รายงานสรุปผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยหลังปริญญาเอกในต่างประเทศ
สัญญาเลขที่ IPD4680004

เรื่อง

"The molecular genetics of mammary carcinogenesis in the rat"

โดย นายปีติ ธุวจิตต์

ปฏิบัติงานวิจัยที่

Professor Micheal N. Gould's lab

McArdle Laboratory for Cancer Research,

University of Wisconsin-Madison

Madison, Wisconsin, USA

ระหว่างวันที่

30 เมษายน พ.ศ. 2546 ถึง 29 เมษายน พ.ศ. 2547

คำนำ

การทำงานวิจัยเป็นแนวทางสำคัญสำหรับการสร้างองค์ความรู้ใหม่ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาประเทศ และเป็นประโยชน์ต่อมนุษยชาติโดยทั่วๆ ไป การไปศึกษาวิจัยในประเทศไทยยังมีข้อจำกัดอีกมากในปัจจัยต่างๆ ทั้งทางทุนทรัพย์และเครื่องมือที่ใช้ การเพิ่มพูนทักษะความรู้ทางการวิจัยภายหลังปริญญาเอกในต่างประเทศที่มีการพัฒนามากกว่าประเทศไทยจึงมีความสำคัญ นอกจากการเพิ่มโลกทัศน์แก่ผู้ทำวิจัยให้รู้ถึงแนวทางสากลของงานวิจัยแล้ว ยังเป็นโอกาสให้ผู้วิจัยได้ติดต่อและเชื่อมโยงงานวิจัยที่ทำกับสถาบันวิจัยที่มีศักยภาพสูง ดังนั้น ผู้วิจัยถือว่าเป็นโอกาสอันดีอย่างยิ่งที่ได้รับทุนวิจัยหลังปริญญาเอกในต่างประเทศ จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้การสนับสนุนจากมูลนิธิอีริกสันแห่งประเทศไทย ให้ไปปฏิบัติงานศึกษาวิจัยที่ McArdle laboratory for cancer research, มหาวิทยาลัยวิสคอนซิน-เมดิสัน, เมืองเมดิสัน, รัฐวิสคอนซิน, ประเทศสหรัฐอเมริกา ในหัวข้อเรื่อง "กลไกทางอณูพันธุศาสตร์ของการเกิดมะเร็งเต้านมในหนู rat" (The molecular genetics of mammary carcinogenesis in the rat) เป็นเวลา 1 ปี แม้ว่าผู้วิจัยจะไม่ได้ทำงานวิจัยในหัวข้อที่ได้ทำในประเทศไทย คือ การศึกษาในมะเร็งท่อน้ำดี แต่ผู้วิจัยก็ได้รับความรู้และทักษะของการทำวิจัยเกี่ยวกับมะเร็ง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์กับการศึกษาวิจัยในประเทศไทยต่อไปได้

งานที่ผู้วิจัยได้ทำที่สหรัฐอเมริกานั้น สืบเนื่องมาจากที่แลบที่ผู้วิจัยได้ไปทำงานนั้น เป็นแลบแรกในโลกนี้ที่ได้ทำการผลิตหนู rat ที่มีการกลายพันธุ์แบบขับยั้งการสร้างโปรตีน (Knockout rat) ของจีน *brca2* ซึ่งเป็นจีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านม จีน *brca2* นี้ปกติจะเป็นจีนต่อต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ซึ่งเมื่อมีการยับยั้งการสร้างโปรตีน BRCA2 ทำให้หนู rat ชนิดนี้มีโอกาสเกิดมะเร็งเต้านมได้มากกว่าหนู rat ปกติ โดยที่หนู rat มีความใกล้เคียงมนุษย์มากกว่าหนู mouse การศึกษาในหนู knockout rat นี้จึงถือเป็นการพัฒนาการศึกษามะเร็งในสัตว์ทดลองที่ก้าวหน้าอีกขั้นหนึ่ง ผู้วิจัยได้มีโอกาสศึกษาการกลายพันธุ์นี้ (ซึ่งมีการเปลี่ยนสัญญาณการสร้างจากกรดอะมิโน tyrosine ที่ตำแหน่ง 1418 ไปเป็นสัญญาณหยุดสร้าง ทำให้ขนาดของโปรตีน BRCA2 เล็กลงจาก 380 กิโลดาลตัน ไปเป็น 150 กิโลดาลตัน) ว่ามีการแสดงออกเป็นโปรตีนขนาด 150 กิโลดาลตันหรือไม่แสดงออกเลยหรือมีการข้ามตำแหน่งนี้และแสดงออกอย่างปกติ (380 กิโลดาลตัน) ซึ่งผลการวิจัยพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน BRCA2 ขนาด 150 กิโลดาลตันในหนู rat ที่มีการกลายพันธุ์ของจีน *brca2* ทั้งบนโครโมโซมข้างเดียว (heterozygous mutation) หรือทั้งสองข้าง (homozygous mutation) ขณะที่โปรตีน BRCA2 ขนาดปกติจะไม่มีการแสดงออกในหนู rat ที่มีการกลายพันธุ์บนโครโมโซมทั้งสองข้างเลย

นอกจากงานวิจัยนี้แล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำงานวิจัยชิ้นที่สอง คือการผลิตเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิไฟโบรบลาสท์จากตัวอ่อนหนู rat (Primary culture of rat embryonic fibroblast) ที่มีการกลายพันธุ์

ของจีน *brca2* นี้เพื่อพัฒนาให้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่คงทน (immortal cell line) และทดสอบความไวต่อการฉายรังสี ซึ่งผลงานที่ได้ คือ ได้เซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของจีน *brca2* บนโครโมโซมทั้งสองข้าง และได้เซลล์เพาะเลี้ยง 17 ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของจีน *brca2* บนโครโมโซมทั้งข้างเดียว โดยเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้มีความไวต่อการฉายรังสีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของจีน *brca2*

