

เป็นหนังสือภาษาอังกฤษ



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศึกษาการทำงานของ truncated WT1 และ WT1 ที่เกี่ยวข้อง
กับกระบวนการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

โดย ดร.พจนพร ไกรดิษฐ์ และคณะ

กรกฎาคม 2552

Project Code: MRG5080354

Project Title: Establishing a Role for a Novel Truncated WT1 and Full Length WT1 on Apoptosis in Breast Cancer Cells (MCF-7)

Investigator: Dr.Potchanapond Graidist
Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University

E-mail Address: gpotchan@medicine.psu.ac.th, vbioth@yahoo.com

Project Period: 2 July 2007 – 1 July 2009 (2 years)

Abstract

WT1 gene encodes a transcription factor involve in normal cellular development and cell survival. This gene expresses in wide variety of cancers including leukemia, breast and colon cancer. Alternative splicing of WT1 transcript generates four major protein isoforms and thirty six minor protein isoforms. WT1 gene has been considered as a tumor suppressor gene and anti-apoptotic protein. However, the mechanism of WT1 in breast cancer remains unclear. Since, WT1 has many isoforms and different isoform has different functional properties, truncated WT1 (KTS+ and KTS-), WT1 exon6-10 (KTS+ and KTS-) and full length WT1 (WT1(17AA+)(KTS+) and WT1(17AA+)(KTS-)) were constructed into pcDNA6/V5 vector and transfected into MCF-7 cell. Truncated WT1 transcript encodes a protein that retains intact DNA-binding zinc finger domain but lacks the transcription repression (exon1-5), whereas full length WT1 transcript encodes the whole WT1 protein (exon1-10). Transfected cells were clonally selected using 5 µg/ml blasticidine. WT1 protein level was characterized by Western blot analysis. MCF-7 overexpressing cells that stably expressed WT1s were exposed to 1 µM doxorubicin. The mortality of cells was determined by trypan blue assay. The results showed that overexpression of truncated, exon6-10 and full length WT1s protected cells from doxorubicin induced cell death. Therefore, we further studied apoptotic molecule which related in apoptosis pathway. The expression of apoptotic caspase-7 was decreased by the expression of all types of WT1. These results indicated that truncated WT1 (KTS+ and KTS-), WT1 exon6-10 (KTS+ and KTS-) and full length WT1 (WT1(17AA+)(KTS+) and WT1(17AA+)(KTS-)) could function as anti-apoptotic protein.

Keywords: apoptosis, MCF-7, truncated WT1, WT1

Project Code: MRG5080354
Project Title: ศึกษาการทำงานของ truncated WT1 และ WT1 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)
Investigator: ดร.พจนพร ไกรดิษฐ์
ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
E-mail Address: gpotchan@medicine.psu.ac.th, vbioth@yahoo.com
Project Period: 2 กรกฎาคม 2550 - 1 กรกฎาคม 2552 (2 ปี)

บทคัดย่อ

ยีน WT1 เป็นยีนที่มีส่วนของ transcription factor ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ปกติ และการมีชีวิตรอดของเซลล์ ยีนนี้มีการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ เป็นต้น การเกิด alternative splicing ของ ยีน WT1 ทำให้ WT1 มีโปรตีน 4 ไอโซฟอร์มหลักและ 36 ไอโซฟอร์มย่อย มีรายงานว่ายีน WT1 สามารถทำหน้าที่ได้ทั้งยีนส่งเสริมมะเร็ง (tumor suppressor gene) และยีนต้านมะเร็ง (oncogene) แต่หน้าที่ของ WT1 ในมะเร็งเต้านมยังไม่แน่ชัด และจากการที่ WT1 มีหลายไอโซฟอร์มและแต่ละไอโซฟอร์มมีหน้าที่ที่ต่างกัน การศึกษาในครั้งนี้จึงได้นำ truncated WT1 (ชนิด KTS+ และ KTS-), WT1 exon6-10 (ชนิด KTS+ และ KTS-) และ WT1 เต็มเส้น (ชนิด WT1(17AA+)(KTS+) และ WT1(17AA+)(KTS-)) เชื่อมต่อกับพลาสมิด pcDNA6/V5 และนำเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยที่ truncated WT1 ประกอบด้วยส่วน DNA-binding zinc finger domain แต่ไม่มีส่วน transcription repression (exon 1-5) ในขณะที่ WT1 ชนิดเต็มเส้นประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด (exon 1-10) ทำการเลือก MCF-7 ที่มียีน WT1 ด้วยยาปฏิชีวนะ blasticidine ความเข้มข้น 5 µg/ml และตรวจสอบปริมาณโปรตีน WT1 ด้วยวิธี Western blot analysis จากนั้นนำเซลล์ MCF-7 ที่มีการแสดงออกของ WT1 แบบถาวรมาศึกษาการตายด้วยวิธี Trypan blue assay โดยใช้ยา doxorubicin ที่ความเข้มข้น 1 µM จากการทดลองพบว่า truncated WT1, WT1 exon6-10 และ WT1 เต็มเส้นสามารถป้องกันเซลล์ MCF-7 จากการตายด้วยยา doxorubicin ได้ และจากการศึกษาเพิ่มในส่วนของโมเลกุลที่อยู่ในกระบวนการตายแบบอะพอพโทสิส (apoptosis) พบว่าการแสดงออกของ truncated WT1, WT1 exon6-10 และ WT1 เต็มเส้นมีผลทำให้ caspase-7 แสดงออกลดลง จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า truncated WT1 (ชนิด KTS+ และ KTS-), WT1 exon6-10 (ชนิด KTS+ และ KTS-) และ WT1 เต็มเส้น (ชนิด WT1(17AA+)(KTS+) และ WT1(17AA+)(KTS-)) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนต้านการตายแบบอะพอพโทสิส (anti-apoptotic protein)

Keywords: อะพอพโทสิส, MCF-7, truncated WT1, WT1