Thesis Title Identification and Characterization of Human Protein Recognized by a Polyclonal Antibody CM5 Raised Against Mouse p53 Tumor Suppressor Protein

Author Miss Benjamart Suradej

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Ratchada Cressey Advisor
Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Co-advisor

ABSTRACT

Early diagnosis of cancer is a key factor for the success of treatment. For this reason, identifying a highly sensitive and specific tumor marker is urgently needed. Inactivation of p53 tumor suppressor function is common in various types of human cancers. A number of p53 related proteins have been identified, including p63 and p73. In our previous study, the CM5 polyclonal antibody (CM5pAb) raised against p53 of mouse origin was used to identify p53 structurally related protein(s) that could play an important role in promoting or preventing lung cancer and potentially become a novel lung tumor marker. It was fortuitously discovered that CM5pAb reacted with an unknown human protein with an apparent molecular weight of 95 kDa in lung tumor tissues.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

This study aimed to identify the human unknown protein that could react with CM5pAb and to characterize the identified protein in term of its response to stress signals including genotoxic stress and ER stress in comparison with p53 tumor suppressor protein. The 95 kDa protein was immunoprecipitated by CM5pAb, resolved through SDS-PAGE, excised from gel and subsequently identified by liquid chromatography-tandem mass spectrophotometry (LC-MS/MS) to be glucosidase II, a key endoplasmic reticulum (ER) protein involved in the quality control mechanism of glycoprotein folding. Protein levels of glucosidase II were greatly increased in 35 of 37 (94.6%) human lung tissue samples assessed, with only minimal expression in normal corresponding adjacent tissues. A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line) was used as a cell model in order to investigate expression pattern of glucosidase II in response to UV-irradiation and tunicamycin-induced ER stress in comparison to p53. We have demonstrated that the pattern of changes of their protein levels in response to ER stress and genotoxic stress were similar. Protein levels of both p53 and glucosidase II were increased in response to UV irradiation, but decreased in response to tunicamycin-induced ER stress. However, while p53 was trans-located into the nuclease in response to UV irradiation, glucosidase II remained within the cytoplasm. Interestingly, there were small protein bands recognized by the anti-glucosidase II mAb whose nuclear levels were increased in response to both types of stress. Although these bands may be the degradation products of glucosidase II, their intensities were increased in response to the stress signals despite levels of the full-length protein thus suggesting their roles in stress response. Nevertheless, further investigations with better technology, i.e. immunofluorescence are needed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In conclusion, this thesis has successfully demonstrated that the human unknown protein reacted with the CM5pAb, is an ER-resident protein glucosidase II**.** The high frequency of glucosidase II overexpression in lung tumor tissues, which to our knowledge has not been previously described, indicates its crucial role in lung tumorigenesis and thus a valuable biomarker in aiding screening and/or diagnosis of lung cancer. However, further investigations on the underlying mechanism of the protein induction and its relationship with p53, genotoxic stress, ER stress and cellular transformation are warranted.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุชนิด และลักษณะของโปรตีนในมนุษย์ที่ทำปฏิกิริยาโพลีโคลนอลแอนติบอดีซีเอ็ม 5 ที่จำเพาะต่อโปรตีนต้านมะเร็ง พี 53 ของหนู

ผู้เขียน นางสาวเบญจมาศ สุระเดช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. รัชดา เครสซี่ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ.ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยโรคมะเร็งได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นเป็นปัจจัยหลักที่จะทำให้การรักษาประสบความสำเร็จ ดังนั้นการศึกษาเพื่อค้นหาสารบ่งชี้มะเร็งชนิดใหม่ที่มีความไวและความจำเพาะที่ดีขึ้นจึงมีความสำคัญ โรคมะเร็งหลายชนิดที่พบในคนพบว่ามักเกิดจากการหยุดการทำงานของยีนต้านมะเร็งที่ชื่อว่า p53 นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการค้นพบโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย p53 อันได้แก่ p63 และ p73 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย โดยการใช้แอนติบอดี CM5 ซึ่งเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนต้านมะเร็ง p53 ของหนู เพื่อศึกษาโครงสร้างของโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย p53 ซึ่งอาจจะมีส่วนสำคัญในการส่งเสริมหรือป้องกันมะเร็งปอด และอาจนำไปสู่การค้นพบสารบ่งชี้มะเร็งชนิดใหม่ พบว่าแอนติบอดี CM5 สามารถจับกับโปรตีนที่ไม่ทราบชนิดขนาดประมาณ 95 kDa ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของคนได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อระบุชนิดของโปรตีนซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแอนติบอดี CM5 ดังกล่าว และเพื่อศึกษารูปแบบการตอบสนองของโปรตีนนี้เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียด อันได้แก่ genotoxic stress และ ER stress เปรียบเทียบกับ p53

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการแยกบริสุทธิ์โปรตีนขนาด 95 kDa โดยการตกตะกอนด้วยแอนติบอดี CM5 จากนั้นนำไปแยกตามขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วจึงตัดเอาแถบแบนส่วนที่ต้องการออกจากเจล จากนั้นทำการระบุชนิดโปรตีนโดยอาศัยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวนี้คือ glucosidase II ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นโปรตีนที่พบใน endoplasmic reticulum (ER) มีหน้าที่ช่วยการพับทบของไกลโคโปรตีนให้ถูกต้อง จากการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของคนจำนวน 37 ราย พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้เพิ่มขึ้นถึง 35 ราย (94.6%) แต่จะมีระดับการแสดงออกที่ต่ำมากในเนื้อเยื่อปอดปกติ จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนชนิดนี้ในการตอบสนองต่อ genotoxic stress และ ER stress ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยยา tunicamycin โดยอาศัยเซลล์ A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line) เป็นเซลล์ต้นแบบ เปรียบเทียบกับโปรตีน p53 พบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดมีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายกัน กล่าวคือระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสัมผัสกับรังสี UV แต่จะมีระดับน้อยลงเมื่ออยู่ในภาวะ ER stress อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีน p53 มีการเคลื่อนย้ายไปยังนิวเคลียสหลังถูกกระตุ้นด้วยรังสี UV ในขณะที่โปรตีน glucosidase II ยังคงอยู่ในไซโตพลาสม ที่น่าสนใจก็คือมีการตรวจพบแบนของโปรตีนขนาดเล็กที่จับได้กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ glucosidase II โดยแบนของโปรตีนเหล่านี้จะมีระดับสูงขึ้นในนิวเคลียสภายหลังการถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดทั้งแบบ genotoxic stress และ ER stress ถึงแม้ว่าโปรตีนดังกล่าวอาจเป็นผลจากการสลายตัวของ glucosidase II แต่การที่ระดับของโปรตีนดังกล่าวสูงขึ้นเมื่อเซลล์เกิดความเครียด และการสูงขึ้นนี้ไม่ขึ้นอยู่กับระดับความมากน้อยของโปรตีน glucosidase II เต็มสายแสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวอาจมีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อความเครียด

โดยสรุปวิทยานิพนธ์นี้สามารถระบุชนิดของโปรตีนซึ่งจับได้อย่างจำเพาะด้วยแอนติบอดี CM5 ได้ประสบความสำเร็จว่าคือโปรตีน glucosidase II ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ใน ER การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของ glucosidase II ซึ่งเท่าที่ทราบยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน แสดงถึงบทบาทอันสำคัญของโปรตีนชนิดนี้ต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง จึงน่าจะใช้เป็นสารบ่งชี้มะเร็งที่สามารถใช้ในการตรวจกรอง และ/หรือ วินิจฉัยโรคมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน glucosidase II ในเนื้อเยื่อมะเร็ง และความสัมพันธ์ของโปรตีนดังกล่าวกับ p53, ภาวะ genotoxic stress, ภาวะ ER stress และกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved