Thesis Title Regulation of Wilms' Tumor 1 (WT1) Protein Signaling Pathway by Pure Curcumin

Author Miss Suwanna Semsri

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Songyot Anuchapreeda	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Colleen Sweeney	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pornngarm Dejkriengkraikul	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate	Co-advisor
Lect. Dr. Nutjeera Intasai	Co-advisor
Lect. Dr. Tanyarat Jomgeow	Co-advisor

ABSTRACT

Leukemia is a group of diseases involving the deficiency of blood-forming organs, and is characterized by the uncontrolled increase of white blood cells. It commonly occurs throughout the word. Wilms' tumor 1 (WT1) protein is highly expressed in leukemic blast cells of myeloid and lymphoid origin. Thus, *WT1* gene expression is used as a biological marker for leukemia detection and monitoring disease progression. The WT1 protein has four isoforms: WT1 +/+, +/-, -/+, and -/-.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Chemotherapy has been the most commonly used in the treatment of leukemia. However, it causes numerous side effects with patients. Currently, alternative treatments with natural products are being studied in an attempt to gather new information in the treatment of leukemia. Interestingly, previous studies have shown that pure curcumin could inhibit both WT1 mRNA and WT1 protein levels in leukemic cell lines. However, the inhibitory mechanism of pure curcumin to downregulate *WT1* gene expression is at this point, still unclear. The purpose of this study was to identify the inhibitory mechanism of pure curcumin on the WT1 protein signaling pathway in a K562 cell model and to investigate the effect of pure curcumin on WT1 isoforms in transfected U937 cells. This study firstly showed that suppression of WT1 mRNA and protein expression by pure curcumin was distinctly independent of the degradation process by use of actinomycin D, a mRNA synthesis inhibitor and cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. Moreover, the testing of the proteasome inhibitor (MG132, EGCG, and lactacystin) supported that pure curcumin suppressed WT1 protein expression in a manner independent of the proteasome pathway. The next experiment was focused on the effect of the pure curcumin on the signaling pathway using a human-phospho kinase protein array technique. The result showed that pure curcumin strongly decreased phosphorylation of JNK pan (T183/Y185, T221/Y223) and c-Jun (S63). Pure curcumin suppressed PKCα activation by Western blot analysis. These results were also supported by PKCα inhibitor treatment which decreased both WT1 mRNA and protein levels in K562 cells. Conversely, myristorylated PKCα overexpression increased WT1 levels and then reversed the inhibitory effects of pure curcumin. This experiment also investigated other molecules upstream and downstream of PKCα related to the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

regulation of *WT1* gene expression using specific protein kinase inhibitors. It was indicated that the downregulation of *WT1* gene expression by pure curcumin involved PI3K, PKCα, MEK, JNK and c-Jun pathways. The PI3K is upstream of PKCα, whereas MEK and JNK are downstream. The ChIP and reporter gene assay demonstrated that pure curcumin affected the WT1-DNA binding. The WT1 promoter mutation distinctly indicated that the WT1 binding site is required for WT1 reporter activity. Importantly, pure curcumin suppressed exogenous WT1 +/+ protein in dose and time dependent manners in transfected U937 cells. The inhibitory mechanism of pure curcumin on exogenous WT1 +/+ protein involved protein degradation, unlike pure curcumin regulation of endogenous WT1. This was supported by MG132, which reversed WT1 protein suppression after pure curcumin treatment. The decrease of exogenous WT1 +/+ protein by pure curcumin was absolutely independent from the pCMV promoter activity in pcDNA3.1 vector containing WT1 isoform gene sequences. Moreover, exogenous WT1 +/+ protein expression was inhibited by PKC inhibitor (GF109203x) suggesting that pure curcumin decreased the exogenous WT1 +/+ expression in transfected U937 cells *via* PKC during post-translational processing. Thus, the decrease of WT1 +/+ protein in transfected U937 cells related to post-translation processes. In conclusion, the inhibitory mechanism of pure curcumin on *WT1* gene expression in K562 cells were distinctly associated with PI3K, PKCα, MEK, JNK and c-Jun proteins that demonstrate the novel WT1 protein signaling pathway upstream of WT1 transcription factor. The pure curcumin affected both of WT1 protein-promoter binding and WT1 promoter activity which led to decreased WT1 mRNA and protein levels in K562 cells. WT1 +/+ protein was the exogenous isoform that was suppressed by pure

