ดวงนภา เดชจุ้ย : การควบคุมการแสดงออกของยีน Wilms' tumor (*WT1*) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ (REGULATION OF WILMS' TUMOR (*WT1*) GENE EXPRESSION IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIC CELL)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร.วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ
157 หน้า.

Wilms' tumor 1 (WT1) เป็น transcription factor ชนิดหนึ่ง มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมกลไกทางชีวภาพที่หลากหลาย การแสดงออกแบบ overexpression ของ WT1 พบได้ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิด เช่น Acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ Chronic myeloid leukemia (CML) ในการวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ในการควบคุมอัตราการเจริญเติบโต และการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis ด้วยการใช้เทคโนโลยี RNA interference (RNAi) โดยทำการออกแบบ small interference RNA (siRNA) ที่จำเพาะต่อ WT1 mRNA ขึ้นมาใหม่ ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เรียกว่า WT1-siRNA เพื่อใช้กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดย WT1-siRNA นี้ได้ถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pPRIME-CMV-GFP-FF3 ที่มี Green fluorescent protein (GFP) เป็นยีนบ่งชี้ จากนั้นทำการผลิต Lentivirus ด้วยเทคนิคตกตะกอนด้วยแคลเซียม ลำดับต่อมา ทำการนำไวรัสที่ผลิตได้เข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CML ชนิด K562 เซลล์มะเร็งที่ได้รับ WT1-siRNA และ C-siRNA จะถูกนำไปคัดเลือกเอาเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP ด้วยเครื่อง flow cytometry ทำให้ได้ K562-WT1-siRNA-GFP$^+$ และ K562-C-siRNA-GFP$^+$ และนำไปทำการทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโต การกระตุ้นการตายแบบ apoptosis และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระดับโมเลกุลต่อไป หลังจากทดสอบ พบว่า การแสดงออกของ WT1 mRNA ลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่ 72 ชั่วโมง ในเซลล์ K562-WT1-siRNA-GFP$^+$ นอกจากนี้ ยังพบการลดการแสดงออกของไซโตไคน์ ที่เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งได้แก่ Interleukin-2 (IL-2) และตัวรับของ IL-2 ซึ่งได้แก่ IL-2RB และ IL-2RG อีกด้วย ผลจากการลดการแสดงออกของ WT1 ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ถูกยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตที่ระยะเวลาการทดสอบที่ 3 6 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ซึ่งมีการยับยั้งโดยประมาณ 10±0% 12±10% 16±7.5% 25±6.5% 40±7.0% 44±9.5% และ 88±9.1% ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบการกระตุ้นเซลล์ในระยะ early apoptosis เพิ่มขึ้นอีกประมาณ 70% เมื่อเวลาการทดสอบผ่านไปเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น จากนั้นได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการกระตุ้นการเกิด apoptosis ด้วยการตรวจวัดหาค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ caspase-3/7 พบว่า มีการเพิ่ม activity ของเอ็นไซม์ caspase-3/7 จากประมาณ 507±32 Relative Fluorescent Unit (RFU) เป็น 1,487±425 RFU หรือประมาณสามเท่าในเวลาเพียง 48 ชั่วโมง อีกประการหนึ่ง จากการศึกษาพบว่า

การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis อันได้แก่โปรตีน caspase-7 เพิ่มขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้น จากการศึกษาผลของ WT1-siRNA ต่อการลดอัตราการเจริญเติบโตและการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยเด็ก ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ ALL subtype L1 (ALL-L1) พบว่า WT1-siRNA สามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ L1-WT1-siRNA ได้ประมาณ 79±14% ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบการทำงานของ caspase-3/7 พบว่ามีค่าเพิ่มสูงขึ้นจาก 1,823±347 RFU เป็น 5,104±836 RFU และมีการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน caspase-7 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบว่าเซลล์ได้เข้าสู่ขั้น early apoptosis จำนวน 36.6±6.35% และขั้น late apoptosis จำนวน 33.25±9.8% เมื่อเปรียบเทียบกับ L1-C-siRNA การเพิ่มขึ้นของโปรตีน caspase-7 เป็นการยืนยันผลการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยด้วย WT1-siRNA ขณะเดียวกันได้ทำการทดลองกับเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดีเพื่อเป็นกลุ่มควบคุม พบว่า WT1-siRNA ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญและการตายของเซลล์แต่อย่างใด WT1-siRNA สามารถลดระดับการแสดงออกของ WT1 IL-2 IL-2RB และ IL-2RG mRNA ได้ ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการศึกษาในระดับโปรตีน พบว่าโปรตีน WT1 ถูกลดการแสดงออกลงอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า WT1-siRNA ที่ได้ทำการออกแบบขึ้นมาใหม่ สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และกระตุ้น apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด cell line และ L1 primary leukemic cells ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวิจัยในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว หรือการทดสอบการรักษาโรคมะเร็งในคลินิกต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Chavaboon Dechsukhum
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