สำหรับงานวิจัยชิ้นที่ 3 ซึ่งต้องการศึกษาส่วนควบคุมการทำงาน (promoter) และการแสดงออก (expression) ของจีนควบคุมการสร้างโปรตีน methylguanine methyltransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการซ่อมแซมความผิดปกติของดีเอ็นเอ (DNA repairing enzyme) โดยจะมีการแสดงออกต่ำในหนู rat ที่ยังไม่โตเต็มที่ ซึ่งมีโอกาสเกิดมะเร็งเต้านมมากกว่าหนู rat ที่โตเต็มที่แล้ว ถึงขณะนี้ผู้วิจัยได้แยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ต่อมน้ำนมของหนูอายุ 3 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์โดยยังไม่ได้ทำงานวิจัยใดๆ อันเนื่องมาจากเวลาที่จำกัดจึงไม่สามารถทำต่อได้ แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยทั้งหมดนี้ทางแลบจะได้ทำต่อไปจนเสร็จ ส่วนผู้วิจัยก็ได้รับทราบแนวคิดของการสร้างงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการสร้างงานวิจัยในประเทศไทยต่อไป

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณทางต้นสังกัดของผู้วิจัย คือ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้โอกาสแก่ผู้วิจัยในการรับทุน และไปปฏิบัติงานวิจัย ทางสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมูลนิธิอีริกสัน ประเทศไทย ที่ได้สนับสนุนทุนให้ไปปฏิบัติงานวิจัย และทาง Professor Micheal Gould เจ้าของแลบ และ Professor Norman Drinkwater ผู้อำนวยการ McArdle laboratory for cancer research, มหาวิทยาลัยวิสคอนซิน-แมดิสัน ที่ได้ให้โอกาสในการทำงานวิจัยนี้พร้อมทั้งทุนบางส่วนให้ผู้วิจัย ผู้วิจัยจะได้ใช้ความรู้และทักษะการทำงานวิจัยที่ได้มาในการสร้างงานวิจัยที่ดีในประเทศไทยต่อไป

ปีติ ธุวจิตต์
ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Introduction	3
Project 1	5
"Assay of truncated BRCA2 protein expression and its interaction with RAD51 protein in knockout BRCA2 rat"	
• Objectives	5
• Study design	5
• Materials and Methods	5
• Results and Discussions	8
• Further works	8
Project 2	9
"Radio sensitivity test of primary culture embryonic fibroblast comparing between BRCA2 knockout homozygote, heterozygote and wild type rats"	
• Objectives	9
• Study design	9
• Materials and Methods	9
• Results and Discussions	18
• Further works	19
Project 3	20
Analysis of methylguanine methyltransferase expression comparing between immature and mature rats	
• Objectives	20
• Study design	20
• Materials and Methods	20
• Results and Discussions	21

- Further works 21

Summaries 22

The applicable advantages 23

Acknowledgements 23

References 23

รายงานการเงิน 24

List of Figures

	หน้า
Figure 1 Standard curve of MTS assay	15
Figure 2 Growth curve of 3 genotypes PREF in irradiation assay	18

List of Tables

	หน้า
Table 1 Genotype of primary rat embryonic fibroblast (PREF)	14
Table 2 Genotype and number of passage of PREF in irradiation assay	16
Table 3 OD490 from MTS assay of PREF in irradiation assay	17

รายงานสรุปผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอกในต่างประเทศ สัญญาเลขที่ IPD4680004

เรื่อง "The molecular genetics of mammary carcinogenesis in the rat"

บทคัดย่อ

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่มีความสำคัญ เนื่องจากพบมากทั่วโลก รวมถึงในประเทศสหรัฐอเมริกาและในประเทศไทยด้วย การศึกษากระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมสามารถศึกษาในสัตว์ทดลอง แต่เดิมจะศึกษากันมากในหนู mouse แต่ในปัจจุบันการศึกษาได้ก้าวหน้าขึ้นโดยได้มีการศึกษาในหนู rat ซึ่งมีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากกว่าหนู mouse กระบวนการเกิดมะเร็งเต้านมนั้นมีความเกี่ยวพันกับจีนหลายชนิด ทั้งจีนที่พิสูจน์แน่แล้วว่าเกี่ยวพันกับกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม ได้แก่ จีนควบคุมการสร้าง BRCA2 และจีนที่สงสัยว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งเต้านม ได้แก่ จีนควบคุมการสร้าง methylguanine methyltransferase โดยที่ BRCA2 เป็นโปรตีนกลุ่มยับยั้งการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor protein) หากเกิดการกลายพันธุ์อันทำให้มีการแสดงออกของจีนควบคุมการสร้าง BRCA2 ลดลง พบว่าจะเพิ่มโอกาสในการเกิดมะเร็งเต้านมมากขึ้นในทั้งมนุษย์และสัตว์ทดลอง การศึกษาใน Y1418- BRCA2-knockout rat ซึ่งเป็น knockout rat สายพันธุ์แรกในโลกซึ่งพัฒนาโดย Professor Micheal Gould's Lab, McArdle laboratory for cancer research, UW-Madison พบว่าหนู rat ที่มีการกลายพันธุ์ของจีน BRCA2 มีโอกาสที่จะเกิดมะเร็งเต้านมได้มากกว่าหนูปกติ จากการศึกษาของผู้วิจัยพบว่า แม้ว่าจะมีการกลายพันธุ์แบบ nonsense mutation ของจีน BRCA2 ที่ตำแหน่ง 1418 แต่ก็มีการแสดงออกของโปรตีนขนาดสั้นแทน ไม่ได้หมดการแสดงออกโดยสิ้นเชิง นอกจากนี้ primary cultural embryonic fibroblast ซึ่งแยกได้จาก embryo ของ heterozygous Y1418- BRCA2 rat parents ทั้งที่มีการกลายพันธุ์แบบ homozygous, heterozygous และแบบที่ไม่มีการกลายพันธุ์ พบว่าทั้ง 3 ชนิดตอบสนองต่อการฉายรังสีที่ 4, 8 และ 12 Gy ไม่แตกต่างกันชัดเจน