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

curcumin *via* protein degradation linked to the PKC pathway in transfected U937 cells.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การควบคุมเส้นทางการส่งสัญญาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันโดยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์

ชื่อผู้เขียน นางสาวสุวรรณา เสมศรี

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.ทรงยศ อนุชปรีดา	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร.คอลลีน สวีนีย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ.ดร.พรงาม เดชเกรียงไกรกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร.ชฎารัตน์ อัมพะเศวต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ.ดร.ณัฐจีรา อินต๊ะใส	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ.ดร.ธัญญารัตน์ จอมแก้ว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือลิวคีเมีย คือกลุ่มของโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดซึ่งมีลักษณะที่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ไม่สามารถควบคุมได้ มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถพบได้ทั่วโลก และพบว่ามีการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วัน (WT1) อยู่ในระดับสูงในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตัวอ่อนที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ในสายไมอิลอยด์และลิมฟลอยด์ ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันจึงถูกใช้เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการตรวจหาและติดตามการดำเนินไปของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันมีสี่ไอโซฟอร์ม คือวิล์มทูเมอร์วัน +/+, +/-, -/+ และ -/- การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวกันอย่างแพร่หลาย แต่การรักษาด้วยวิธีนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียงอย่างมากกับผู้ป่วย ดังนั้นปัจจุบันการรักษาทางเลือกใหม่กับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้ถูกศึกษาและพยายามที่จะรวบรวมความรู้ใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นที่น่าสนใจว่าการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทู-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมอร์วันได้ทั้งระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเพาะเลี้ยงได้ แต่อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้งของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันยังคงไม่ชัดเจน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษากลไกของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งเส้นทางการส่งสัญญาณของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ต้นแบบชนิด K562 และศึกษาผลของเคอร์คิวมิน บริสุทธิ์ต่อวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่ถูกทรานสเฟคด้วยวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม การศึกษาแรกพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนโดยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับกระบวนการสลายโปรตีน โดยการใช้ ไซโคลเฮกซิไมด์ เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังมีการทดลองเพิ่มเติมซึ่งทำการศึกษาโดยใช้สารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรติเอส (เอ็มจี132, อีจีซีจี และแลคตาซีสติน) ซึ่งผลการทดลองสนับสนุนว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันนั้นไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายในเส้นทางการส่งสัญญาณของโปรติเอโซม การยับยั้งการแสดงออกของวิล์ทมูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอ ก็เช่นเดียวกันพบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ได้รับการยืนยันว่าไม่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของเอ็มอาร์เอ็นเอ ศึกษาโดยการใช้แอคติโนมัยซิน ดี ยับยั้งการสังเคราะห์เอ็นอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาต่อโดยเน้นศึกษาผลของ เคอร์คิวมิน บริสุทธิ์ต่อเส้นทางการส่งสัญญาณโดยการใช้เทคนิคฮิวแมน-ฟอสโฟไคเนส โปรตีนแอเรย์ พบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีนเจเอ็นเค แพน (T183/Y185, T221/Y223) และ ซี-จูน (S63) ในรูปที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตได้ดีที่สุด เคอร์คิวมินบริสุทธิ์ยังลดระดับการแสดงออกของโปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟาในรูปที่ถูกกระตุ้นและทดสอบโดยวิธีเวส-เทิร์นบลอท ผลการทดลองได้ทำการยืนยันโดยใช้ตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนสซีชนิดแอลฟา พบว่าสามารถลดการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วัน ทั้งระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีนในเซลล์ K562 ในทางกลับกันเมื่อเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟา ในรูปที่ถูกกระตุ้นเข้าไปในเซลล์ K562 พบว่าสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน และลดผลการยับยั้งของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ลง นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาโมเลกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในเส้นทางการส่งสัญญาณด้านบนและด้านล่างของโปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟา ที่สัมพันธ์กับเส้นทางการส่งสัญญาณในการควบคุมการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันโดยการใช้สารยับยั้งโปรตีนไคเนสที่เฉพาะ พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันโดยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์เกี่ยวข้องกับโปรตีน พีไอทรีเค, โปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟา, เอ็มอีเค และ เจเอ็นเค นอกจากนี้ยังพบอีกว่า พีไอทรีเค เป็นโปรตีนที่อยู่ด้านบนของโปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟา ส่วน เอ็มอีเค และ เจเอ็นเค เป็นโปรตีนที่ส่งสัญญานด้านล่างของ โปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟา นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้วิธีชิพ (ChIP) และ รีพอร์เตอร์ยีน (reporter gene) พบว่าเคอร์คิวเมอร์บริสุทธิ์มีผลกระทบต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจับกันระหว่างวิล์มทูเมอร์วันกับดีเอ็นเอโปรโมเตอร์ เมื่อทำการกลายพันธุ์ที่บริเวณวิล์มทูเมอร์-วันโปรโมเตอร์ ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าบริเวณของวิล์มทูเมอร์วันโปรโมเตอร์เป็นบริเวณที่ต้องการสำหรับการจับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน สิ่งที่สำคัญจากการศึกษานี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่ถูกทรานสเฟคด้วยวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม เป็นแบบทั้งความเข้มข้น และระยะเวลาที่เพิ่มสูงขึ้น กลไกของเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ พบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายโปรตีนโดยการทดสอบด้วยไซโคลเฮกซิไมด์ และยืนยันด้วยการทดสอบด้วยเอ็มจี 132 ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการเปลี่ยนกลับของการแสดงออกของโปรตีนไคเนส ซี นอกจากนี้ยังพบว่าการลดลงของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ โดยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรเมอร์เตอร์ของ pCMV ที่อยู่ในเวกเตอร์ชนิด pcDNA3.1 ซึ่งบรรจุยีนของวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์มอยู่ภายใน มากไปกว่านี้การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ สามารถถูกยับยั้งเมื่อทำการทดสอบโดยสารยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนส ซี (GF109203x) บ่งบอกว่าการที่เคอร์คิวมินบริสุทธิ์ลดการแสดงออกของโปรตีนวิล์มทู-เมอร์วันชนิด +/+ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่ถูกทรานสเฟคด้วยวิล์มทูเมอร์วันไอโซ-ฟอร์ม ผ่านทางโปรตีนไคเนส ซี ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการปรับแต่งโปรตีนหลังการสังเคราะห์โปรตีน (post translation modification) ดังนั้นการศึกษานี้สรุปได้อย่างชัดเจนว่ากลไกของเคอร์คิว-มินบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนวิล์มทูเมอร์วันในเซลล์ K562 มีความสัมพันธ์กับโปรตีนควบคุมการส่งสัญญาณ คือพีไอทรีเค, โปรตีนไคเนส ซี ชนิดแอลฟา, เอ็มอีเค, เจเอ็นเค และซี-จูน ซึ่งเป็นวิถีการส่งสัญญาณใหม่ของโปรตีนวิล์มทูเมอร์วัน โดยโปรตีนเหล่านี้เป็นโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณด้านบนของวิล์มทูเมอร์วันทรานสคริปชั่นเฟคเตอร์ และเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ยังมีผลกระทบต่อการจับกับของโปรตีนวิล์มทูเมอร์กับโปรโมเตอร์ตลอดถึงการทำงานของวิล์มทูเมอร์วันโปรโม-เตอร์ด้วย ซึ่งนำไปสู่การลดระดับการแสดงออกของวิล์มทูเมอร์วันเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนในเซลล์ K562 นอกจากนี้โปรตีนวิล์มทูเมอร์วันชนิด +/+ เป็นไอโซฟอร์มที่เกี่ยวข้องในการถูกยับยั้งด้วยเคอร์คิวมินบริสุทธิ์ โดยผ่านทางกระบวนการทำลายโปรตีน และเกี่ยวข้องกับเส้นทางการทำงานของโปรตีนไคเนส ซี ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ที่ถูกทรานสเฟคด้วยวิล์มทูเมอร์วันไอโซฟอร์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved