

อภิธาน์นทาการ



สำนักหอสมุด



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ๒๕๕๗

เรื่อง บทบาทและหน้าที่ของ Nck ต่อการเกิด T cell receptor signaling
สัญญาเลขที่ R2557B029

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตร	
วันลงทะเบียน.....	14 ก.ย. 2558
เลขทะเบียน.....	16899770
เลขเรียกหนังสือ.....	ว ๑๙

1๑5
.8
.12
กษมร
๒๕๕๗

โดย รศ.พญ.ดร.สุราทิพย์ พงษ์เจริญ
คณะแพทยศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี ๒๕๕๗
เจ้าหน้าที่งานวิจัยคณะแพทยศาสตร์ ที่ได้ช่วยเหลือด้านเทคนิคในห้องปฏิบัติการและอำนวยความสะดวกด้านการวิจัยและเอกสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง



สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	4
Abstract	4
บทนำ	5
วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	13
ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ	13
เอกสารอ้างอิง	14
Manuscript	20



บทคัดย่อ

T cell ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่ปรับได้ต่อการกำจัดเชื้อโรค โดยการจดจำและสามารถจับแอนติเจนที่มาจากจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้อย่างจำเพาะ ทั้งนี้เนื่องจาก T cell มีการแสดงออกของโมเลกุลตัวรับบนผิวเซลล์ คือ T cell receptor (TCR)-CD3 complex ซึ่งจดจำและจับกับ peptide antigen ที่ถูกนำเสนอผ่านโมเลกุลของ major histocompatibility complex บนผิวของ antigen presenting cells ก่อให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เพื่อให้ T cell ตอบสนองในการเกิด adaptive immunity ได้ โมเลกุล TCR-CD3 complex ประกอบด้วยส่วนประกอบย่อยสองส่วนคือ ligand binding subunit ประกอบด้วย $TCR\alpha\beta$ heterodimer และ signaling transduction subunits ประกอบด้วยโมเลกุล CD3 ซึ่ง จะเกิด phosphorylation ที่จำเป็นในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ โมเลกุล Nck ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโยงการส่งสัญญาณที่มีการวิจัยรายงานว่าทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น TCR แต่การทำหน้าที่ของโมเลกุลนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดโดยเฉพาะในการส่งสัญญาณของ TCR ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด phosphorylation จนกระทั่งการหลั่งสาร interleukin (IL)-2 ที่จำเป็นต่อการทำหน้าที่ของ T cell งานวิจัยนี้พบว่าโมเลกุล Nck ทำหน้าที่ผ่านการกระตุ้นโมเลกุล Erk ซึ่งทำให้มีการหลั่ง IL-2 และจะเป็นพื้นฐานไปสู่การศึกษาในเชิงลึกถึงกลไกการกระตุ้น T cell ที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำหน้าที่ของเอนไซม์ในปฏิกิริยา phosphorylation และความรู้ในด้านการควบคุมการกระตุ้น T cell ในภาวะต่าง ๆ เช่น โรคที่เกิดจากการทำหน้าที่ของ T cell

คำสำคัญของโครงการวิจัย: TCR, T cell activation, T cell signaling, Nck

Abstract

T cells play a pivotal role in adaptive immune system. T cells can recognize antigenic peptide specifically because they express T cell receptor (TCR)-CD3 complex. This complex specifically binds to peptide antigen presented by major histocompatibility complex on the surface of antigen presenting cells. Appropriate binding of TCR and peptide-bound MHC leads to intracellular signaling into the T cell. TCR complex is composed of 2 subunits: the first subunit is the ligand binding subunit comprising $TCR\alpha\beta$ heterodimer and the second subunit is the signaling transduction subunits composed of CD3 subunits that are phosphorylated that is needed for intracellular signaling. Nck molecules act to link signaling molecules during T cell activation. However, how Nck functions in T cell signaling particularly when being involved with phosphorylation that leads to production of interleukin (IL)-2 is not fully understood. This work showed that Nck molecules are involved in phosphorylation of Erk associated with IL-2 production. This knowledge serves as a basis for further study in mechanism of T cell activation in terms of phosphorylation of kinases and control of T cell stimulation, which would be useful for future approach in diseases involving in abnormal T cell function.

คำสำคัญของโครงการวิจัย: TCR, T cell activation, T cell signaling, Nck

บทนำ

T cells ทำหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) ต่อการกำจัดเชื้อโรค โดย T cell สามารถจดจำและสามารถจับ antigen peptide ได้อย่างจำเพาะ ทั้งนี้เนื่องจาก T cell มีการแสดงออกของโมเลกุลเชิงซ้อนของตัวรับบนผิวเซลล์ (T cell receptor-CD3 complex, TCR-CD3 complex) ซึ่งจะมีหน้าที่จดจำและจับกับ peptide antigen ที่ถูกนำเสนอผ่านโมเลกุลของ major histocompatibility complex (MHC) บนผิวของ antigen presenting cells (APC) หากการจับกันของ TCR กับ peptide-bound MHC (pMHC) มีค่า affinity เพียงพอจะทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เพื่อให้ T cell มีการตอบสนอง อาทิ การเพิ่มจำนวนของ T cells (proliferation), การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation), และการหลั่ง cytokine และ growth factor ต่างๆ (Choudhuri *et al*, 2005) แต่อย่างไรก็ตามการที่ TCR จับกับ pMHC ที่ภายนอกเซลล์แล้วสามารถส่งสัญญาณผ่าน plasma membrane เข้าสู่เซลล์ (เรียกกระบวนการนี้ว่า TCR triggering) จนนำไปสู่การแสดงออกของยีนนั้นๆยังไม่เป็นที่เข้าใจ นอกจากนี้ T cells มีการตอบสนองที่แตกต่างกันได้แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ antigen peptide เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และ T cells ยังสามารถถูกกระตุ้นด้วย antigen peptide ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง ซึ่งเชื่อว่าส่วนประกอบของ TCR complex นี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ T cell มีความยืดหยุ่นในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง antigen peptide และที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังกล่าว

TCR complex ประกอบด้วย 2 subunits คือ ligand binding subunit และ signaling transduction subunits โดย ligand binding subunit คือ $TCR\alpha\beta$ heterodimer ที่เชื่อม (associate) แบบ non-covalently กับ signaling transduction subunits คือ $CD3\epsilon\gamma$, $CD3\epsilon\delta$ และ $CD3\zeta\zeta$ (Malissen, 2003; Werlen *et al*, 2002) บริเวณ cytoplasmic tail ของ CD3 มี motif สำหรับ tyrosine phosphorylation (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs) ใช้ในการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เพื่อให้มีการแสดงออกของเซลล์ต่อไป (Reth M, 1989) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนชุดของแต่ละ subunit ต่อ TCR-CD3 complex (stoichiometry) และ จำนวนของ ligand-binding $TCR\alpha\beta$ ต่อ TCR-CD3 complex (TCR valency) ยังมีการถกเถียงกันอย่างต่อเนื่อง ในช่วงแรกได้เสนอว่ามี 1 $TCR\alpha\beta$ ต่อ 1 complex (monovalent TCR) (Punt *et al*, 1994) แต่หลังจากนั้นมีรายงานที่ขัดแย้งว่าใน 1 complex มี 2 $TCR\alpha\beta$ (divalent TCR) หรือมากกว่านั้น (multivalent TCR) (Fernandez-Minguel *et al*, 1999; San Jose *et al*, 1998) และเมื่อไม่นานมานี้ Schamel และคณะได้พิสูจน์ว่าแท้จริงแล้ว T cells มีการแสดงออกร่วมกันทั้ง monovalent TCR และ multivalent TCR โดย multivalent TCR จะทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อ low antigen concentration ในขณะที่ monovalent TCR จะตอบสนองต่อ high antigen concentration (Schamel *et al*, 2005) นอกจากนี้ ในงานวิจัยเดียวกันยังพบว่าการทำลาย cholesterol บน plasma

membrane ด้วย M β CD ทำให้เหลือเพียง monovalent TCR เท่านั้น จึงเชื่อว่า multivalent TCR อยู่ในบริเวณ cholesterol-rich region (lipid raft) บนผิวของ T cells (Schamel *et al*, 2005)

การที่ TCR จับกับ peptide antigen แล้วทำให้ CD3 สามารถส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ได้นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจเนื่องจากทั้งสอง subunits นี้ไม่ได้เชื่อมกันโดยตรง จึงได้มีการเสนอกฎต่างๆ เพื่อใช้อธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าว หนึ่งในกลไกที่สำคัญคือ conformational change model (review ใน Choudhuri *et al*, 2007) ในปี 1998 มีนักวิจัยพบว่าในภาวะที่ไม่ถูก phosphorylation โมเลกุลของ CD3 ζ มีโครงสร้างเป็น α -helix แต่เมื่อเกิด phosphorylation แล้วจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น β -sheet (Laczko *et al*, 1998) หลังจากนั้น Aivazian และคณะ และ Xu และคณะ พบว่าในภาวะที่มี acidic lipid บริเวณ cytoplasmic tail ของ CD3 ϵ และ CD3 ζ จะ interact อยู่กับ lipid เพื่อป้องกันการเกิด phosphorylation แต่ในทางตรงกันข้ามในภาวะที่มี zwitterionic lipid พบว่า cytoplasmic tail ของ CD3 ϵ และ CD3 ζ สามารถเกิดการ phosphorylation ได้ (Aivazian *et al*, 2000; Xu *et al*, 2008) หลักฐานสำคัญที่สนับสนุนการเกิด conformational change ก็คือการศึกษาพบว่าเมื่อ T cell ถูกกระตุ้นจะมีการเผยออกของ proline-rich region (PRR) ขึ้นที่ cytoplasmic tail ของ CD3 ϵ ทำให้ไปดึงโมเลกุลของ Nck มาจับกับ PRR ดังกล่าวได้ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นก่อนและไม่อาศัย tyrosine phosphorylation (Gil *et al*, 2002)