ขณะที่ methylguanine methyltransferase เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการซ่อมแซมความผิดปกติของดีเอ็นเอ (DNA repairing enzyme) ซึ่งจีนควบคุมการสร้าง methylguanine methyltransferase นั้นมีการแสดงออกต่ำในหนู rat ที่ยังไม่โตเต็มที่ ซึ่งมีโอกาสเกิดมะเร็งเต้านมมากกว่าหนู rat ที่โตเต็มที่แล้ว ถึงขณะนี้ผู้วิจัยได้แยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ต่อมน้ำนมของหนูอายุ 3 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ ซึ่งจะต้องทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างบริเวณ promoter ของจีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ methylguanine methyltransferase ในด้าน methylation ต่อไป

Final report

TRF-UW Postdoctoral Research Scholar : IPD4680004

"The molecular genetics of mammary carcinogenesis in the rat"

Abstract

Breast cancer is an important disease in both Thailand and USA. Breast carcinogenesis study is now in advance, progress from mouse to rat which is the more related specie to human. Breast cancer is a disease caused from abnormal genes, for example, BRCA2 gene which is a tumor suppressor gene, and methylguanine methyltransferase gene which is a DNA repair gene. For BRCA2 gene, previous studies showed that nonsense mutation of this gene leading to more breast cancer susceptibility in both human and animal models. Study in Y1418- BRCA2-knockout rat that is the first knockout rat in the world, developed by Professor Micheal Gould's Lab, McArdle laboratory for cancer research, UW-Madison, found that mutant rats have more chance to be mammary cancer. My finding is that the truncated protein is still expressed. And all 3 genotypes of primary cultural embryonic fibroblast from heterozygous Y1418- BRCA2-knockout rat parents (homozygous mutant, heterozygous mutant and wild type) showed the similar pattern in response to 4, 8 and 12 Gy radiation.

While methylguanine methyltransferase is a DNA repairing enzyme. Its deficiencies in immature rat results in the increase of breast cancer risk when expose to carcinogen. Now a day, my work finished the extraction of genomic DNA from mammary gland of 3-week-old rat and 8-week-old rat. Further work is the comparison of DNA methylation in promoter region of methylguanine methyltransferase gene.

Introduction

Breast cancer is a high incident cancer among worldwide. In Thailand the incident rate is about 20 per 100,000 people and it is higher in USA as about 80 per 100,000 people. So the study of breast carcinogenesis is very important for the better treatment and control of breast cancer. As breast cancer is a genetic related disease, for breast carcinogenesis study, genetic manipulated animal model is a powerful tool for searching the carcinogenesis mechanism pathway. Rat is an animal model that close to human than mouse and also can be manipulated its genetic material. BRCA2 knockout rat, firstly introduced by our lab, is a very useful model in breast carcinogenesis study (1). BRCA2 gene, a tumor suppressor gene, is a well known breast cancer associated gene. Previous studies showed that nonsense mutation of this gene leading to more breast cancer susceptibility in both human and animal models (2). BRCA2 knockout rat in our lab has a T4254A transversion leading to Y(TAT)1418-(TAA) nonsense mutation. The properties of this BRCA2 knockout rat have not been identified yet. In this study, we aim to characterize some properties of this rat as following:

1. Does truncated BRCA2 express in this BRCA2 knockout rat?
2. If it expresses, does it contain regular properties of normal BRCA2, eg. the interaction with RAD51 protein?
3. Does this mutated BRCA2 gene alter growth property of cells containing it?

Moreover than BRCA2, methylguanine methyltransferase gene is also breast cancer related gene. Methylguanine methyltransferase gene is a DNA repair gene. This gene is a prognostic marker using in clinical practice of breast cancer management (3, 4). From our previous study, methylguanine methyltransferase expression is deficient in immature rat and resulting to the increase of breast carcinogenesis when expose to carcinogen. In this study, we design to study methylguanine methyltransferase gene in aspect of its regulation of gene expression at 2 levels. Firstly, at gene or DNA level, we will study the cytosine methylation in the promoter region of this gene. And, secondly, we will study the mRNA expression of methylguanine methyltransferase gene comparing between immature and mature female rats.

Because of my lab is a big one that has a lot of interest in "The molecular genetics of mammary carcinogenesis in the rat", so I had research topic of "Analysis of two breast carcinogenesis related genes, BRCA2 and methylguanine methyltransferase in rat" that composed of 3 projects,

1. Assay of truncated BRCA2 protein expression and its interaction with RAD51 protein in knockout BRCA2 rat
2. Radio sensitivity test of primary culture embryonic fibroblast comparing between BRCA2 knockout homozygote, heterozygote and wild type rats
3. Analysis of methylguanine methyltransferase expression comparing between immature and mature rats

For my own condition, it was hardly to finish all 3 projects within 1 year. So I just only involve in the setting up of the lab methods and prepare cell line then the rest of the work will be continued by my colleague in Gould's lab. I would like to present the whole research aspects but only my own results in the next parts.

Project 1

Assay of truncated BRCA2 protein expression and its interaction with RAD51 protein in knockout BRCA2 rat

Objectives

1. To study truncated BRCA2 protein expression in BRCA2 knockout rat organ.
2. To study the interaction between truncated BRCA2 and RAD51 proteins in knockout BRCA2 rat.

Study design

We propose to extract crude protein from various tissues from 3 genotypes of Sprague Dawley rat; wild type, heterozygous Y1418- BRCA2, and homozygous Y1418- BRCA2 rat. The tissues used in this experiment are testis, spleen, mammary gland, and kidney for male rat and spleen, mammary gland, and kidney for female rat. Testis, spleen, and mammary gland are reported as positive for BRCA2 expression and kidney is the negative organ. The crude extracts will be separated using standard sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) and then the protein will be transferred to nitrocellulose membrane using standard Tawbin's method. The proteins will be analyzed with anti-mouse BRCA2a antibody (5) using standard immunodetection method. The crude extracts will be also precipitated using anti-RAD51 antibody and then performed standard immunobloting using anti-mouse BRCA2a antibody.

