

Thesis Title Biological System of Glycoproteins Differentially Expressed in Lung
Cancer

Author Miss Piyorot Hongsachart

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul Chairperson

Prof. Dr. Shui-Tein Chen Member

Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham Member

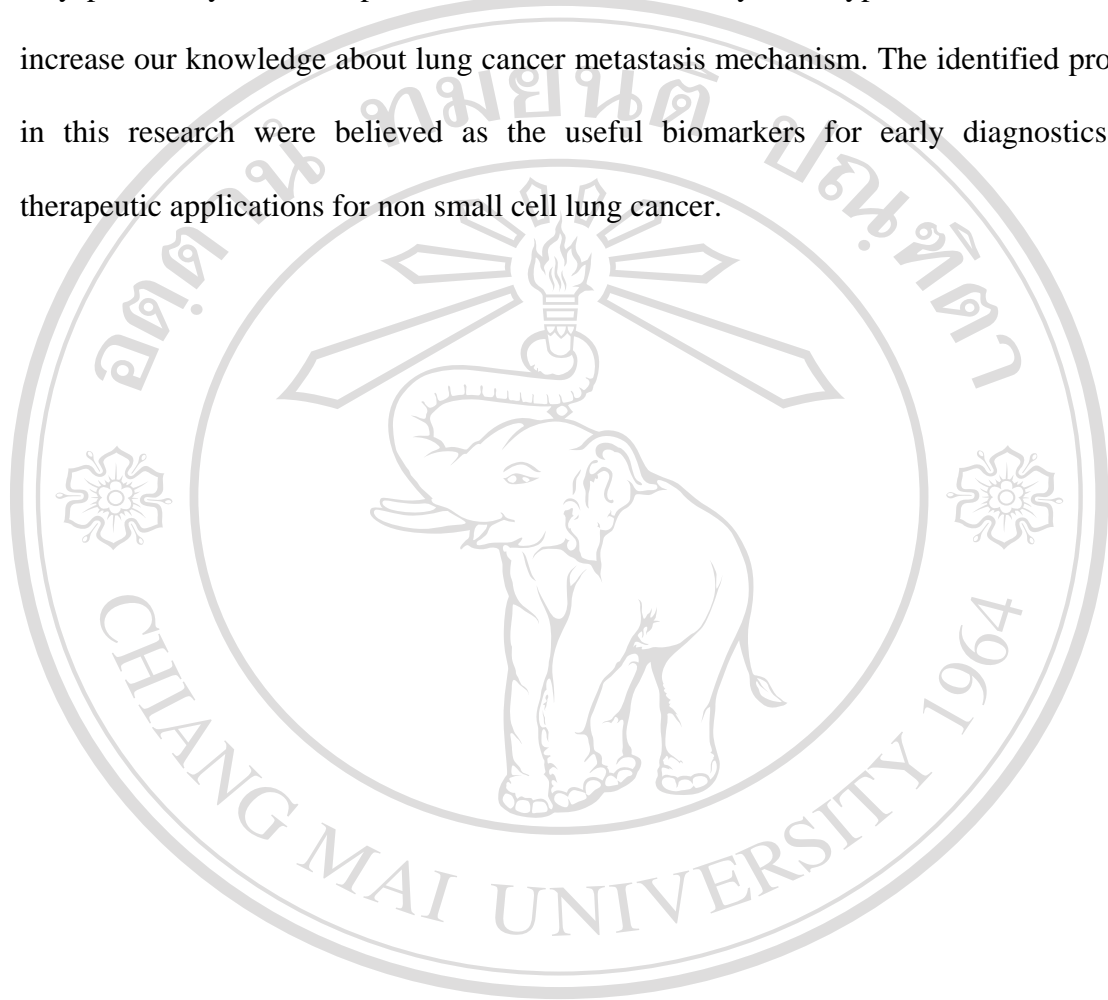
Dr. Supachok Sinchaikul Member

ABSTRACT

There are two distinguished part of actions in this research. In the first part, the differential profiling of glycoproteins among normal serum and lung cancer serum samples were compared. The glycoprotein markers in lung cancer were identified. The correlation of biomarkers and the developmental and progression were evaluated. Second part, the membrane protein markers for each type of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line were investigated and identified using proteomic approach. The differential protein expression profiles in the serum samples and membrane proteins were