กลไกการตอบสนองของ TCR ต่อ แอนติเจนที่มากกระตุ้นนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม หลังจากที่ T cell ถูกกระตุ้น ต้องอาศัย CD3 subunit ในการส่งสัญญาณเข้ามาภายใน T cell เนื่องจาก CD3 subunit มีส่วนของ cytoplasmic tail ที่ยาวเข้ามาภายใน T cell และมีตำแหน่งที่เกิด tyrosine phosphorylation เรียกว่า immune receptor tyrosine-based activation motif (ITAMs) เป็นผลให้เกิดการกระตุ้นโมเลกุลอื่นๆ ใน T cell ต่อไป ทั้งนี้การตอบสนองต่อแอนติเจนของ T cell นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนที่มากกระตุ้น ได้แก่ strong agonist คือ แอนติเจนที่กระตุ้น T cell ให้เกิดการตอบสนองได้อย่างสมบูรณ์, partial agonist คือ แอนติเจนที่สามารถกระตุ้นให้ T cell เกิดการตอบสนองได้เพียงบางส่วน และ antagonist คือ แอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้น T cell ให้เกิดการตอบสนองได้เลย

Nck (Noncatalytic region of tyrosine kinase) คือ adaptor protein ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณต่างๆ ภายใน T cell โครงสร้างของ Nck ประกอบด้วย src homology 3 domain (SH3) และ src homology 2 domain (SH2) โดย SH3 domain มีความสามารถในการจับกับโปรตีนเป้าหมายที่มี proline-rich sequence ในขณะที่ SH2 domain จับกับโปรตีนที่เกิด tyrosine phosphorylation (Li, W. *et al*, 2001) ผู้วิจัยเองพบว่า การมีโมเลกุล Nck มีความสำคัญต่อการกระตุ้น T cell เมื่อตัวกระตุ้นเป็น anti-CD3 และ anti-CD28 antibodies (Yiemwattana *et al*, 2012) จากการศึกษาที่ผ่านมา เมื่อทำการกระตุ้น TCR-CD3 complex ด้วย monoclonal antibody ต่อ CD3-epsilon (anti-CD3 ϵ mAb) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (conformational change) ที่ CD3-epsilon subunit ทำให้ส่วน cytoplasmic tail เผยส่วนที่เป็น proline-rich sequence (PRS) ออกมา เป็นผลให้ Nck ซึ่งเป็น adaptor protein ภายใน T cell มาจับได้ และเกิดการส่งสัญญาณภายใน T cell ต่อไป โดยเหตุการณ์นี้สามารถเกิดขึ้นได้ก่อนที่จะเกิด tyrosine phosphorylation ที่ CD3 subunits (Gil *et al*, 2002)

และมีรายงานพบว่าเมื่อกระตุ้น T cell ที่มีตำแหน่ง PRS ของ CD3-epsilon เกิดการ mutated ไปด้วย staphylococcal enterotoxin B และ anti-CD3 mAb ซึ่งเป็น strong agonist ต่อการกระตุ้น T cell การตอบสนองของ T cell ยังคงปกติ แสดงให้เห็นว่า การจับกันระหว่าง PRS ของ CD3-epsilon กับ Nck อาจไม่จำเป็นสำหรับ T cell development และ T cell activation (Szymczak et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานเปรียบเทียบผลการกระตุ้น T cells เมื่อใช้ตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน คือ strong agonist และ partial agonist ใน T cell ที่ยังไม่เคยได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนมาก่อน (naïve T cell) และ T cell ที่เคยได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนมาแล้ว (differentiated T cells) พบว่าการเกิด conformational change ที่ CD3-epsilon และเศษส่วนที่เป็น PRS เพื่อให้ Nck มาจับนั้น สามารถเกิดขึ้นได้ใน T cell ทั้ง 2 ชนิด เมื่อกระตุ้นด้วย strong agonist ในขณะที่ partial agonist กระตุ้นให้ เกิดได้เพียงใน differentiated T cell แสดงให้เห็นว่าความแรงของตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันมีผลต่อการตอบสนองของ T cell และการตอบสนองต่อ partial agonist ใน differentiated T cell นั้น อาจผิดปกติได้เมื่อส่วนของ PRS ใน CD3-epsilon เกิด mutation แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง PRS of CD3-epsilon น่าจะมีบทบาทช่วยเพิ่มสัญญาณของ TCR ในการตอบสนองต่อ partial agonist (Tailor et al., 2008).

บทบาทหน้าที่ของการจับกันระหว่าง PRS และ Nck ที่แท้จริงนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากรายงานที่ผ่านมา เชื่อว่าน่าจะเป็นเหตุการณ์แรกๆ ของการเกิด T cell activation ดังนั้นปัญหาของงานวิจัยฉบับนี้ จึงมุ่งศึกษาการทำงานของ Nck ที่บริเวณ PRS ของ cytoplasmic tail ของ CD3-epsilon ใน T cell ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้นที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบผลการตอบสนองของ T cell ใน T cell ปกติ และ T cell ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของ Nck ไป รวมทั้งความสำคัญของแต่ละ domain ของ Nck ต่อการตอบสนองของ T cell

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาว่าเมื่อกระตุ้น T cell ด้วยแอนติเจนที่มีคุณสมบัติเป็น strong และ partail agonist นั้น T cell มีการตอบสนองต่างกันอย่างไร ทั้งในสภาวะ T cell ปกติ และ T cell ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของ Nck
2. เพื่อศึกษาความสำคัญในแต่ละ domain ของ Nck ในการตอบสนองของ T cell เมื่อถูกกระตุ้น

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนและวิธีการศึกษาได้แบ่งออกเป็นข้อๆ ดังนี้

1. การสังเคราะห์ Nck-shRNA plasmids

ลำดับเบสของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ สำหรับ Nck shRNA ออกแบบโดยใช้โปรแกรม RNAi design และ Blast program โดยกำหนดให้ปลายทั้งสองด้านมีรอยตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ EcoRI และ BamHI ดังแสดงในตาราง

Nck1

BamHI half site		Target sense strand	Loop	Target anti-sense strand	Terminator	MluI half site	EcoRI half site
5'GATCC	G	GGGTCTCTGTCAGAGAAA	TTCAAGAGA	TTTCTCTGACAGAGAACCC	TTTTTT	ACGCGT	G.....3'
3'	C	CCCAAGAGACAGTCTCTTT	AAGTTCTCT	AAAGAGACTGTCTCTGGG	AAAAAA	TGCGCA	CTTAA5'
G							

Nck2

BamHI half site		Target sense strand	Loop	Target anti-sense strand	Terminator	MluI half site	EcoRI half site
5'GATCC	G	CTTAAAGCGTCAGGGAAGA	TTCAAGAGA	TCTCCCTGACGCTTTAAG	TTTTTT	ACGCGT	G.....3'
3'	C	GAATTCGAGTCCCTTCT	AAGTTCTCT	AGAAGGGACTGCGAAATTC	AAAAAA	TGCGCA	CTTAA5'
G							

ทำการตัด pLVX-shRNA1 vector (clontech) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ BamHI และ EcoRI ดังแสดงในตาราง

	สาร	ปริมาณ (μl)
1	BamHI	1
2	EcoRI	1
3	10X K buffer	2
4	1 μg of pLVX-shRNA1 vector (500ng/μl)	2
5	Nuclease free water	15
Total		20

ทำการเชื่อม annealed Nck oligonucleotide เข้ากับ vector

	สาร	ปริมาณ (μl)
1	Digested-pLVX-Nck1 shRNA1 vector (50ng/μl)	1
2	Diluted annealed oligonucleotides (0.5 μM)	1
3	10X T4 DNA ligase buffer	1.5
4	Nuclease-free H ₂ O	10.5
5	T4 DNA ligase	1
Total		15

ทำการเพิ่มจำนวน recombinant vector ใน DH5α *E. coli* (transformation) โดยทำการคัดเลือกโคลนที่มี vector บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ampicilin เข้มข้น 100 μg/ml ทำการสกัดพลาสมิดจาก *E. coli* และส่ง sequencing เพื่อยืนยันว่าพลาสมิดที่ได้มีลำดับเบสที่ถูกต้อง