Materials and Methods

1. Samples preparation

Rats

1. One male of wild type Sprague Dawley rat
2. Two male of heterozygous Y1418- BRCA2 male Sprague Dawley rats
3. Two male of homozygous Y1418- BRCA2 male Sprague Dawley rats

Reagents

Total protein lysis buffer : 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM DTT, 80 mM β-glycerophosphate, 10 mM EGTA, 100 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 pH 7.9 + protease inhibitor

2X sample buffer : (0.25 M) Tris, 20% (v/v) Glycerol, 4% SDS 10% (v/v) β-mercaptoethanol, 0.001% (w/v) bromophenol blue pH 6.8

Methods

1. Rats were killed using euthanasia with CO_2 inhalation and testes, spleens and mammary glands were collected.
2. Crude proteins from each organ were extracted separately.
3. Tissues size ~200 mg with 1 ml of total protein lysis buffer were homogenized with tissue homogenizer.
4. The suspensions were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and keep supernatant.
5. Proteins were aliquot and diluted 1:100 then determined amount using Bradford reagent and microplate (300 µl reagent and 10 µl diluted sample).
6. Protein solutions were mixed with 2X sample buffer.
7. Keep protein solutions at -80°C and protein solutions with sample buffer at -20°C.
8. Mouse testis was used as positive control.

2. SDS-PAGE

Use 4-8 % Discontinuous polyacrylamide gel

Reagents

Gel solutions

1. 1.5 M Tris-HCl (121.1) pH 8.8
2. 1.0 M Tris-HCl, pH 6.8
3. 10% SDS
4. Acrylamide/Bis (30/0.8)
5. 10% Ammonium persulfate

SDS-PAGE running buffer

0.3% (w/v) Tris Base, 1.5% (w/v) Glycine, 1 % (v/v) SDS , pH 8.3 (no pH adjustable need)

Gel running condition

120 V, room temperature, 90 minutes

3. Western blot analysis

Reagents

Modified Towbin Running Buffer

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.05% SDS, pH 8.5, 10% Methanol.

Methods

1. Stacking gels were removed.
2. Membranes were nitrocellulose membrane (PROTRAN®, Schleicher & Shuell).
3. Protein transfer condition was modified standard Towbin's method with 40 mA constant current for 24 hr in cold room with ice.
4. Optional : Gels were stain with rapid Coomassie blue staining and membranes were stain with fast green staining. Membrane staining will inhibit peroxidase signal from molecular weight marker.
5. Membranes were washed with TBST 3x5 min and kept in 5 ml of 5% skim milk in TBST at -20°C.

4. Immunodetection

Reagents

10x TBS = 87.6 g NaCl (58.44) + 7.33 g Tris (121.1) + DW to 1 l pH 7.4

20x Tween 20 = Tween 20 20 ml + DW to 1 l

TBST = 10x TBS 100 ml + 20x Tween 50 ml + DW to 1 l

Skim milk

Immunodetection

1. Separate membrane at below 80 kDa marker band.
2. Wash both membranes with TBST 5 min X 3.
3. The upper part was incubated with ~2 ml of new 2μg/ml anti mouse BRCA2 A polyclonal Ab (gift from Chodosh's lab, Department of Molecular and Cellular Engineering, University of Pennsylvania School of Medicine; reference No. 5) in 5% skim milk TBST at room temperature for 60 min.
4. The lower part was incubated with 1 ml of new 1:1000 anti α-tubulin monoclonal Ab in 5% skim milk TBST at room temperature for 60 min.
5. Both parts were washed with TBST for 5 min x 3.

6. Upper part membrane was incubated with new 1:1000 ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, peroxidase conjugated Ab (Pierce # 31460) in 5% skim milk TBST 3 ml at room temperature for 60 min.
7. Lower part membrane was incubated with new 1:1000 goat anti-mouse IgG, peroxidase conjugated Ab in 5% skim milk TBST 1 ml at room temperature for 60 min.
8. Membranes were washed with TBST for 5 min x 3.
9. Membranes were incubated with chemiluminescent substrate 1:1 for 1-2 min.
10. Signal was detected with autoradiography (1 min).

Results and Discussions

1. Only rat testis was detected the positive band. Mammary gland and spleen are negative.
2. Truncated protein (~150 kDa) can be detected in heterozygous and homozygous rat testes.
3. Full length rat BRCA2 is difficult to be detected by anti mouse BRCA2 A antibody.

Further works

We proposed to do the immunoprecipitation using anti-RAD51 antibody followed by western blot analysis to detect truncated BRCA2 protein in testis to determine the interaction between truncated BRCA2 protein and RAD51 protein.

For the detection of truncated BRCA2 in other organs and in female rat, it is not necessary to do because the western blot analysis method is not sensitive enough. The more sensitive method is RT-PCR may be done but only my results can demonstrated that truncated BRCA2 can be expressed.

Project 2

Radio sensitivity test of primary culture embryonic fibroblast comparing between BRCA2 knockout homozygote, heterozygote and wild type rats

Objectives

1. To produce 3 types of primary culture embryonic fibroblast cells; wild type, heterozygous BRCA2 knockout and homozygous BRCA2 knockout and try to make them to be immortal cell lines.
2. To assay and compare the radio sensitivity test of these cells.

Study design

We propose to individually prepare primary cultural fibroblast from rat embryos separated from three 14 to 15 day-pregnant heterozygous Y1418- BRCA2 Sprague Dawley female rats mated with heterozygous Y1418- BRCA2 Sprague Dawley male rats. All fibroblasts will be cultured until enough to keep in liquid nitrogen using regular method. All fibroblast lines will be analyzed for the genotype using DNA sequencing method. All lines will be performed with radio sensitivity test. Some lines of wild type, heterozygous Y1418- BRCA2, and homozygous Y1418- BRCA2 will continuously passage to develop immortal cell lines.

Materials and Methods

1. Preparation of primary cultural rat embryonic fibroblasts (PREF)

Rats

1. Three of 14 to 15 day-pregnant heterozygous Y1418- BRCA2 Sprague Dawley female rats mated with heterozygous Y1418- BRCA2 Sprague Dawley male rats.

