOBIN GENE EXPRESSION BY RNAI
ORAWAN SARAKUL 4537287 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: PHANTIP VATTANAVIBOON, Ph.D.(BIOCHEMISTRY),
PRAPON WILAIRAT, Ph.D.(BIOCHEMISTRY), SUTHAT FUCHAROEN, M.D.

ABSTRACT

Thalassemia is a hereditary blood disorder. Mutations in the globin genes lead to reduced hemoglobin production. The aim of thalassemia treatment is to induce adequate erythrocyte production or reduce cell destruction to the level that is enough to transport oxygen throughout the body. β -Thalassemia is a subtype of thalassemic diseases caused by reduction of β -globin chain production, which gives rise to unmatched α -globin chains that precipitate and results in shorter red cell life-span. Thus, reduction of the unmatched α -globin chains may reduce the severity of pathology of the red cells

In this study, RNAi, a tool for degradation of target mRNAs by siRNA, was used to study its inhibitory effect on α -globin mRNA level. Lipofectamine containing 1.0 μ g of α -globin specific siRNA targeted to α -globin mRNA was transfected into 1×10^6 normal erythroid precursor cells (ECFCs) *in vitro*. At 48 hours after transfection α -globin mRNA levels were analyzed by reverse-transcription and real-time PCR. The results showed a significant lowering in the level of α -globin mRNAs ($p < 0.05$), whereas the level of β -globin mRNAs was not affected. A significant decrease in the number of hemoglobin positive cells as detected by benzidine staining at 96 hours (day 10) after transfection compared to the control cells ($p < 0.05$) supported the observation on depletion of α -globin mRNA level.

RNAi inhibition of α -globin mRNA expression by α -globin siRNA could be used as a model for the study of α -thalassemia pathology and may also be applied in the future to reduce α -globin chain production in β -thalassemia, thereby ameliorating the severity of pathology caused by unpaired α -globin chains.

KEY WORDS: RNAi / siRNA / Thalassemia / α -Globin gene

86 P. ISBN 974-04-5655-3