2. การสังเคราะห์ plasmid เพื่อสร้างโปรตีน Nck ที่มีการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนจำเพาะจุด (site directed mutagenesis)

ทำการสังเคราะห์พลาสมิด ที่สร้างโปรตีน Nck ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนไป (point mutation) อย่างน้อย 4 ตำแหน่งจากลำดับเบสของโปรตีน Nck แม่แบบ (cDNA wild-type Nck template) แต่เมื่อแปลรหัส (translation) แล้วยังให้กรดอะมิโนตัวเดิม โดยใช้ชุด Quick Change site-directed Mutagenesis kit (Stratagene, clontech)

ทำการสังเคราะห์ SH3.1 domain mutated-Nck และ SH2 domain mutated-Nck คือ พลาสมิดที่สร้างโปรตีน Nck ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนไป (point mutation) จากลำดับเบสของโปรตีน Nck แม่แบบ (cDNA wild-type Nck template) ในส่วนของลำดับเบสที่แปลรหัสให้

SH3.1 domain และ SH2 domain โดยใช้ชุด Quick Change site-directed Mutagenesis kit (Stratagene, clontech) จากนั้นนำพลาสมิดนี้เข้าสู่ Nck-knockdown T cell (transfection) และตรวจสอบผลการแสดงออกโปรตีน Nck จากพลาสมิดต่างๆ ด้วยการทำ immunoblottingได้



ตาราง แสดง primer ที่ใช้ในการ mutated Nck plasmid

No.1	Name	Sequence
1	Nck1_W38K_F	5'-gct tct gga tga ttc taa gtc caa gtg gcg agt tcg aaa ttc c-3' 43 bp
2	Nck1_W38K_R	5'-ggg att tcg aac tcg cca ctt gga ctt aga atc atc cag aag c-3' 43 bp
3	Nck1_W143K_F	5'-ggg gaa atg cag tga tgg gaa gtg gcg tgg tag cta caa tgg-3' 42 bp
4	Nck1_W143K_R	5'-cca ttg tag cta cca cgc cac ttc cca tca ctg cat ttc tcc-3' 42 bp
5	Nck1_W229K_F	5'-cct gaa aat gac cca gag aag tgg aaa tgc agg aag atc aat gg-3' 44 bp
6	Nck1_W229K_R	5'-cca ttg atc ttc ctg cat ttc cac ttc tct ggg tca ttt tca gg-3' 44 bp
7	Nck1_R308K_F	5'-ggg gat ttc ctc att aag gat agt gaa tct tcg cc-3' 35 bp
8	Nck1_R308K_R	5'-ggc gaa gat tca cta tcc tta atg agg aaa tcc cc-3' 35 bp
9	Nck1-Resist_F	5'-gtg acc atg tgg gtt ccc tct ccg aga aat tag cag c-3' 37 bp
10	Nck1-Resist_R	5'-gct gct aat ttc tcg gag agg gaa ccc aca tgg tca c-3' 37 bp
11	cNck1_F	5'-gtc gaa ttc atg gca gaa gaa gtg gtg gta g-3' 31 bp
12	cNck1_R	5'-gtg tct aga tca tga taa atg ctt gac aag a-3' 31 bp
13	cNck2_F	5'-ctg gaa ttc atg aca gaa gaa gtt att gtg ata gcc-3' 36 bp
14	cNck2_R	5'-gta tct aga tca ctg cag ggc cct gac gag gta-3' 33 bp

3. การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Nck ใน T cell line

ทำการนำ Nck-shRNA vector เข้าสู่ T cell line โดยการใช้ Neon transfection system (Invitrogen) สำหรับ CH7C17 cell และชุดน้ำยา X-fect kit (clontech) สำหรับ Hut78 cell (มีอยู่แล้ว) จากนั้นบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ 37 °C หลังจาก 48 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหารที่มี puromycin เข้มข้น 4 µg/ml เพื่อคัดเลือกโคลนที่ได้รับ vector เข้าไป ตรวจสอบผลการยับยั้งโปรตีน Nck ใน T cell ด้วยวิธี immunoblotting

4. การกระตุ้น HA1.7 peptide กับ CH7C17 cell

ทำการเลี้ยงเซลล์ DAP-DR1 (มีอยู่แล้ว) ใน RPMI-medium ที่มี 10%FBS จนได้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 80-90% บ่มเซลล์กับแอนติเจนเปปไทด์ คือ HA1.7 และ antagonist peptide ข้ามคืน เก็บเซลล์โดยใช้ 0.5 mM EDTA จากนั้นบ่มเซลล์ที่ความเข้มข้น 2×10^7 cell กับ starved CH7C17 cell (มีอยู่แล้ว) ความเข้มข้น 2×10^7 cell นาน 15 นาทีใน RPMI medium ที่ไม่มี FBS เก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง บ่มตะกอนเซลล์ที่ 37°C นาน 5 นาที ต่อมาจึงเติม 1X lysis buffer บ่มที่ 4°C นาน 30 นาที บน rotate wheel และนำโปรตีนที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย immunoprecipitation ต่อไป

5. Immunoprecipitation

ทำให้เซลล์แตกที่ใน 2x lysis buffer บ่มที่ 4°C นาน 30 นาที บน rotate wheel และเก็บโปรตีน (supernatant) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000g นาน 15 นาที ที่ 4°C เตรียม 50% protein-G slurry bead ใน 1x lysis buffer นำโปรตีนที่สกัดได้บ่มกับแอนติบอดีที่ใช้ในการจับโปรตีนที่สนใจ เช่น anti-CD3E antibody, anti-Nck antibody เป็นต้น นำโปรตีนที่จับกับแอนติบอดีแล้ว บ่มกับ protein-G bead บ่มที่ 4°C นาน 90 นาที บน rotate wheel นำโปรตีนมาวิเคราะห์ด้วย immunoblotting

6. การวิเคราะห์การแสดงออกของ receptor บนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry

เตรียมเซลล์ที่ต้องการย้อมความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดสำหรับเครื่อง flow cytometer ย้อมเซลล์แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสีสำหรับการวิเคราะห์ผลด้วย เครื่อง flow cytometer บ่มเซลล์ที่ 4°C นาน 30 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลาปั่นเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 400g นาน 5 นาที เทแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่จับกับเซลล์ออกละลายเซลล์ใหม่ด้วย 0.5 % FBS-PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการย้อมด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (FACSCalibur, Becton Dickinson)

7. รวบรวมผลการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์เสนอผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่าสามารถกระตุ้น T cell ให้หลั่ง IL-2 ผ่านการทำหน้าที่ของโมเลกุล Nck ได้ โดยตรวจหาการจับกันของโมเลกุล CD3 และ Nck ซึ่งพบว่าหากเซลล์ไม่มีโมเลกุล Nck1 มีแต่โมเลกุล Nck2 จะทำให้ไม่สามารถกระตุ้น T cell ให้หลั่ง IL-2 ได้ตามปกติ ได้ทำการเปรียบเทียบการยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุล Nck 1 ด้วยวิธีการใช้ small interfering RNA และ short hair pin RNA พบว่าได้ผลทำนองเดียวกัน (ดูในบทความที่ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร Science Asia หน้าถัดไป) แต่การใช้เวกเตอร์ที่เป็น lentivirus นั้นได้ผลตรงกันข้าม ส่วนการทำหน้าที่ของ Nck ที่เกี่ยวข้องกับเกิดการ phosphorylation ของโมเลกุลพวก kinase enzyme ต่าง ๆ เช่นโมเลกุล Lck ในการเกิด intracellular signaling นั้นอยู่ในระหว่างดำเนินการต่อเนื่อง ซึ่งผลในเบื้องต้นพบว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับทั้งการจับกับโมเลกุลที่มี proline rich sequence และโมเลกุลที่มี phosphorylation ที่ตำแหน่ง tyrosine residues นอกจากนี้ผู้วิจัยมีความร่วมมือกับศาสตราจารย์ Wolfgang Schamel มหาวิทยาลัย Freiburg ประเทศเยอรมนี ซึ่งจะได้ช่วยเหลือด้านเทคนิควิธีการทดลองในการศึกษาการจับกันของโปรตีนอาศัยหลักการทางชีวเคมีร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์เลเซอร์ชนิดสแกนเพิ่มเติมด้วย ซึ่งผู้วิจัยจะได้เตรียมผลงานตีพิมพ์ในระยะเวลาประมาณ 6 เดือน

ข้อวิจารณ์และข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าการสร้าง IL-2 โดย T cell จำเป็นต้องผ่านการทำหน้าที่ของโมเลกุล Nck โดยตรวจหาการจับกันของโมเลกุล CD3 และ Nck และพบว่าโมเลกุล Nck1 น่าจะมีความสำคัญในด้านการกระตุ้น T cell เช่นนี้มากกว่าโมเลกุล Nck2 และวิธีการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการใช้ small interfering RNA และ short hair pin RNA พบว่าได้ผลทำนองเดียวกัน แต่การใช้เวกเตอร์ที่เป็น lentivirus นั้นได้ผลตรงกันข้ามอาจเนื่องจากผลที่เกิดจากการทำให้ยีนที่ไม่เกี่ยวข้องเกิดการกลายพันธุ์โดยเชื้อไวรัสดังกล่าว ส่วนการทำหน้าที่ของ Nck ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด phosphorylation ของโมเลกุลพวก kinase enzyme ต่าง ๆ ซึ่งพบว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับทั้งการจับกับโมเลกุลที่มี proline rich sequence และโมเลกุลที่มี phosphorylation ที่ตำแหน่ง tyrosine residues ความรู้อย่างที่รับรู้มาจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาการทำหน้าที่ของโมเลกุล T cell receptor ได้โดยตรงซึ่งผู้วิจัยยังดำเนินการศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการควบคุมการกระตุ้น T cell

เอกสารอ้างอิง

Abbas AK, Lichtman AH, and Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company 2007.

