การใช้ Antisense Morpholino Oligonucleotides ในการแก้ไขการตัดต่อยีน *BTK* ที่ผิดปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Bruton agammaglobulinemia

นางสาว ณัฐากรณ์ รัตนชาติณรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5074771830

USE OF ANTISENSE MORPHOLINO OLIGONUCLEOTIDES IN CORRECTION OF A NOVEL SPLICING DEFECT OF THE *BTK* GENE CAUSING BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA

Miss Natthakorn Rattanachartnarong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

512085

Thesis Title	USE OF ANTISENSE MORPHOLINO OLIGONUCLEOTIDES IN CORRECTION OF A NOVEL SPLICING DEFECT OF THE *BTK* GENE CAUSING BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA
By	Miss Natthakorn Rattanachartnarong
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Kanya Suphapeetiporn,M.D. Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Medicine
(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Advisor
(Professor Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

..... Co-Advisor
(Assistant Professor Kanya Suphapeetiporn,M.D., Ph.D.)

..... Eaminer
(Associate Professor Pantipa Chatchatee, M.D.)

..... External Member
(Tassalapa Daengsuwan, M.D.)

ณัฐากรณ์ รัตนชาติณรงค์: การใช้ Antisense Morpholino Oligonucleotides ในการแก้ไขการตัดต่อยีน *BTK* ที่ผิดปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Bruton agammaglobulinemia (USE OF ANTISENSE MORPHOLINO OLIGONUCLEOTIDES IN CORRECTION OF A NOVEL SPLICING DEFECT OF THE *BTK* GENE CAUSING BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.พญ.ดร.กัญญา ศุภปีติพร, 57 หน้า

X-linked agammaglobulinemia (XLA) เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งถ่ายทอดทางพันธุกรรมในลักษณะยีนด้อยบนโครโมโซม X ส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบหลั่งสาร (humoral response) เพื่อต่อสู้กับเชื้อโรคที่เข้ามาในร่างกายได้ สาเหตุของโรคเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *Bruton tyrosine kinase* (*BTK*) การทดลองนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย 6 ราย พบการกลายพันธุ์ของยีน *BTK* ในผู้ป่วย 5 ราย ซึ่งแบ่งออกเป็นการกลายพันธุ์ในยีน *BTK* ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน 3 รายและการกลายพันธุ์ที่มีการรายงานแล้ว 2 ราย หนึ่งในผู้ป่วย XLA ที่พบการกลายพันธุ์ใหม่เป็นชนิด point mutation ใน intron 3 ของยีน *BTK* (c.240+109 C>A) เกิดการตัดต่อของยีนผิดปกติ (splicing defect) ทำให้สร้าง messenger RNA (mRNA) ที่ผิดปกติ คือ มีนิวคลิโอไทด์เบสจำนวน 106 base pairs เพิ่มเข้าไป ระหว่าง exon ที่ 3 และ 4 ซึ่งส่งผลให้เกิด frameshift ขึ้นในลำดับเบส การศึกษาเพื่อแก้ไข splicing defect โดยการนำสาร Antisense Morpholino Oligonucleotides (AMOs) ใส่เข้าไปในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากเลือดของผู้ป่วยที่นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าทำให้เซลล์ของผู้ป่วยสามารถสร้าง mRNA ของยีน *BTK* ที่ถูกต้องได้ โดยการทำให้ส่วนนิวคลิโอไทด์เบสของ intron หายไป นอกจากนั้นยังศึกษาถึงผลของการใช้ AMOs ที่ใส่เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์เม็ดเลือดขาวในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ใช้คือ 10 μM ของ AMOs สามารถพบ mRNA ที่ปกติได้ และ mRNA ของยีน *BTK* ที่ปกตินี้สามารถอยู่ได้ถึง 30 วันหลังการให้ AMOs การนำเทคนิค AMOs มาใช้เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์เพื่อการรักษาผู้ป่วยโรค XLA หรือผู้ป่วยโรคอื่นๆที่มีลักษณะการ splice ของยีนที่ผิดปกติเช่นนี้ได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5074771830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: X-LINKED AGAMMAGLOBULINEMIA/ BRUTON'S TYROSINE KINASE/ MUTATION/ ANTISENSE MORPHOLINO OLIGONUCLEOTIDES/ PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

NATTHAKORN RATTANACHARTNARONG: USE OF ANTISENSE MORPHOLINO OLIGONUCLEOTIDES IN CORRECTION OF A NOVEL SPLICING DEFECT OF THE *BTK* GENE CAUSING BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA. ADVISOR: PROF. VORASUK SHOTELERSUK, M.D., CO-ADVISER: ASST. PROF. KANYA SUPHAPEETIPORN, M.D., Ph.D., 57 pp.

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is an inherited primary humoral immunodeficiency characterized by a profound deficiency of all immunoglobulins, mature B cells and plasma cells. XLA is caused by mutations in the *Bruton tyrosine kinase* (*BTK*) gene. We studied six patients with clinically diagnosed XLA. Five *BTK* mutations were identified; three of which were novel and two were known mutations. One of them was an intronic point mutation, a C>A mutation in intron 3 of the *BTK* gene (c.240+109 C>A). Interestingly, its pathogenicity was evidenced by the presence of aberrant splicing of *BTK* mRNA, in which there was a 106-bp insertion between exons 3 and 4 resulting in a frameshift. Treatment of cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the patient with this splicing defect with Antisense Morpholino Oligonucleotides (AMOs) complementary to the mutation splice site sequence was performed. The AMOs were able to restore correctly spliced mRNA in the patient's PBMCs. Using various concentrations of AMOs, the minimal level with maximal effect in correcting aberrant splicing of the *BTK* gene in the patient's PBMCs was about 10 μM. The products of correctly spliced mRNA persisted for up to 30 days after AMOs administration. This approach in which AMOs are used to restore correct splicing of the target gene may be applicable to other splicing mutations and is of potential clinical interest.