Materials

For embryo collection

1. Sterile PBS added with penicillin-streptomycin (1:100) 10 ml was placed in 50 ml tubes.

For fibroblast isolation and collection

1. DMEM (DMEM + 10% heat-inactivated fetal calf serum + 800 µl gentamicin)
   Heat-inactivated fetal calf serum prepared by incubate serum at 55°C for 30 min
2. PBS

3. 0.25% trypsin, 0.002% (20 µg/ml) DNase I, penicillin-streptomycin (1:100) [using 0.5% trypsin diluted with PBS]
4. 75 cm^2 flasks
5. Surgical blades
6. Needles with 1 syringe
7. Forceps
8. 10 cm petri-dishs
9. 4×4" 53 µm nylon mesh

For cell storage

1. 0.25% trypsin
2. PBS
3. Collecting medium (90% FCS + 10% DMSO)
4. Tryptan blue
5. 1.5 ml microcentrifugal tube
6. 1.8 ml Cryotubes
7. 50 ml centrifugal tube.

Methods

Embryo collection

1. Rats were killed using euthanasia with CO_2 inhalation.
2. Rats abdominal wall were opened using sterile scissors and forceps then uteruses were identified. Each embryo (number for each rat = 17, 17 and 8) was cut using the same scissors and picked up to PBS-ATB (all were in same tube).
3. Rats were placed into the refrigerator and embryos were carried room temperature.

Fibroblast isolation and collection

1. Each embryo was processed separately. Each lot was done by 4 embryos.
2. Embryo was cut from uterus using new needle and same forceps that flamed each time. This process was done in 1 site of petri-dish.
3. Embryo was washed one time with PBS in the other site on petri-dish.
4. PBS was suctioned and placed with 10 ml trypsin-DNase solution.
5. Embryo was chopped using new surgical blade and carries to 50 ml tubes using pasture pipette.
6. Chopped embryo in trypsin-DNase was incubated with shaking at 37°C for 15 minutes.

7. After embryo was finished incubation, the solution was mixed using pipette, then the solution was filtered through nylon mesh to 50 ml tubes.
8. 4 cell suspensions were centrifuge at 4000 rpm (~2600 g) for 5 minutes.
9. Cells were resuspended in 15 ml DMEM and plated in 75 cm^2 flask.
10. Cells were cultured in 5% CO_2 incubator with humidifier.
11. After this step then the other 4 embryos were processed until finish.
12. The next day, each flask was washed with PBS and the medium was changed.
13. The cells were continuously passage until enough to storage.

Cell collection and storage

1. Cells were observed under inverted microscope at 10×10 magnifications.
2. Cell was washed with PBS.
3. Cell was trypsinized using 0.5 ml of 0.25% trypsin per 25 cm^2 area.
4. The reaction was stop by adding 5 ml of DMEM per 0.5 ml of trypsin.
5. Cell suspension was collected in 50 ml tube but left some for continuing culture.
6. 10 μl of cell suspension was aliquot and mixed with tryptan blue 1:1.
7. Cell count was performed.
8. Cell suspension was spun down and 1.8 ml of collecting medium per 2×10^6 cells was added and the cells were resuspended.
9. Each 1.8 ml was aliquot to each cryotube.
10. Cells were placed in 4°C for 1 hour.
11. Cells were placed in -20°C for 2 hours.
12. Cells were placed in -80°C overnight.
13. Cells were kept in liquid nitrogen.

Note During passing the cell, some cells could not be grown and some cells were contaminated with fungus. At last only 29 cells left and labeled as following:

1-1, 1-2, 1-3, 1-5, 1-9, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-16, 1-17, 2-3, 2-5, 2-6, 2-10, 2-11, 2-12, 2-14, 2-15, 2-16, 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, A13

All cells were prepared for DNA sequencing

2. DNA sequencing

DNA extraction

Reagents

1. Lysis solution : 10 mM NaCl, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1%SDS, pH 8.0 : Autoclave
2. 10mg/ml RNase A
3. 10mg/ml proteinase K
4. 6.25 M ammonium acetate : Autoclave
5. Isopropanol
6. 70% Ethanol
7. TE : 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0 : Autoclave

Methods

1. Add 500 ul of lysis solution to the cell pellet
2. Add 10 ul of RNase A
3. Vortex and incubate at 37°C for 1 hour
4. Add 10 ul of proteinase K
5. Mix and incubate at 37°C overnight
6. Mix and place the mixture in freezer until freeze
7. Thaw at RT then add 200 ul of 6.25 M ammonium acetate
8. Vortex vigorously for 60 sec
9. Place the mixture in the freezer for 10 min
10. Vortex again for 30 sec and centrifuge at 13,000 rpm for 5 min
11. Take supernatant to new 1.5 ml tube, discard pellet
12. Add 700 ul of isopropanol and mix by invert 50 times
13. Centrifuge 13,000 rpm for 12 min
14. Discard supernatant
15. Add 1 ml of cool 70% ethanol and invert several times
16. Centrifuge 13,000 rpm for 12 min
17. Discard supernatant as much as possible
18. Air dry
19. Resuspend pellet in TE as determine the size (~ 100 ul)
20. Stand at RT overnight
21. Diluted 10 ul with 190 ul DW and measure OD 260

PCR

Master mix

Reagent	1 X (ul)
ddH_2O	8.28
10 Enzyme buffer	1
dNTP mix (2.5 mM)	0.8
Primer g2-2 FP 3435 (1 ug/ul) } Mix	0.05
g2-2 RP 5267 (1 ug/ul) }	
Herculase (5 U/ul)	0.1

Mix 10 ul of master mix with 1 ul of DNA (OD260 range 0.05-0.2 when 20X dilute)

PCR cycle

95°C 2 min

92°C 1 min
60°C 45 sec } 35 cycles
72°C 4 min

72°C 7 min

4°C forever

Agarose gel electrophoresis

1.2% gel in TAE

Load 3 ul of PCR product

Run 100 V for 30 min

Product size ~ 1 kb

PCR clean up

1. For 3 ul PCR product add 1 ul of ExoSAP-IT
2. Mix and incubate at 37°C for 15 min then stop reaction by increase temperature to 80°C and incubate for 15 min

DNA sequencing

3 ul Cleaned PCR product + 1 ul of 20 pmol/ul Brca2-seq3997 + DW 20 ul

Send to Biotech building for service.

DNA sequencing results

Cells genotype were summarized in Table 1 :

Table 1 Genotype of primary rat embryonic fibroblast (PREF)

Genotype	Cell No.
W/T	1-2, 1-3, 1-11, 1-16, 2-10, 2-12, 2-14, 2-15, 3-3, A13
Heterozygous Y1418-	1-1, 1-5, 1-9, 1-12, 1-13, 1-14, 1-17, 2-3, 2-5, 2-6, 2-11, 2-16, 3-1, 3-2, 3-5, 3-6, 3-8
Homozygous Y1418-	3-4, 3-7

3. Irradiation assay

3.1 Proliferation assay (MTS assay)

Materials

1. CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)
    - MTS solution
    - PMS solution
2. DMEM with FCS
3. 96-well culture plate
4. 10% SDS
5. Microplate spectrophotometer

Methods

1. Passage cell to 96-well culture plates.
2. Each plate, culture until the day for the assay (day 3, 5, 7 and 9).
3. Prepare proliferation assay medium by mix DMEM with MTS and PMS as this ratio:

    DMEM / MTS solution / PMS solution

    100 μl / 20 μl / 1 μl
4. Discard culture medium and add 121 μl of proliferation assay medium with 2 more well using as blank.
5. Incubate in CO_2 incubator for 60 minutes.
6. Stop the reaction by adding 20 μl of 10% SDS.
7. Measure OD 490.

Standard curve of MTS assay

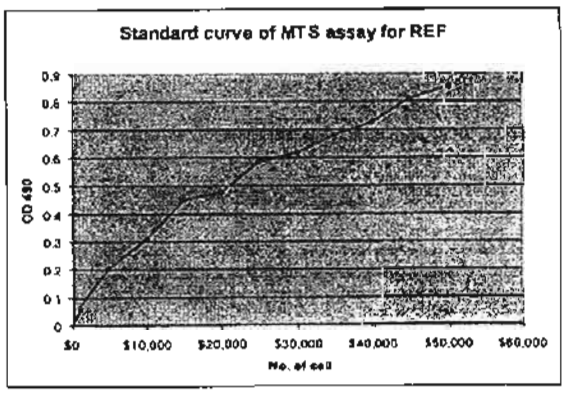
1. Passage PREF No. A13 in 96-well plate as following:

0	1,000	5,000	10,000	15,000	20,000	25,000	30,000	35,000	40,000	45,000	50,000
0	1,000	5,000	10,000	15,000	20,000	25,000	30,000	35,000	40,000	45,000	50,000

2. Incubate in CO_2 incubator for 1 day.
3. Prepare proliferation assay medium.
4. Discard media and add each well of first two lane with 121 μl of mixture.
5. Incubate for 1 hr.
6. Add 20 μl of 10% SDS to stop the reaction.
7. Measure OD 490 using first 2 wells as blank and the result is as following:

0.004	0.061	0.217	0.296	0.440	0.484	0.592	0.616	0.665	0.730	0.797	0.830
-0.004	0.061	0.189	0.319	0.463	0.471	0.580	0.620	0.700	0.721	0.820	0.874

8. Plot OD 490 VS number of cells as standard curve (Figure 1).



Slope $=1.60996 \times 10^{-5}$

Figure 1 Standard curve of MTS assay

3.2 Irradiation assay

Materials

1. Mark I irraditor
2. Proliferation assay materials

Methods

1. Passaged KO-REF as Table 2 in 96 well plate, 10,000 cells in 200 μl media/well, 3 wells/plate, total = 16 plates

Table 2 Genotype and number of passage of PREF in irradiation assay

Phenotype	No.	Passage
W/T	1-1	15
	2-14	14
	3-3	12
Hetero	1-14	15
	2-5	15
	3-5	15
Mutant	3-4	14
	3-7	13

2. Incubated in CO_2 incubator for 1 day.
3. Day 1, irradiate plates with dosage as following:

   4 Gy = 1.49 min

   8 Gy = 2.98 min

   12 Gy = 4.47 min

Prepare to do MTS assay at day 3, 5, 7, 9

3.3 Results

Table 3 OD490 from MTS assay of PREF in irradiation assay (Average of triplicate experiment)

W/T 1-1 p15	d 3	d 5	d 7	d 9
0 Gy	0.429	0.599	0.628	0.816
4 Gy	0.408	0.509	0.435	0.544
8 Gy	0.349	0.454	0.425	0.485
12 Gy	0.398	0.473	0.363	0.482
W/T 2-14 p14				
0 Gy	0.428	0.504	0.446	0.587
4 Gy	0.410	0.393	0.374	0.445
8 Gy	0.371	0.399	0.334	0.336
12 Gy	0.420	0.389	0.329	0.374
W/T 3-3 p12				
0 Gy	0.117	0.172	0.245	0.348
4 Gy	0.136	0.135	0.169	0.166
8 Gy	0.119	0.133	0.143	0.097
12 Gy	0.116	0.121	0.112	0.104
Het 1-14 p15				
0 Gy	0.286	0.437	0.512	0.841
4 Gy	0.269	0.309	0.371	0.509
8 Gy	0.242	0.285	0.280	0.333
12 Gy	0.234	0.254	0.220	0.301
Het 2-5 p15				
0 Gy	0.388	0.437	0.472	0.814
4 Gy	0.357	0.367	0.352	0.483
8 Gy	0.349	0.382	0.307	0.362
12 Gy	0.356	0.372	0.291	0.351
Het 3-5 p15				
0 Gy	0.161	0.222	0.235	0.289
4 Gy	0.199	0.181	0.222	0.200
8 Gy	0.204	0.193	0.208	0.244
12 Gy	0.170	0.180	0.168	0.198
Mu 3-4 p14				
0 Gy	0.390	0.461	0.398	0.521
4 Gy	0.340	0.419	0.352	0.399
8 Gy	0.334	0.361	0.319	0.357
12 Gy	0.342	0.325	0.276	0.360
Mu 3-7 p13				
0 Gy	0.191	0.272	0.276	0.329
4 Gy	0.215	0.237	0.220	0.175
8 Gy	0.244	0.292	0.262	0.153
12 Gy	0.254	0.219	0.212	0.158