DUANGNAPA DEJJUY : REGULATION OF WILMS' TUMOR (*WT1*) GENE EXPRESSION IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIC CELL. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WILAIRAT LEEANANSAKSIRI, Ph.D. 157 PP.

Wilms' tumor 1 (WT1) is a zinc-finger transcription factor which plays crucial roles in various biological regulations. Overexpression of WT1 is observed in many types of hematopoietic malignancy such as acute lymphoblastic leukemia (ALL) and chronic myeloid leukemia (CML). This study aims to apply RNA interference technology for regulation of cell growth and apoptosis induction of leukemic cells. To this end, our new designed WT1-siRNA was cloned into pPRIME-CMV-GFP-FF3 plasmid vectors. Then, the lentiviral particles were produced by calcium precipitation method prior to transduction into CML cell line K562. The K562-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells and K562-C-siRNA-GFP$^+$ control cells were then sorted by flow cytometry and cell sorter method. Both collected cell populations were subjected to cell proliferation and apoptosis determinations. The results showed significant downregulation of WT1 mRNA expression at 72 hours post-transduction. In addition, the expression of cellular survival cytokine including Interleukin-2 (IL-2) and its receptor subunits (IL-2RB and IL-2RG) were also reduced. Moreover, the proliferation rates of K562-WT1-siRNA-GFP$^+$ cells at 3, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 hours post-transduction were inhibited for approximately 10±0%, 12±10%, 16±7.5%, 25±6.5%, 40±7.0%, 44±9.5%, and 88±9.1%, respectively. Interestingly, we found that WT1-siRNA can induce an early apoptosis for approximately 70% at 12 hours post-transduction. This result was confirmed by the study of caspase-3/7 enzymes activities. The activities of

caspase-3/7 were significantly increased from 507±32 Relative Fluorescent Units (RFU) to 1,487±425 RFU or approximately 3-fold within 48 hours, which was supported by caspase-7 protein expression using western blot analysis. Moreover, the study of the effects of WT1-siRNA on primary childhood acute lymphoblastic leukemic cells subtype L1 (ALL: L1) showed a significant inhibitory effect of WT1-siRNA on the L1-WT1-siRNA leukemic cells of about 79±14% after 48 hours post-transduction. The caspase-3/7 enzyme activities were significantly accelerated from 1,823±374 RFU to 5,104±836 RFU. Furthermore, WT1-siRNA also significantly upregulated caspase-7 protein expression and increased the amount of an early apoptosis population of L1-WT1-siRNA cells by 36.63±6.35% and late apoptosis by 33.25±9.8% when compared with L1-C-siRNA cells. These results also consisted by upregulation of caspase-7 protein expression by WT1-siRNA in the transduced cells. On the other hand, WT1-siRNA has no significant effect on proliferation and apoptosis of normal blood cells. The WT1-siRNA also downregulated WT1, IL-2, IL-2RB and IL-2RG mRNA expressions. Consistently, the level of WT1 protein expression was suppressed by WT1-siRNA. Altogether, these findings suggest that our new designed WT1-siRNA could effectively inhibit cellular growth and induce leukemic cell death by apoptosis in both leukemic cell lines and L1 primary leukemic cells. The applications of this work are future therapeutic value and clinical trials in leukemic treatment.

School of Microbiology

Academic Year 2013

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature Chavaboon Deehsukhum

Co-advisor's Signature _____