Acuto O, Cantrell D. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 2000;18:165-184.

Amrani A, Serra P, Yamanouchi J, et al. Expansion of the antigenic repertoire of a single T cell receptor upon T cell activation. *J Immunol* 2001;167:655-666.

Ansorge S, Henry O, Kamen A. Recent progress in lentiviral vector mass production.

Biochemical Engineering Journal 2010;48:362-377.

Balagopalan L, Sherman E, Barr VA, Samelson LE. Imaging techniques for assaying lymphocyte activation in action. *Nat Rev Immunol* 2011;11:21-33.

Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* 2005;6:80-89.

Barda-Saad M, Shirasu N, Pauker MH, et al. Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *EMBO J* 2010;29:2315-2328.

Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 2007;7:131-143.

Bladt F, Aippersbach E, Gelkop S, et al. The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* 2003;23:4586-4597.

Blasutig IM, New LA, Thanabalasuriar A, et al. Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization. *Mol Cell Biol* 2008;28:2035-2046.

Borroto A, Lama J, Niedergang F, Dautry-Varsat A, Alarcon B, Alcover A. The CD3 epsilon subunit of the TCR contains endocytosis signals. *J Immunol* 1999;163:25-31.

Buday L, Wunderlich L, Tamás P. The Nck family of adapter proteins: Regulators of actin cytoskeleton. *Cellular Signalling* 2002;14:723-731.

Bunnell SC, Hong DI, Kardon JR, et al. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 2002;158:1263-1275.

Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2008;26:233-259.

Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 2002;111:967-979.

Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259-274.

Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* 2005;202:1031-1036.

Chaplin DD. Overview of the immune response. In: *J Allergy Clin Immunol*. 2010/03/05 ed, 2010: S3-23.

Chau LA, Bluestone JA, Madrenas J. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J Exp Med* 1998;187:1699-1709.

Chen M, She H, Kim A, Woodley DT, Li W. Nck-beta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *Mol Cell Biol* 2000;20:7867-7880.

Ciantar JP, Mannering SI. An improved method for growing and analysing human antigen-specific CD4+ T-cell clones. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:906-912.

Clements JL, Yang B, Ross-Barta SE, et al. Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 1998;281:416-419.

Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 2007; 36:184-204.

Collins M, Bartelt RR, Houtman JCD. T cell receptor activation leads to two distinct phases of Pyk2 activation and actin cytoskeletal rearrangement in human T cells. *Molecular Immunology* 2010;47:1665-1674.

Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322

Costello PS, Walters AE, Mee PJ, et al. The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3035-3040.

Davis MM. A new trigger for T cells. *Cell* 2002;110:285-287.

De las Mercedes Segura M, Kamen A, Garnier A. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnology Advances*;24:321-337.

Dienz O, Moller A, Strecker A, et al. Src homology 2 domain-containing leukocyte

phosphoprotein of 76 kDa and phospholipase C gamma 1 are required for NF-kappa B activation and lipid raft recruitment of protein kinase C theta induced by T cell costimulation. *J Immunol* 2003;170:365-372

Dustin ML, Depoil D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol* 2011;11:672-684.

Edwards LJ, Evavold BD. T cell recognition of weak ligands: roles of signaling, receptor number, and affinity. *Immunol Res* 2011;50:39-48.

Fonteneau J-F, Larsson M, Somersan S, et al. Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *Journal of Immunological Methods* 2001;258:111-126.

Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996;384:577-581.

Gascoigne NR, Zal T, Alam SM. T-cell receptor binding kinetics in T-cell development and activation. *Expert Rev Mol Med* 2001;2001:1-17.

Geraerts M, Michiels M, Baekelandt V, Debyser Z, Gijssbers R. Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration. *J Gene Med* 2005;7:1299-1310.

Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 2002;109:901-912.

Giry-Laterriere M, Verhoeven E, Salmon P. Lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* 2011;737:183-209.

Guan S, Fan J, Han A, Chen M, Woodley DT, Li W. Non-Compensating Roles between Nck[alpha] and Nck[beta] in PDGF-BB Signaling to Promote Human Dermal Fibroblast Migration. *J Invest Dermatol* 2009;129:1909-1920.

Hersperger AR, Makedonas G, Betts MR. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A* 2008;73:1050-1057.

Ho WY, Nguyen HN, Wolfl M, Kuball J, Greenberg PD. In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naïve repertoire. *Journal of Immunological Methods* 2006;310:40-52.

Irving BA, Chan AC, Weiss A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* 1993; 177:1093-1103.

Jerome KR, Sloan DD, Aubert M. Measurement of CTL-induced cytotoxicity: the caspase 3 assay. *Apoptosis* 2003;8:563-571.

Jordan MS, Sadler J, Austin JE, et al. Functional hierarchy of the N-terminal tyrosines of SLP-76. *J Immunol* 2006;176:2430-2438.

Jordan MS, Singer AL, Koretzky GA. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* 2003;4:110-116.

Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 2006;6:67-78.

Koretzky GA, Myung PS. Positive and negative regulation of t-cell activation by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 2001;1:95-107.

Krishnadas DK, Stamer MM, Dunham K, Bao L, Lucas KG. Wilms' tumor 1-specific cytotoxic T lymphocytes can be expanded from adult donors and cord blood. *Leukemia Research* 2011;35:1520-1526.

Krogsgaard M, Huppa JB, Purbhoo MA, Davis MM. Linking molecular and cellular events in T-cell activation and synapse formation. *Seminars in Immunology* 2003;15:307-315.

Li W, Fan J, Woodley DT. Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 2001;20:6403-6417.

Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 2002;295:1539-1542.

Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP. Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1048.

Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:732-745.

Mayer BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 2001;114:1253-1263.

Nishimura Y, Chen YZ, Kanai T, Yokomizo H, Matsuoka T, Matsushita S. Modification of human T-cell responses by altered peptide ligands: a new approach to antigen-specific modification. *Intern Med* 1998;37:804-817.

Peterson EJ, Clements JL, Fang N, Koretzky GA. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Current Opinion in Immunology* 1998;10:337-344.

Pickl WF, Majdic O, Kohl P, et al. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1996;157:3850-3859.

Rabinowitz JD, Beeson C, Wulfig C, et al. Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals. *Immunity* 1996;5:125-135.

Reicher B, Barda-Saad M. Multiple pathways leading from the T-cell antigen receptor to the actin cytoskeleton network. *FEBS Letters* 2010;584:4858-4864.

Risueno RM, Gil D, Fernandez E, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* 2005;106:601-608.

Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 2002;20:371-394.

Schroers R, Sinha I, Segall H, et al. Transduction of Human PBMC-Derived Dendritic Cells and Macrophages by an HIV-1-Based Lentiviral Vector System. *Mol Ther* 2000;1:171-179.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72:767-778.

Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003;9:493-501.

Straus DB, Weiss A. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med* 1993;178:1523-1530.

Szymczak AL, Workman CJ, Gil D, et al. The CD3epsilon proline-rich sequence, and its interaction with Nck, is not required for T cell development and function. *J Immunol* 2005;175:270-275.

Taylor P, Tsai S, Shamel A, et al. The proline-rich sequence of CD3epsilon as an amplifier of low-avidity TCR signaling. *J Immunol* 2008;181:243-255.

Tanaka M, Gupta R, Mayer BJ. Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15:6829-6837.

van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol* 2011;11:47-55.

van Leeuwen JE, Samelson LE. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 1999;11:242-248.

Wardenburg JB, Pappu R, Bu J-Y, et al. Regulation of PAK Activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 1998;9:607-616.

Welm BE, Dijkgraaf GJ, Bledau AS, Welm AL, Werb Z. Lentiviral transduction of mammary stem cells for analysis of gene function during development and cancer. *Cell Stem Cell* 2008;2:90-102.

Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, et al. Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C- γ 1 and Ras activation. *EMBO J* 1999;18:1832-1844.

Xu S, Koski GK, Faries M, et al. Rapid high efficiency sensitization of CD8⁺ T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol* 2003;171:2251-2261

Yablonski D, Kane LP, Qian D, Weiss A. A Nck-Pak1 signaling module is required for T cell receptor-mediated activation of NFAT, but not of JNK. *EMBO J* 1998;17:5647-5657.

Yiemwattana I, Ngoenkam J, Paensuwan P, Kriangkrai R, Chuenjitkuntaworn B, Pongcharoen S. Essential role of the adaptor protein Nck1 in Jurkat T cell activation and function. *Clin Exp Immunol* 2012;167:99-107

Zeng R, Cannon JL, Abraham RT, et al. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 2003;171:1360-1368.