Field of study Medical Science

Academic year 2008

Student's Signature: Natthakorn Rattanachartnarong

Advisor's Signature: Vorasuk Shotelersuk

Co-Advisor's Signature: Kanya Suphapeetiporn

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and appreciation to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indepted to my advisor, Prof. Vorasuk Shotelersuk for his continuous support, encouragement and invaluable knowledge he gave to me during the M.Sc. program. Without his suggestions and constant guidance, I could not get through this whole thesis. Special respect and thanks are also extended to Assist.Prof. Kanya Suphapeetiporn for her help, interest, suggestions and her genuine assist for all of paper work I have wrote.

Besides my advisors, I would like to greatly express my heartfelt thanks to the rest of my thesis committee, Prof. Dr. Apiwat Mutirangura, Asso.Prof. Pantipa Chatchatree and Dr. Tassalapa Dangsuwan for their helpful suggestions and corrections during my study.

Special thanks go to Miss Siraprapa Thongkorbpetch, Mr. Chalurmpon Srichomgthong and all of our laboratory members for their help and support from the beginning I walked in this laboratory to the end I finished my work. Especially, all of graceful friendship and lessons they give me.

I also thank P'Oly for teaching me techniques of cell culture and Allergy and Clinical Immunology Division, Dept. of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their help, excellent idea and collaboration. This work was supported by Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Chulalongkorn University and Childrenhospital for sending the blood samples of all Bruton aggamaglobulinemia patients.

Thank you for all patients especially Pondanai Wankaew who delicate all value blood samples for this research.

Last, but not least, I thank my family: my parents for giving me life in the first place, for their love which encourage my life every single moment.Thank you so much.

The institutional grant from Research Unit and Ratchadapiseksompotch fund are gratefully acknowledged.

This work was supported by Chulalongkorn University.

CONTENTS

Page

Abstract (Thai)……iv

Abstract (English)……v

Acknowledgment……vi

Contents……vii

List of Tables……viii

List of Figures……ix

List of Abbreviations……xi

Chapter

I. Introduction……1

II. Background and Related Literatures……6

III. Methodology……18

IV. Results……30

V. Discussion and Conclusion……37

References……40

Appendices……43

Biography……47

LIST OF TABLE

Table		Page
1	Overview of potential therapeutic targets for AMOs and other splice-switching oligonucleotides (SSOs).....	15,16
2	Primers for entire coding region of the *BTK* gene and PCR products.	24
2.1	Mixture of PCR reactions for entire coding region of the *BTK* gene...	25
2.2	PCR cycle and condition for entire coding region of the *BTK* gene...	25
3	Primers for the *BTK* gene insertion in intron 3 and PCR products.....	25
3.1	Mixture of PCR reactions the *BTK* gene insertion in intron 3 and PCR products.....	26
3.2	PCR cycle and condition the *BTK* gene insertion in intron 3 and PCR products.....	26
4	Nucleotide sequence of target AMOs and control AMOs.....	29
5	Conclusion of mRNA and gDNA mutation analysis in the *BTK* gene	32

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Schematic representation of the structures of *Bruton's tyrosine kinase*.....	1
2	The schematic illustration of B-cell development.....	6
3	X-linked recessive genetic trait from a healthy woman who is carrier	8
4	X-linked recessive genetic trait from a man with the syndrome who is a carrier.....	9
5	Domain organisations of Bruton tyrosine kinases.....	10
6	The percentage of *BTK* mutation is presented for X-linked agammaglobulinemia.....	13
7	Types of splicing mutations and correction with AMOs.....	14
8	Molecular structure of DNA and AMOs.....	14
9	Applications of splice-switching oligonucleotides.....	16
10	Probable Endo-Porter mechanism.....	17
11	Structure of AMOs.....	28
12	Annealing of the target AMOs to the splice site mutation of *BTK* intron 3 in patient's pre-mRNA and Schematic representation of *BTK* regions around the pseudoexons within and without AMOs targeted..	28
13	Direct sequencing of the *BTK* gene in patient 1:cDNA level.....-	30
14	Direct sequencing of the *BTK* gene in patient 2:cDNA level.....	30
15	Direct sequencing of the *BTK* gene in patient 3:cDNA level.....	31
16	Direct sequencing of the *BTK* gene in patient 4:cDNA level.....	31
17	Direct sequencing of the *BTK* gene in patient 5 :cDNA level.....	32
18	Schematic representation of *BTK* coding region with the pseudoexon.	32
19	The results of the RT-PCR analysis using target primers are shown along with schematic representation of the transcripts obtained.....	33

20	Correction of aberrant splicing of *BTK* mRNA in PBMCs after AMOs administration.....	33
21	The result of using 10-60 μM dose of the target AMOs effect on aberrant splicing correction.....	34
22	The result of using 2 and 5 μM dose of the target AMOs effect on aberrant splicing correction.....	35
23	To test the duration of the target AMOs	35
24	Specificity of AMOs.....	36
25	Consensus sequences around 5' splice sites, 3' splice sites, branch point and its surrounding nucleotides in vertebrate pre-mRNAs.....	37

LIST OF ABBREVIATIONS

XLA	=	X-linked (Bruton's) agammaglobulinemia
BTK	=	Bruton's tyrosine kinase
PBMCs	=	Peripheral blood mononuclear cells
AMOs	=	Antisense Morpholino oligonucleotides
Ig	=	Immunoglobilin
IVIG	=	Intravenous immunoglobilin