29 OCT 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

MOLECULAR CLONING OF A cDNA ENCODING A POTENTIAL EFFECTOR OF THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE

JANTIPA JOBSRI

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-2212-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
ว35ม
2002

Copyright by Mahidol University

4237019 MBMG/M : MAJOR : MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
KEY WORD : MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE, Ire1p, DIFFERNTIALY DISPLAY PCR, CLONING

JANTIPA JOBSRI : MOLECULAR CLONING OF A cDNA ENCODING A POTENTIAL EFFECTOR OF THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. THESIS ADVISORS : WITOON TIRASOPHON, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., 84 p. ISBN 974-04-2212-8.

Accumulation of unfolded protein in the endoplasmic reticulum (ER) activates the unfolded protein response (UPR) pathway to enhance protein folding efficiency in this organelle. The pathway directly causes transcriptional activation of UPR responsive genes. An unconventional splicing of *HAC1* mRNA mediated by Ire1p is a landmark of the UPR pathway. This study aims to identify a novel RNA that served as a substrate for this splicing in mammalian cells.

RNA interacted with hIre1αp was isolated by co-immunoprecipitation. The RNA was reverse transcribed to complementary DNA and displayed by random PCR. From 52 pairs of primers screening, one PCR fragment was identified as the product from RNA co-precipitated with hIre1αp containing cytoplasmic domain. Nucleotide sequence analysis of this fragment reveals that it is identical to the hypothetical gene product FLJ23251. Preliminary characterization of this gene by northern blot analysis in several cell lines has been unable to detect its expression either in stress or non-stress condition. Therefore, the significance of this mRNA in mammalian UPR remains to be uncovered.

Copyright by Mahidol University

4237019 MBMG/M : สาขาวิชา : อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ; วท.ม.
(อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

จันทร์ทิภา จบศรี : การโคลนชิ้น cDNA ต้นแบบของโมเลกุลที่ทำงานใน unfolded protein response pathway ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (MOLECULAR CLONING OF A cDNA ENCODING A POTENTIAL EFFECTOR OF THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิฑูรย์ ถิระโสภณ, Ph.D., วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D. 84 หน้า ISBN 974-04-2212-8.

การสะสมของ unfolded protein อยู่ภายใน ER กระตุ้น unfolded protein response pathway เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ protein folding ภายใน ER โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนต่างๆที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดใน ER ขั้นตอนสำคัญที่ควบคุม pathway นี้คือ splicing reaction ของ *HAC1* mRNA โดยการทำงานของ Ire1p การวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะค้นหา RNA ที่เป็น substrate ของปฏิกิริยาดังกล่าวในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

RNA ที่ทำปฏิกิริยากับ hIre1αp ถูกแยกออกจากส่วนประกอบอื่นๆในเซลล์โดยวิธี co-immunoprecipitation จากนั้น RNA จะถูกแยกออกมาแล้วเปลี่ยนเป็น complementary DNA โดยวิธี reverse transcription จากนั้น cDNA ถูกเพิ่มจำนวนและวิเคราะห์โดยวิธี random PCR จากการทำ PCR ด้วย primer จำนวน 52 คู่ พบว่ามี PCR product 1 ชิ้นที่มาจาก RNA ซึ่งตกตะกอนร่วมกับ hIre1αp ที่มี cytoplasmic domain จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นโคลนพบว่าเหมือนกับ FLJ23251 hypothetical protein และจากการทำ northern hybridiation ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ RNA ของ FLJ23251 ในเซลล์ชนิดต่างๆ เนื่องจากการศึกษานี้ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ของโปรตีน FLJ23251 ใน unfolded protein response pathway ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ จึงควรจะมีการศึกษาถึงบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวต่อไป

Copyright by Mahidol University