hypothesized to be associated with cancer development. The normal and adenocarcinoma lung cancer serum samples were used to investigate the glycoprotein biomarkers. FITC-labeled lectin staining was used for the preliminary detection of specific glycoprotein profiles in both of the serum samples. WGA lectin showed high specific binding with glycoproteins and significantly different fluorescence intensities between normal and lung cancer glycoproteins in serum samples. The serum samples were enriched with glycoproteins using WGA lectin affinity followed by a co-immunoprecipitation with anti-haptoglobin. The 2-DE results showed 27 up-regulated proteins and 12 down-regulated proteins, identified by MALDI-Q-TOF MS and MS/MS. Bioinformatic tools were used to search for protein ontology, category classification and prediction of glycosylation sites. In addition, 3 up-regulated glycoproteins (adiponectin, ceruloplasmin and GPI-80) and 2 down-regulated glycoproteins (cyclin H and Fyn) were correlated with lung cancer development. These proteins were validated by Western blot analysis. For proteomic analysis, the membrane proteins were extracted, from normal human lung bronchial epithelium cell line as BEAS-2B and NSCLC cell lines including SW900, NCI-H838 and NCI-H661. The differential membrane proteomes and membrane associated protein specific to each subtype of NSCLC cell line were established. The prohibitin, annexin A2, Rho GDP-dissociation inhibitor 2, and transketolase were exclusively expressed in squamous cell lung cancer. Regarding to the large cell carcinoma cell lines, annexin A1, aldehyde dehydrogenase, and endoplasmic reticulum chaperone were identified as the high expression-level biomarkers. The alpha-enolase was found with higher expressed in all subtypes of NSCLC cell lines than normal lung cell line with the highest expressed in

adenocarcinoma cell line. These membrane proteins and membrane associated proteins may potentially become specific biomarkers to identify each type of NSCLC and help increase our knowledge about lung cancer metastasis mechanism. The identified proteins in this research were believed as the useful biomarkers for early diagnostics and therapeutic applications for non small cell lung cancer.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ระบบชีวภาพของไกลโคโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันในมะเร็งปอด

ผู้เขียน นางสาวปิโรส หงษาชาติ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สุรีย์ พุตระกูล ประธานกรรมการ

ศ. ดร. ส่วยเทียน เงิน กรรมการ

ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ กรรมการ

ดร. ศุภโชค สิ้นไชยกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
การศึกษานี้แบ่งงานออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกมีวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของไกลโคโปรตีนในซีรัมของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งปอด และหาเอกลักษณ์ของตัวบ่งชี้ไกลโคโปรตีนในผู้ป่วย รวมถึงการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างตัวบ่งชี้ที่พบกับการพัฒนาลำดับชั้นของมะเร็งปอด ส่วนที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและหาเอกลักษณ์ของเมมเบรนโปรตีนในแต่ละชนิดย่อย (subtype) ของกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก (Non-small cell