Zhang W, Irvin BJ, Tribble RP, Abraham RT, Samelson LE. Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int Immunol* 1999;11:943-9

Zhu M, Janssen E, Zhang W. Minimal requirement of tyrosine residues of linker for activation of T cells in TCR signaling and thymocyte development. *J Immunol* 2003;170:325-3.

Manuscript: RNAi down-regulation of Nck1 adaptor protein in Jurkat T cells

Authors: Pussadee Paensuwana, Jutuporn Ngoenkama, Donruedee Sanguansermisria, Boonruang Khamsria, Ichaya Yiemwattanab, Apirath Wangteeraprasertc, Sutatip Pongcharoenc,d,*

Addresses and affiliations:

a Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Pitsanulok 65000 Thailand

b Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Pitsanulok 65000 Thailand

c Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok 65000 Thailand

d Center of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical science, Naresuan University, Pitsanulok 65000, Thailand

* Corresponding author: Associate Professor Dr Sutatip Pongcharoen, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Tapho district, Maung, Phitsanulok 65000 Thailand

Tel: +66 55 965053

Mobile: +66 89 5628060

E-mail: sutatipp@nu.ac.th; sutatipwp@yahoo.co.uk

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is a potent gene delivery system for studying the regulation of gene expression in a wide variety of eukaryotic cells. In the present study, different RNAi approaches including synthetic small interfering RNA (siRNA) and plasmid- and lentivirus-based short hairpin RNA (shRNA) were investigated for verification of down-regulation of Nck1 protein efficiency in the Jurkat T cell line. Jurkat T cells treated with these three different systems highly and specifically reduced the expression of the Nck1 protein but not the expression of the Nck2 protein. The three systems showed a similar Nck1 knockdown efficiency but led to different T cell activation outcomes. After stimulation, CD69 expression and IL-2 production were impaired in Nck1-siRNA and plasmid based Nck-1 shRNA transfected Jurkat cells. However, these T cell activation outcomes were increased in lentiviral vector based Nck1-shRNA transfected cells. These data suggest that the outcomes from transfection with the shRNA based lentiviral vector contrast with those of siRNA and shRNA-based plasmids although they provide the same gene silencing efficiency. The verification of suitable RNAi strategies to silence target genes is necessary before proceeding to experiments.

Keywords: RNA interference, Lentiviral vector, Nck

INTRODUCTION

RNA interference (RNAi) is a powerful technology for investigating mammalian gene function by sequence-specific gene silencing. RNAi was first discovered in the nematode *Caenorhabditis elegans*¹ and it is the biological process underlying double-stranded RNA (dsRNA)-induced gene silencing, resulting in the inhibition of specific gene expression. The RNAi hallmark is the specificity of the dsRNA in which sequences are homologous to that of the target mRNA.² Experimentally, RNAi can be achieved by transfecting cells either directly using chemically synthetic siRNA constructs or using DNA vectors or viral vectors as carriers of short hairpin (sh) RNA.³

Small interfering RNA (siRNA) comprise specific sequences of 19-21 nucleotides, that can be chemically synthesized in vitro and consist of sense and complementary anti-sense strands. These complementary strands are annealed to form a double stranded siRNA duplex, which are then used to introduce into host cells by various transfection techniques. siRNAs can reduce expression of the gene of interest by enzymatic degradation of a target mRNA via the RNA-induced silencing complex (RISC). The efficiency of siRNA is the specifically reduced expression of the gene of interest while having no influence on irrelevant genes. However, the synthetic siRNA provides a transient knockdown of the target gene because of enzymatic degradation in the host cells and it is diluted in rapidly dividing cells.⁴ The effective gene knockdown can be prolonged using vector-based approaches where a shRNA expression system continually generates a siRNA-like species.⁵ The *shRNA* consists of a siRNA sequence followed by a 9 nucleotide loop and a reverse complementary siRNA sequence, which is then inserted into a plasmid or viral vector. In comparison to the plasmid-based shRNA system, some viral-based shRNA types, such as the lentiviral vector can integrate their shRNA-containing genome stably into a host genome resulting in stable gene knockdown. The lentivirus is commonly used for long term gene silencing because it can transduce a gene into a wide variety of cell lines and primary cells both in vitro and in vivo.^{3,5,6}

The noncatalytic region of tyrosine kinase (Nck) is an adaptor protein expressed in a variety of tissue cells and cell lines. The Nck family consists of two known members in humans, including Nck1 and Nck2. Each Nck isoform contains three src homology 3 (SH3) domains and one SH2 domain. In many cell types, Nck links phosphotyrosine signals and regulates actin cytoskeletal rearrangement.⁷ In T cells that are activated through their T cell antigen receptor (TCR), Nck is essential in regulation of actin rearrangement and immunological synapse formation in response to TCR stimulation.⁸⁻¹⁴ Interestingly, our

recent data have shown that silencing of Nck1 by transfection of siRNA to Jurkat T cell results in abrogation of T cell activation as indicated by decreased interleukin-2 (IL-2) secretion and CD69 expression.¹⁴

RNAi is commonly achieved by either siRNA, plasmid-based shRNA or viral-based shRNA; however, researchers normally rely on one of these methods. Therefore, our research was to find out that whether these three RNAi systems would be equally effective in gene knockdown or not. We aimed to answer this question by knockdown of the Nck1 protein in Jurkat T cells using the three RNAi systems. For this, two important readouts associated with T cell activation were examined, including CD69 expression and IL-2 production. Although the three RNAi systems provided equally effective Nck1 knockdown, they led to different patterns of T cell activation. Jurkat T cells treated with siRNA and shRNA-based plasmids to decrease Nck1 protein expression had impaired CD69 expression and IL-2 production. In sharp contrast, Jurkat T cells transfected with lentiviral vector-based shRNAs to knockdown Nck1 expression increased both CD69 expression and IL-2 production.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Jurkat E6.1 T cells (clone E6-1; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (JRH Biosciences, Victoria, Australia), and 2 mM L-glutamine (JRH Biosciences). Cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂.

Nck short interfering (si) RNA transfection

The siRNA duplex sequences targeting Nck1 and control siRNA were designed and synthesized chemically by Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The siRNA sequence targeting Nck1 used in this study was 5'-GGGTTCTCTGTCAGAGAAA-3'. The siRNA transfection was performed as previously described.¹⁴ Briefly, 2x10⁵ Jurkat cells were harvested, washed with D-PBS (Invitrogen) and resuspended in 10 µl solution R plus 50 pmol of stealth RNAi™ siRNA duplexes specific for Nck1. Negative controls were performed by using negative stealth siRNA low in GC content (Invitrogen). Cells were then electroporated in a microporator pipette by MicroPorator (Digital Bio Technology, Seoul,

Korea) using three pulses of 10 ms at 1600 V. The transfected cells were used after 48 hr post transfection.

Nck1-shRNA plasmid construction and transfection

The Nck1-shRNA construct was designed according to the Lenti-X™ Lentiviral Expression Systems manual (Clontech, Mountain View, CA). The Nck1-shRNA sequence was 5'-

GATCCGGGGTTCTCTGTCAGAGAAATTC AAGAGATTTCTCTGACAGAGAACCCTTTTTTACGCGTG-

3'. The sense sequence targeting Nck1 was designed based on the Nck1-siRNA oligonucleotide. The Nck1-shRNA was 64 nucleotides in length consisting of 19 nucleotide sense and antisense sequences separated by a 9 nucleotide non-complementary loop sequence. This Nck1-shRNA oligonucleotide was flanked with BamHI restriction site at the 5' end and RNA polymerase III termination signal followed by EcoRI restriction site at the 3' end. The Nck1-shRNA oligonucleotides were cloned into the pLVX-shRNA1 vector (Clontech) at the multiple cloning sites downstream of the U6 promoter. The constructed plasmid was transformed into competent cells and the positive clones were subsequently confirmed by sequencing. Transfection of constructed plasmid into Jurkat T cells was carried out as described above. Briefly, 2x10⁵ Jurkat T cells were transfected with either 1 microgram Nck1-shRNA or control scramble expressing plasmid (Addgene). After incubation for 48 hr, 4 microgram/ml of puromycin was added into the culture to generate stable Nck1-knockdown cell lines.

Lentiviral particle production and transduction

Lentiviral supernatant was generated in HEK293T cells. Briefly, the 293T cells were cultured in the DMEM medium supplemented with 10% tetracyclin-free FBS (Clontech) and 2 mM L-glutamine. Approximately 24 hr before transfection, 1x10⁷ cells were plated on a 100 mm culture dish containing 10 ml of complete medium and incubated at 37°C, 5% CO₂ overnight. For production of Nck1-specific shRNA lentivirus, cells were co-transfected with 1 microgram/microliter of the constructed Nck1-shRNA plasmid and Lenti-X HTX packaging mix (Clontech) using Xfect kit (Clontech). shRNA control (scramble shRNA) lentivirus supernatant was prepared by co-transfection of HEK293T cells with 4 µg of pCMV.dR8.2 dvpr, 4 µg of pCMV.VSV.G, and 7 µg scramble shRNA vector (Addgene). Four hours post-transfection, the cultures were refreshed with 10 ml fresh medium and incubated at 37°C for an additional 24-48 hr. Viral supernatants



were concentrated using Lenti-X™ Concentrator according to manufacturer's instructions (Clontech). Lentiviral titer was determined using a Lenti-X qRT-PCR titration kit (Clontech).