Growth curves

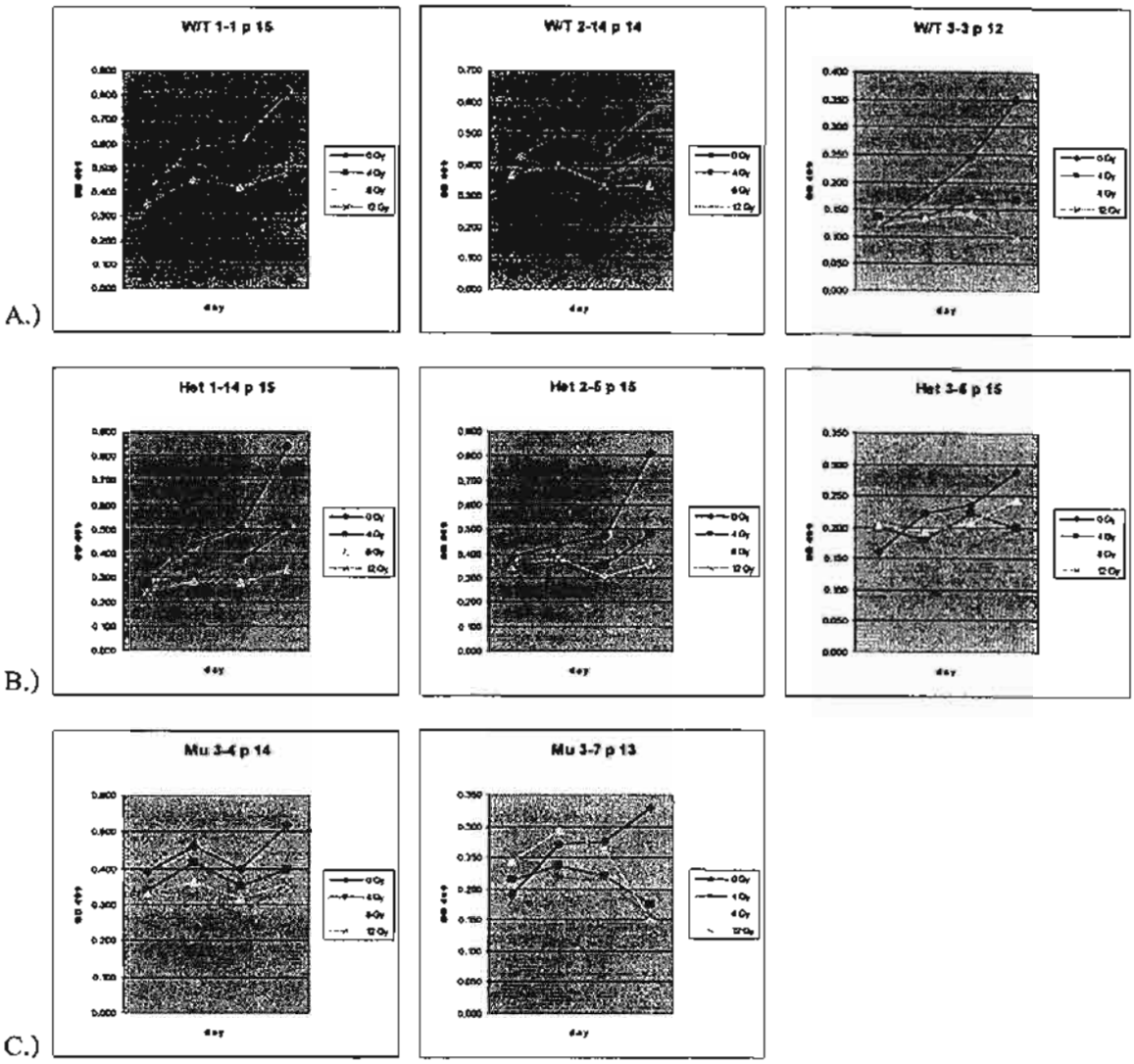


Figure 2 Growth curve of 3 genotypes PREF in irradiation assay

A.) Wild type

B.) Heterozygous Y1418-

C.) Homozygous Y1418-

Results and Discussions

1. 2 of homozygous Y1418- PREF and 17 of heterozygous Y1418- PREF were developed.
2. Immortal cell lines are during developed.
3. A number of cells were produced and freeze in liquid nitrogen, that spent a long time for waiting because at the beginning PREF cell didn't grow well. But after heat-inactivating FCS, the problem seemed to be better. I try to keep a lot of cell to guaranty that if the cell in the incubator had any problem, I could reactivate the cell in liquid nitrogen.

4. Radiation response of mutant cell and wild type cell seem to be similar.
5. Irradiation assay may be repeated after immortal cell line developed.

Further works

1. Continue passaging some of cells to develop immortal cell lines.
2. Continue collecting cell in liquid nitrogen.
3. Assay the radio sensitivity test of these cells again after they turn to be immortal cell lines.

Project 3

Analysis of methylguanine methyltransferase expression comparing between immature and mature female rats

Objectives

1. To analyze cytosine methylation in promoter site of methylguanine methyltransferase gene comparing between immature and mature rats.
2. To analyze mRNA expression of methylguanine methyltransferase gene comparing between immature and mature rats.

Study design

We propose to extract DNA and total RNA from mammary gland, liver, and spleen from 3 week-old Sprague Dawley female rats and 8 week-old Sprague Dawley female rats. DNA will be analyzed for cytosine methylation in promoter site of methylguanine methyltransferase gene using bisulfite sequencing method (6). And total RNA will be analyzed for the expression of methylguanine methyltransferase mRNA with house keeping gene as internal control using standard real time RT-PCR method.

