(ภาษาไทย) 206779

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย มิวเตชั่นของ β-globin gene ที่ให้เกิดการตัดต่ออาร์เอ็นเอผิดปกติ (abnormal pre-mRNA splicing) ที่พบบ่อยในคนไทย ได้แก่มิวเตชั่นใน IVSII ตำแหน่งที่ 654 ($\beta^{IVSII-654}$) และ β^{E} ซึ่งมิวเตชั่นเหล่านี้ไปกระตุ้น cryptic splice site ที่อยู่ใกล้เคียงทำให้เกิด mRNA ที่ตัดต่อผิดปกติ ในขณะที่ตำแหน่ง splice site เดิมยังสามารถทำงานได้ปกติ ยีนผิดปกติเหล่านี้จะสร้าง β-globin chain ลดลงหรือสร้างไม่ได้ ถ้าสามารถสกัดกั้น (block) abnormal splicing ที่เกิดขึ้นจะทำให้กระบวนการ ตัดต่อ RNA ปกติเกิดขึ้น และสร้าง β-globin chain ได้ดังเดิม การศึกษานี้ใช้ antisense oligonucleotide (ASO) เพื่อไปแก้ไขกระบวนการตัดต่อ RNA ผิดปกติที่เป็นสาเหตุของโรค β-thalassemia

การศึกษานี้ได้ทดสอบ ASO 3 ชนิด คือ morpholino, 2'-0-MOE phosphorothioate (MOE) และ peptide nucleic acid (PNA) พบว่า ASO เหล่านี้สามารถทำให้เกิดกระบวนการตัดต่อ RNA ปกติได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของหนูธาลัสซีเมีย $\beta^{IVSII-654}$ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ ASO ให้เข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น จึงนำ ASO มาเชื่อมต่อกับ cell penetrating peptide ชนิดต่าง ๆ พบว่า morpholino ASO ชนิด M-tat, P003(2d), $(RX)_8B$, $(RB)_7RXB$ และ $(RB)_8B$ สามารถทำให้เกิด correct β-globin mRNA มากกว่า 90 % ที่ความเข้มข้น 15 μM เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ morpholino oligonucleotide ที่ไม่ได้เชื่อมต่อกับ cell penetrating peptide ที่สามารถทำให้เกิด correct mRNA น้อยกว่า 5 % เมื่อให้ M-tat กับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิด $\beta^{IVSII-654}$/Hb E พบว่าเซลล์สามารถสร้าง β-globin mRNA ที่ถูกต้อง และสร้างเป็นสาย β-globin ที่สามารถรวมกับสาย α-globin เกิดเป็น Hb A ได้ ทำการฉีด M-tat ที่ความเข้มข้น 25 mg/kg/day เป็นเวลา 13 วัน ให้หนูธาลัสซีเมีย $\beta^{IVSII-654}$ พบว่าสามารถสร้าง correct β-globin mRNA และสร้างเป็นสาย β-globin ที่สามารถรวมกับสาย α-globin ของหนูเกิดเป็น chimeric hemoglobin ได้ ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะที่ดีขึ้น

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของการเกิด correctly และ aberrantly spliced β^{E}-globin mRNA ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และ reticulocyte จากเลือดของผู้ป่วย β-thalassemia/Hb E พบว่าอัตราส่วนระหว่าง correctly/aberrantly spliced β^{E}-globin mRNA ของผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคน้อยมีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมากแสดงให้เห็นว่าการ splicing ของ β^{E}-globin pre-mRNA เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค

Thalassemia is one of the most common genetic diseases in the Thailand. Mutation induced aberrant splicing, one of the important molecular mechanisms of the defect in β-globin gene expression, that prevalent in Thai population are $\beta^{IVSII-654}$ and β^{E}. These mutations activate aberrant splice sites, leading to abnormal spliced mRNA which prevents proper translation, decreasing the levels of β-globin and in consequence leading to thalassemia. Blocking the aberrant splice sites the β-globin pre-mRNA forces the splicing machinery to reselect the existing correct splice sites. This led to restoration of the correct splicing pattern of β-globin pre-mRNA and production of β-globin chain. This study tries to correct the abnormal splicing process that leads to β-thalassemia, by using antisense oligonucleotide (ASO).

Three type of ASO backbone, morpholino, 2'-O-MOE phosphorothioate (MOE) and peptide nucleic acid (PNA), were studied. All 3 ASO can restore correct β-globin pre-mRNA splicing. Cell penetrating peptides were conjugated with ASO to improve the uptake and antisense effects of the ASO in erythroid cells. More than 90% correction of pre-mRNA splicing resulted by free uptake of 15 μM peptide-conjugated morpholino oligonucleotides, M-tat, P003(2d), $(RX)_8B$, $(RB)_7RXB$ and $(RB)_8B$ for 5 days. While less than 5% correction resulted from treatment with unconjugated morpholino ASO. The M-tat was used for treatment of erythroid progenitor cells from the peripheral blood of $\beta^{IVSII-654}$/Hb E thalassemic patients. The results clearly show that free uptake of M-tat resulted in significant repair of the β-globin mRNA and concomitant production of hemoglobin A. Intravenous injection of 25 mg/kg/day M-tat for 13 days, led to an increase in correctly spliced β-globin mRNA and accumulation of chimeric hemoglobin in the peripheral blood of the $\beta^{IVSII-654}$ thalassemic mice. Moreover, the red blood cells morphology also improved.

This study also examined the effect of correctly and aberrantly spliced β^{E}-globin mRNA in erythroid progenitor and peripheral blood of β-thalassemia/Hb E patients. The results showed that correctly/aberrantly spliced β^{E}-globin mRNA ratio in patients who have mild clinical symptom was higher than that of patients who have severe clinical symptom. Indicating that β^{E}-globin pre-mRNA splicing is one of the factors affecting severity of β-thalassemia/Hb E disease.