สำนักหอสมุด

จ ๑๒
๑๕
.๘
.๗๒
๖๗๘๕๕
๒๕๕๗

For transduction of lentivirus to target cells, 2×10^5 Jurkat T cells were cultured in complete medium for 12 to 18 hr before transduction. Jurkat T cells were then transduced with the lentiviral particles with multiplicity of infection (MOI) = 10 and in the presence of 4 microgram/ml of polybrene. After 24 hr of incubation, the cultured medium was replaced with fresh medium and further incubated for 24-48 hr followed by incubating cells in medium containing 4 microgram/ml puromycin for 4-7 days.

Immunoblotting

Protein samples were resolved on 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Pall, Ann Arbor, MI, USA). The membrane was blocked with RapidBlock solution (Amresco, Solon, Ohio, USA). The membrane was then incubated with rabbit monoclonal antibodies against human Nck1 (Cell Signaling Technology, Danver, MA, USA), or Nck2 (Abnova Corp., Taipei, Taiwan) or beta-actin (Cell Signaling Technology). The membrane was developed using enhanced chemiluminescence reagent (ECL: Bio-Rad, USA) and was then observed by the ImageQuant LAS 4000 imaging system (GE healthcare, Uppsala, Sweden).

IL-2 production measurement

Jurkat E6.1 T cells in logarithmic growth were harvested and resuspended in complete medium. 2×10^5 cells were then seeded into a 96-well tissue culture plate pre-coated with 1 μ g/ml anti-CD3 antibody (OKT3, eBioscience, San Diego, CA, USA) in the presence of 1 μ g/ml soluble anti-CD28 antibody (eBioscience, San Diego, CA, USA). Cells were then incubated for 24 hr at 37°C with 5% CO₂. Secreted IL-2 in the supernatant was determined using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer's instructions. The optical density at 450 nm was read using a microplate reader (Perkin Elmer).

Detection of CD69 expression by flow cytometry

The expression of CD3 molecules on T cell surface was determined using anti-CD3 conjugated FITC antibody. To examine the expression of CD69, Jurkat T cells were stimulated as described above. Cells were washed twice with PBS containing 1% FBS.

Cells were then incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human CD69 mAb or isotype control for 30 min at 4°C in the dark. Finally, cells were assessed for CD69 expression using a FACScalibur (Becton Dickinson, NJ, USA) and analyzed with CellQuestPro software.

RESULTS

All three RNAi strategies provided an effective down-regulation of the Nck1 protein in Jurkat T cells.

The ability of the RNAi system to silence gene expression has been proven to be invaluable for studying gene function in cultured mammalian cells. The achievement or failure to silence a gene of interest depends on RNAi delivery systems and cell types. In this study, Jurkat E6.1 T cells were transfected with either Nck1-siRNAs or plasmid-based Nck1-shRNAs or transduced with lentiviral-based Nck1-shRNA. These three approaches showed a reduction of Nck1 protein expression level to about 75% (Figure 1). In addition, these three techniques exhibited gene-specific silencing since they did not affect the expression of related protein that was Nck2 protein. Thus, both non-viral and viral vector methods successfully delivered Nck1siRNA and Nck1-shRNA into target cells to mediate specific gene silencing.

Three RNAi systems did not affect TCR expression

The T cell receptor (TCR) in association with its associated CD3 signaling subunits (TCR-CD3 complex) is essential for antigen recognition and activation of T cell. The effect of these RNAi systems on TCR expression was monitored. The TCR-CD3 complex molecules on cell surface were stained with anti-CD3 conjugated FITC antibody and analyzed by flow cytometer. The results indicated that there were no significant differences of the TCR expression level among these RNAi systems (Figure 2). Therefore, the silencing of Nck1 expression by these three different techniques did not impair TCR expression on the T cell surface.

CD69 expression and IL-2 production depended on RNAi-mediated Nck1 silencing techniques

T cell activation normally leads to the expression of the CD69 molecule and production of numerous cytokines and chemokines, which are important for the immune response. CD69 is a type-II C-type lectin receptor, known as one of the earliest cell

surface activation markers.¹⁵ The upregulation of CD69 surface expression on T cells is followed by cell proliferation and an increase in the secretion of IL-2 and IFN-gamma. In this study, CD69 expression and IL-2 production were examined and compared between cells treated with different RNAi-mediated Nck1 silencing techniques. Nck1-knockdown cells obtained from three RNAi approaches were stimulated with 1 µg/ml anti-CD3 OKT3 antibody plus 1 µg/ml anti-CD28 antibody for 24 hr. Cells were then analyzed for CD69 expression by flow cytometer and supernatants containing IL-2 were quantitatively measured by ELISA. It was found that CD69 expression was impaired in Nck1 knockdown cells using siRNA and plasmid-based shRNA treatment, but not Nck1 knockdown cells using lentiviral-based shRNA treatment (Figure 3). The results were consistent with IL-2 production (Figure 4).

DISCUSSION

RNAi-based gene silencing is commonly used to study gene function in T cell responses.^{4,16-19} Here we compared three different RNAi strategies, including synthetic siRNA, plasmid- and lentivirus-mediated shRNA production in silencing of the Nck1 gene and their outcomes after cell activation. Among these three different RNAi methods, synthetic double-stranded siRNA with about 21 nucleotides is more potent for mediating sequence-specific gene silencing because it resembles natural cellular machinery. However, introducing of double-stranded siRNA molecules of over 50 nucleotides long can induce an interferon response in mammalian cells, which leads to translation inhibition and mRNA degradation of non-specific gene.^{20,21} In this present study, Nck1-specific siRNA duplexes of 19 nucleotides long were used to transfect into Jurkat T cells for suppressing Nck1 expression. Although, synthetic siRNA duplexes can be used to avoid non-specific global suppression of gene expression caused by the interferon responses,² the transient nature in gene silencing of siRNA makes it unsuitable for generation of stable gene knockdown in Jurkat cell lines. Therefore, plasmid- and lentiviral-based shRNA systems have been used to achieve prolonged gene silencing because they endogenously and continuously express shRNAs in Jurkat T cells. These shRNAs are then processed in the cytoplasm to siRNA duplexes by a cellular enzyme called Dicer.²²

For shRNA expression systems, the proper design of shRNA expression cassettes is required. The stable expression of shRNA is driven by RNA polymerase III promoters, H1 or U6 promoters.^{23,24} In contrast to the H1 promoter, the U6 promoter expresses a high

level of shRNAs, which provide more reduction of target gene expression.²⁵ However, it has been found that a flawed vector design of the U6-shRNA vector can cause the IFN response.²⁶ This IFN response is induced by the presence of AA residues at the transcription start site (-1/+1) of the U6-shRNA vector. Replacement of AA with a C/G sequence at position -1/+1 could prevent IFN induction.²⁶ In this present study, we used the U6-shRNA vector (pLVX) to construct shRNA expression cassettes. This vector contains a consensus C/G at position -1/+1 of the transcription start site. These constructed plasmids can be used directly to transfect into Jurkat T cells for endogenous expression of shRNA specific to the Nck1 gene. Alternatively, they can be combined with lentiviral packaging plasmids to produce lentiviruses, which can infect Jurkat cells and continually expresses shRNA. The use of lentiviruses to mediate stable gene silencing is more powerful since they can be applied for dividing and non-dividing cells as well as cells that are difficult to transfect.

In humans, Nck1 shares 68% amino acid identity with Nck2.⁷ Jurkat T cells treated by these three different systems achieved similar reduction of Nck1 expression by about 60-80% without affecting the expression of Nck2. This indicates sequence-specific gene silencing of these systems. Notably, although these three different RNAi strategies were effectively able to knockdown the Nck1 gene in Jurkat T cells, they showed distinct phenotypes as observed by CD69 expression and IL-2 production. These read-outs are the primary indicators of T cell activation. In this current study, we found that knockdown of Nck1 by siRNA and shRNA expression plasmids caused an impairment of CD69 expression and IL-2 production in TCR-mediated Jurkat T cell activation. Surface expression of CD69 is regulated through the Ras activation pathway, which is essential for IL-2 gene transcription and production.²⁷ Moreover, Nck has been known to interact with son of sevenless (SOS), which is required for controlling the activation of Ras.²⁸⁻³⁰ Thus, the reduced CD69 expression and IL-2 secretion were probably due to the loss of Nck to interact with SOS. In agreement with this notion, mutation on the third SH3 domain of Nck1 to inhibit Nck-SOS interaction has been found to abrogate CD69 expression and Erk activation.³¹ In sharp contrast, expression of CD69 and production of IL-2 were up-regulated in Jurkat cells transduced with lentiviruses to mediate Nck1 knockdown. The random integration of lentiviral DNA into the host cell's genome may result in the insertional mutagenesis of an unpredictable gene,^{32,33} which may cause the up-regulation of CD69 expression and IL-2 production. Altogether, we show that these three RNAi methods provide inconsistent results.