Material and methods

Rats

1. 15 of 3 week-old Fisher female rats
2. 5 of 8 week-old Fisher female rats

Methods

1. Rats were killed using euthanasia with CO_2 inhalation and mammary glands, livers, kidneys, and spleens will be collected.
2. Mammary glands of the same age group were pooled and the organoids were prepared by the following procedures:

    Reagents and Materials:

    1. Serum free DMEM (SFM)with gentamicin
    2. Collaginase III 2 mg/ml SFM sterile
    3. DNase
    4. 53μ Nylon mesh

Procedures

1. Pool mammary gland were cut to pieces and transfer to 50 ml tube with 30 ml collagenase solution added.
2. Incubate 2 hours.
3. Transfer mixture to 15 ml tube and spin down ~ 4,000 RPM for 5 min.
4. Discard supernatant and floating fat.
5. Resuspend in 10 ml SFM.
6. Filter through nylon mesh in 50 ml tube, organoid did not pass the filter.
7. Wash organoid with SFM 1 time.
8. Invert filter to new 50 ml tube and collect organoid by washing with SFM.
9. Spin down ~ 4,000 RPM for 5 min.
10. Discard supernatant and resuspend pellet with 1 ml PBS and transfer to 1.5 ml tube.
11. Centrifuge 13,000 RPM for 1 min.
12. Remove supernatant and wash 1 time with PBS then spin down as 11.
13. Organoid was ready for DNA extraction.

3. Standard DNA extraction was performed with all samples. For other organs, ~100 mg piece of organs were chopped with sterile blade and used for DNA extraction.

Result and discussion

Genomic DNA extractions from all samples were done. DNA methylation will be analyzed by bisulfite sequencing technique, that need a time for setting up.

Further works

1. Analysis of cytosine methylation in the promoter site of methylguanine methyltransferase gene compared between immature and mature rat using bisulfite sequencing technique will be done.
2. Total RNA will be extracted from mammary gland, liver, and spleen of 3 week-old Sprague Dawley female rats and 8 week-old Sprague Dawley female rats.
3. Real time RT-PCR of methylguanine methyltransferase gene with internal control compared between each sample will be done.

Summaries

Project 1 "Assay of truncated BRCA2 protein expression and its interaction with RAD51 protein in knockout BRCA2 rat"

BRCA2 gene is a tumor suppressor gene. Previous studies showed that nonsense mutation of this gene leading to more breast cancer susceptibility in both human and animal models. Study in Y1418- BRCA2 rat showed that the mutant rats had more chance to be mammary cancer. My finding is that the truncated protein is still expressed in both heterozygous and homozygous rat, using anti-mouse BRCA2 antibody. Full length BRCA2 didn't be detected in homozygous mutant rats so the translation process didn't skip the mutation point. The function of truncated BRCA2 will be analyzed in the aspects of RAD51-BRCA2 interaction. That is the further works.

Project 2 "Radio sensitivity test of primary culture embryonic fibroblast comparing between BRCA2 knockout homozygote, heterozygote and wild type rats"

The main goal of this project is the developing of Y1418- BRCA2 embryonic fibroblast immortal cell line. There were 2 homozygous mutant and 17 heterozygous mutant cells developed. Some of these cells were test with the irradiation sensitivity assay and they didn't show the significant difference. The further works of this project is continue passaging until they turn to be immortal cell line.

Project 3 "Analysis of methylguanine methyltransferase expression comparing between immature and mature rats"

Methylguanine methyltransferase gene is a DNA repair gene and also related to breast cancer. Its expression is deficient in immature rat that has increasing of breast carcinogenesis when expose to carcinogen. In this study, we design to study methylguanine methyltransferase gene in aspect of its regulation of gene expression. We will study the cytosine methylation in the promoter region of this gene and mRNA expression comparing between immature and mature female rats. For my works, I finished collecting tissues for DNA extraction and extract the DNA already. This needs further work for bisulfite sequencing of methylguanine methyltransferase gene from all samples. The other work is the tissue collection for mRNA extraction and quantitative real time RT-PCR, those may be performed in the future.

The applicable advantages

Working in the powerful and well equipped institute help me to open my opinion widely. This training introduces me to the real world of science and gains my experience to improve my work in Thailand, the biology of cholangiocarcinoma. I can use research methodology I got here to imply the new research question that leading to effective prevention and treatment of cholangiocarcinoma in the future.

Acknowledgements

I would like to express my appreciative thank to Professor Michael N. Gould, my host, and Professor Norman Drinkwater, the director of McArdle Laboratory for Cancer Research, for their kindness hosting and allowing me to work there. I would like to thank Thailand Research Fund and Ericsson Foundation (Thailand) for giving me a grant and a chance for this postdoctoral work. I also give my special thank to all of my colleagues in this lab for their worthy helpful. I also would like to thank my chairman, Assoc. Professor Puangrat Yongvanish, and all members in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, for their workload when I was doing my postdoctoral research. And lastly I would like to express all of my heart to my wife, Dr. Chanitra Thuwajit, and my 8-month old son, Punnawish Thuwajit, for their encouragement and assisting my life.

References

1. Zan, Y., Haag, J. D., Chen, K. S., Shepel, L. A., Wigington, D., Wang, Y. R., Hu, R., Lopez-Guajardo, C. C., Brose, H. L., Porter, K. I., Leonard, R. A., Hitt, A. A., Schommer, S. L., Elegbede, A. F., and Gould, M. N. (2003) Nat Biotechnol 21, 645-651
2. Wooster, R., and Weber, B. L. (2003) N Engl J Med 348, 2339-2347
3. Cayre, A., Penault-Llorca, F., De Latour, M., Rolhion, C., Feillel, V., Ferriere, J. P., Kwiatkowski, F., Finat-Duclos, F., and Verrelle, P. (2002) Int J Oncol 21, 1125-1131
4. Esteller, M. (2000) Eur J Cancer 36, 2294-2300
5. Sarkisian, C. J., Master, S. R., Huber, L. J., Ha, S. I., and Chodosh, L. A. (2001) J Biol Chem 276, 37640-37648
6. Olek, A., Oswald, J., and Walter, J. (1996) Nucleic Acids Res 24, 5064-5066