lung cancer) ความแตกต่างของการแสดงออกของตัวอย่างซีรัมและเมมเบรนโปรตีนที่อาจเกี่ยวข้องกับ การพัฒนาการของโรค งานวิจัยนี้ได้้นำตัวอย่างซีรัมของคนปกติและซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดดี โนคาร์ซิโนมา (Adenocarcinoma) มาใช้ในการศึกษาเบื้องต้น โดยเริ่มจากการใช้วิธีย้อมไกลโค โปรตีนด้วยเล็กตินติดฉลากฟลูออเรสเซนต์ (FITC-labeled lectin) เพื่อตรวจหาลักษณะเฉพาะของ ไกลโคโปรตีนที่น่าสนใจในซีรัมตัวอย่างและพบว่าวิทเจอร์มแอกกลูตินิน (Wheat Germ Agglutinin lectin; WGA lectin) สามารถจับกับไกลโคโปรตีนในซีรัมตัวอย่างได้มากและความเข้มของฟลูออเรส เซนต์ที่ย้อมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างไกลโคโปรตีนในซีรัมปกติและซีรัมของผู้ป่วย ดังนั้นจึงใช้ WGA lectin ในการแยกไกลโคโปรตีนออกจากซีรัมตัวอย่างร่วมกับการแยกโปรตีน เฮปโตโกลบิน (Haptoglobin) ออกโดยใช้เทคนิคการตกตะกอนเชิงภูมิคุ้มกัน (co-immunoprecipitation) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนเฮปโตโกลบิน ผลที่ได้จากการ วิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ ด้วยเจลสองมิติ (Two-dimensional electrophoresis) พบว่าในซีรัม ผู้ป่วยมะเร็งปอดมีโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 27 ตัว และโปรตีนที่มีแสดงออกลดลง 12 ตัว โดย โปรตีนเหล่านี้ได้หาเอกลักษณ์ ด้วยเครื่องมือ MALDI-Q-TOF MS และ MS/MS นอกจากนี้ยังใช้ เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (Bioinformation tools) ในการค้นหาและจำแนกคุณสมบัติ ลักษณะ ทั่วไป หน้าที่การทำงานของโปรตีน ตำแหน่งที่พบและการเกิดพันธะระหว่างโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต โดยได้ยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 3 ตัวคือ Adiponectin Ceruloplasmin และ GPI-80 โปรตีนที่แสดงออกลดลงจำนวน 2 ตัว คือ Cyclin H และ Fyn ด้วยเทคนิค Western blot analysis

ส่วนการศึกษาโปรตีนโอมิกล์ของเมมเบรนจากเซลล์เชื้อสายปกติของปอดและเซลล์เชื้อสายของมะเร็งปอด เริ่มจากการสกัดเมมเบรน โปรตีนจากเซลล์เชื้อสายปอดปกติและกลุ่มเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก ทั้งสามชนิดคือ Squamous carcinoma (SW900), Adenocarcinoma (NCI-H838) และ Large cell carcinoma (NCI-H661) จากการศึกษาพบว่า เมมเบรนโปรตีนและโปรตีนที่ทำงานร่วมในเซลล์เมมเบรน (membrane associated protein) ที่แสดงออกในมะเร็งปอดแต่ละชนิดในระดับที่แตกต่างกันอย่างเช่น Prohibitin, Annexin A1, Rho GDP-dissociation inhibitor 2 และ Transketolase แสดงออกในเซลล์เชื้อสายชนิด Squamous carcinoma มากกว่ามะเร็งปอดชนิดอื่นๆ ในขณะที่เซลล์เชื้อสายชนิด Adenocarcinoma มีการแสดงออกของ Annexin A1, Aldehyde dehydrogenase และ Endoplasmic reticulum chaperone ในระดับสูง ผลการศึกษานี้ยังพบว่า Alpha-enolase แสดงออกในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในระดับสูงกว่าเซลล์เชื้อสายปอดปกติ ซึ่งเมมเบรนโปรตีนเหล่านี้ อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ที่เฉพาะต่อมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กแต่ละชนิดย่อย และเพิ่มความรู้เกี่ยวกับกลไกในการเกิดการแพร่กระจายของมะเร็งปอด ดังนั้นการแสดงออกของไกลโคโปรตีน เมมเบรนโปรตีน และโปรตีนที่ทำงานร่วมใน

เซลล์เมมเบรน อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ที่มีศักยภาพและเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจ และประยุกต์ใช้ในการรักษาเบื้องต้นของมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์เล็ก