Although several pieces of evidence have shown that transfection of siRNA or transduction of lentivirus to express shRNA could activate the interferon signaling and interferon-stimulated gene,^{26,34-35} RNAi technology is still the great promise for gene function analysis in T cell research. All three methods had advantages and disadvantages depending on research applications and facilities available in the laboratory, as summarized in Table 1. Therefore, identification of suitable RNAi techniques as well as designing correct shRNA expression cassettes and systems are essential before proceeding with the experiments. Furthermore, functional outcomes should be examined empirically.

In conclusion, this study provides comparison of three RNAi delivery methods to the Jurkat E6.1 T cell line. This included the siRNA, vector based shRNA transfection, and shRNA lentiviral vector transduction. We found that siRNA and vector based shRNA transfection provided similar results while these differed from shRNA lentiviral vector system.

Acknowledgements

Pussadee Paensuwan and Jatuporn Ngoenkam are supported by the Royal Golden Jubilee PhD programme of the Thailand Research Fund. This work was supported by Naresuan University Research Grants No. R2556B026, R2557B029 (to SP) and R2557B024 (to IY). The authors would like to thank Kwansuda Supalap, Pimporn Udampol, and Sang Sri-ampai, Biomedical Research Unit, Office of Research, Faculty of Medicine, Naresuan University, for technical assistance. The authors also thank Assistant Prof. Dr. Sarawut Kumphune and Dr. Rerngwit Boonyom, Faculty of Allied Health Sciences, as well as Associated Prof. Dr. Pannika Ritvirool, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University for technical advice.

REFERENCES

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11
2. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Although several pieces of evidence have shown that transfection of siRNA or transduction of lentivirus to express shRNA could activate the interferon signaling and interferon-stimulated gene,^{26,34-35} RNAi technology is still the great promise for gene function analysis in T cell research. All three methods had advantages and disadvantages depending on research applications and facilities available in the laboratory, as summarized in Table 1. Therefore, identification of suitable RNAi techniques as well as designing correct shRNA expression cassettes and systems are essential before proceeding with the experiments. Furthermore, functional outcomes should be examined empirically.

In conclusion, this study provides comparison of three RNAi delivery methods to the Jurkat E6.1 T cell line. This included the siRNA, vector based shRNA transfection, and shRNA lentiviral vector transduction. We found that siRNA and vector based shRNA transfection provided similar results while these differed from shRNA lentiviral vector system.

Acknowledgements

Pussadee Paensuwan and Jatuporn Ngoenkam are supported by the Royal Golden Jubilee PhD programme of the Thailand Research Fund. This work was supported by Naresuan University Research Grants No. R2556B026, R2557B029 (to SP) and R2557B024 (to IY). The authors would like to thank Kwansuda Supalap, Pimporn Udampol, and Sang Sri-ampai, Biomedical Research Unit, Office of Research, Faculty of Medicine, Naresuan University, for technical assistance. The authors also thank Assistant Prof. Dr. Sarawut Kumphune and Dr. Rerngwit Boonyom, Faculty of Allied Health Sciences, as well as Associated Prof. Dr. Pannika Ritvirool, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University for technical advice.

REFERENCES

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11
2. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

3. Li F, Mahato RI (2011) RNA interference for improving the outcome of islet transplantation. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 47-68.
4. Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P (2009) Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 25, 732-45.
5. Miest T, Saenz D, Meehan A, Llano M, Poeschla EM (2009) Intensive RNAi with lentiviral vectors in mammalian cells. *Methods* 47, 298-303.
6. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 18, 1844-8.
7. Lettau M, Pieper J, Janssen O (2009) Nck adaptor proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal*. 7.
8. Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B (2002) Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*. 109, 901-912.
9. Barda-Saad M, Shirasu N, Pauker MH (2010) Cooperative interactions at the SLP-76 complex are critical for actin polymerization. *EMBO J*. 29, 2315-2328.
10. Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE (2005) Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol*. 6, 80-89.
11. Li W, Fan J, Woodley DT (2001) Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene*. 20, 6403-6417.
12. Taylor P, Tsai S, Shameli A, Serra P, Wang J, Robbins S, Nagata M, Szymczak-Workman AL, Vignali DA, Santamaria P (2008) The proline-rich sequence of CD3epsilon as an amplifier of low-avidity TCR signaling. *J Immunol*. 181, 243-255.
13. Risueno RM, Gil D, Fernandez E, Sanchez-Madrid F, Alarcon B (2005) Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood*. 106, 601-608.
14. Yiemwattana I, Ngoenkam J, Paensuan P, Kriangkrai R, Chuenjitkuntaworn B, Pongcharoen S (2012) Essential role of the adaptor protein Nck1 in Jurkat T cell activation and function. *Clin Exp Immunol*. 167, 99-107.
15. Marzio R, Jirillo E, Ransijn A, Mauel J, Corradin SB (1997) Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 62, 349-355.

16. Pauker MH, Reicher B, Fried S, Perl O, Barda-Saad M (2011) Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol* 31, 2653-2666.
17. Warnecke N, Poltorak M, Kowtharapu BS, Arndt B, Stone JC, Schraven B, Simeoni L (2012) TCR-mediated Erk activation does not depend on Sos and Grb2 in peripheral human T cells. *EMBO Rep* 13, 386-391.
18. Green VA, Arbuthnot P, Weinberg MS (2012) Impact of sustained RNAi-mediated suppression of cellular cofactor Tat-SF1 on HIV-1 replication in CD4+ T cells. *Virology* 459, 272.
19. Sylvain NR, Nguyen K, Bunnell SC (2011) Vav1-mediated scaffolding interactions stabilize SLP-76 microclusters and contribute to antigen-dependent T cell responses. *Sci Signal* 4, ra14.
20. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.
21. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
22. Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P (2002) Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13, 2197-2201.
23. Banerjee A, Li MJ, Bauer G, Remling L, Lee NS, Rossi J, Akkina R (2003) Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 8, 62-71.
24. Fish RJ, Kruthof EK (2004) Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol* 5, 9.
25. Robbins MA, Li M, Leung I, Li H, Boyer DV, Song Y, Behlke MA, Rossi JJ (2006) Stable expression of shRNAs in human CD34+ progenitor cells can avoid induction of interferon responses to siRNAs in vitro. *Nat Biotechnol* 24, 566-571.
26. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839.
27. Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A (1998) LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
28. Wunderlich L, Farago A, Buday L (1999) Characterization of interactions of Nck with Sos and dynamin. *Cell Signal* 11, 25-29.

29. Hu Q, Milfay D, Williams LT (1995) Binding of NCK to SOS and activation of ras-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 15, 1169-1174.
30. Okada S, Pessin JE (1996) Interactions between Src homology (SH) 2/SH3 adapter proteins and the guanylnucleotide exchange factor SOS are differentially regulated by insulin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 271, 25533-25538.
31. Ngoenkam J, Paensuwan P, Preechanukul K, Khamsri B, Yiemwattana I, Beck-García E, et al (2014) Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation. *Cell Commun Signal* 12, 21.
32. Li Z, Kustikova OS, Kamino K, Neumann T, Rhein M, Grassman E, Fehse B, Baum C (2007) Insertional mutagenesis by replication-deficient retroviral vectors encoding the large T oncogene. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 95-113.
33. Baum C, Fehse B (2003) Mutagenesis by retroviral transgene insertion: risk assessment and potential alternatives. *Curr Opin Mol Ther* 5, 458-462.
34. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-264.
35. Khan IF, Hirata RK, Wang PR, Li Y, Kho J, Nelson A et al (2010) Engineering of human pluripotent stem cells by AAV-mediated gene targeting. *Mol Ther* 18, 1192-1199.

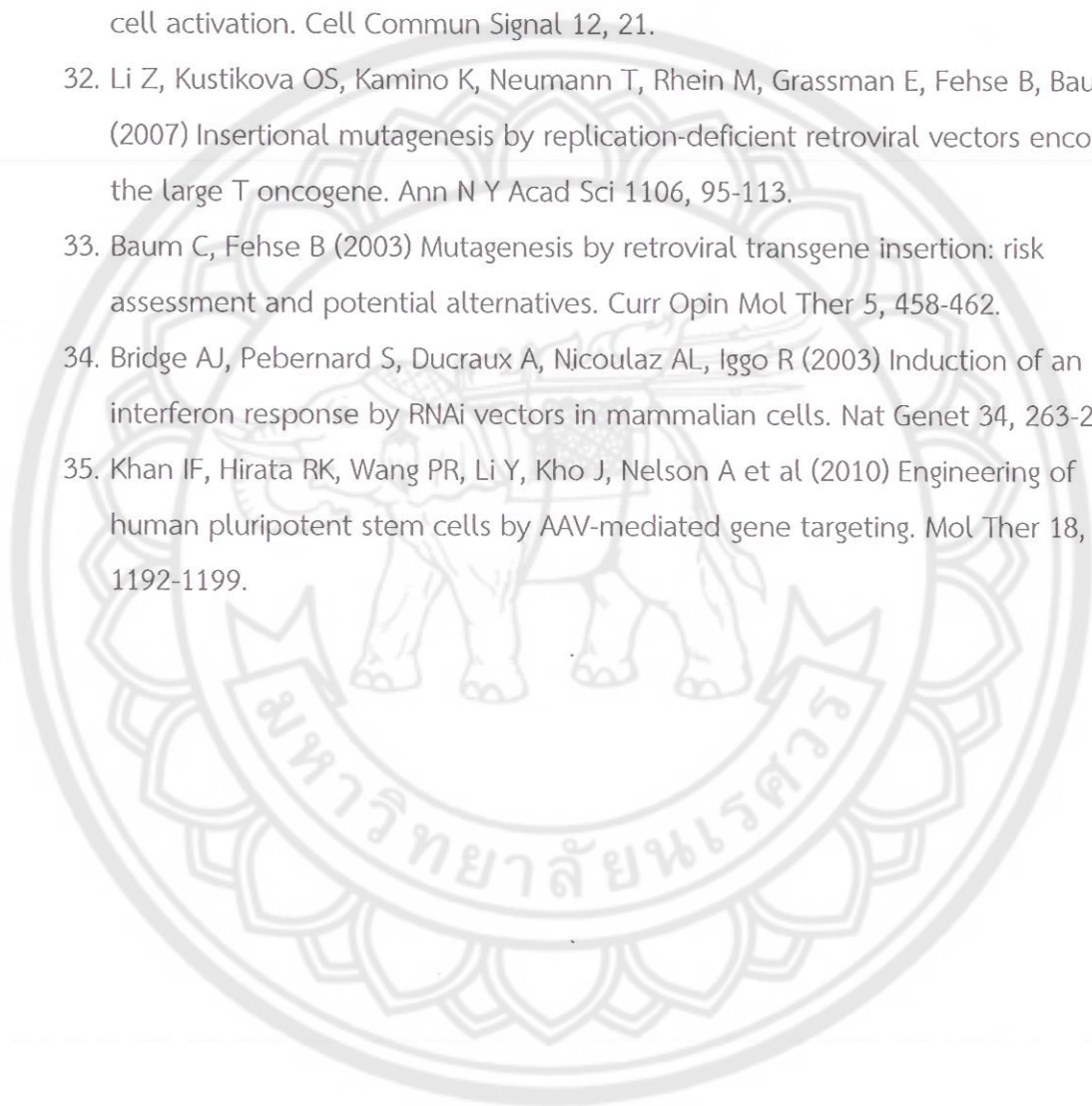


FIGURE LEGENDS

Figure 1 Nck1 protein expression was reduced in siRNA, plasmid- and lentiviral-based shRNA systems. Jurkat T cells were treated with Nck1-specific siRNA (siRNA), or plasmid encoding Nck1-specific shRNA (plasmid), or lentivirus generating Nck1-specific shRNA (lentivirus). Non-specific siRNA and scramble shRNA were used as a control (Ctl) for siRNA and shRNA systems, respectively. Protein expression was assessed by immunoblotting using anti-Nck1, Nck2 and beta-actin antibody. Band intensities were quantified by the ImageJ software. The quantified signal intensities of the Nck1 or Nck2 were normalized to their corresponding actin and these values were relative to that in the control cells (Ctl), set as 1. Numbers below the band indicate expression level of Nck1 and Nck2 compared with control (Ctl). One representative experiment out of two is shown.

Figure 2 TCR expression level in Jurkat T cells. Jurkat T cells were treated with Nck1-siRNA (A), shNck1 plasmids (B) and shNck1 Lentivirus (C). The TCR expression of control cells (Ctl) (bold solid line) and Nck1-knockdown cells (siNck1 or shNck1) (grey histogram) was determined by staining cells with anti-CD3 conjugated FITC antibody or isotype control antibodies. The stained cells were then analyzed by flow cytometer. The dotted line represents the isotype control in each group. The data are representative of two independent experiments.

Figure 3 CD69 expression was down-regulated in Nck1-siRNA and plasmid-based Nck1-shRNA but was up-regulated in lentivirus-based Nck1-shRNA systems. Nck1 knockdown cells mediated by different systems including Nck1-siRNA (A), plasmid-based Nck1shRNA (B) and lentiviral-based Nck1 shRNA, were stimulated with plate-precoated with anti-CD3 antibodies and soluble anti-CD28 antibody for 24 hr at 37°C. CD69 expression was assessed by flow cytometer. Numbers in CD69 histogram indicate frequency of positive cells. Black bold solid line and black letter are control cells, grey histogram and grey letter are Nck1 knockdown cells, and dotted and grey lines are isotype control. The data are representative of two independent experiments.

Figure 4 The production of IL-2 was impaired in Nck1-siRNA and plasmid-based Nck1-shRNA transfected Jurkat cells but was upregulated in lentivirus-based Nck1-shRNA transduced Jurkat cells. Nck1 knockdown cells mediated by different systems including

Nck1-siRNA (A), plasmid- based Nck1shRNA (B) and lentiviral-based Nck1 shRNA, were stimulated with plate-precoated with anti-CD3 antibodies and soluble anti-CD28 antibody for 24 hr at 37°C. Supernatants containing IL-2 were measured by ELISA. Data are representative of two independent experiments and shown as mean \pm SD from triplicate samples. *p < 0.05.



Figure 1

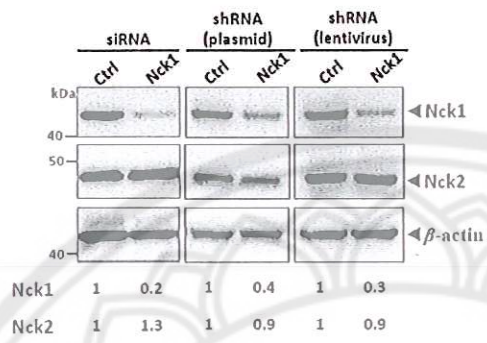


Figure 2

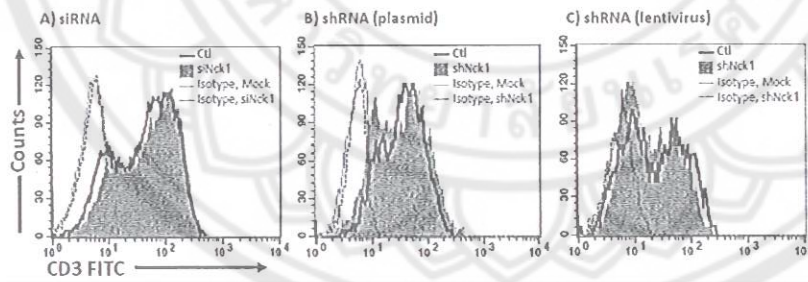


Figure 3

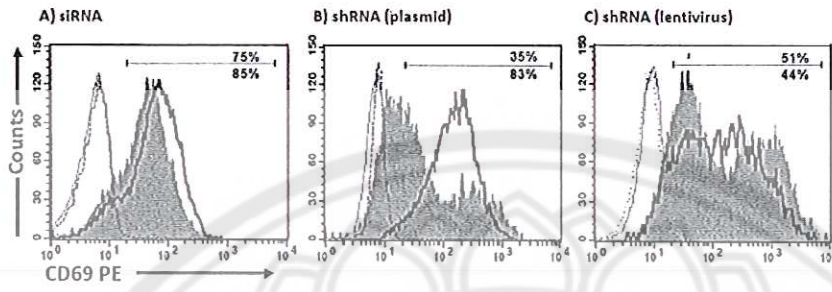
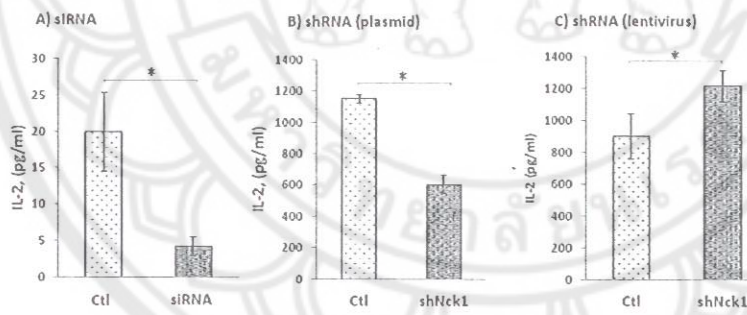


Figure 4





เลขทะเบียน.....⁴⁸.....

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์
ฐานข้อมูล NU Digital Repository (<http://obj.lib.nu.ac.th/media/>)
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า รศ.พญ.ดร.สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ (ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์) ได้ส่งผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องบทบาทและหน้าที่ของ Nck ต่อการเกิด T cell receptor signaling

ปีที่พิมพ์ 2557

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า รศ.พญ.ดร.สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ เป็นเจ้าของ ลิขสิทธิ์ และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- อนุญาตให้เผยแพร่
 ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก.....

ลงชื่อ
(รศ.ดร.พญ.สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ)
วันที่ 12 พ.ค. 58

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด