



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การควบคุมการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรค

Regulation of WT1 gene expression in leukemic cells for therapeutic potentiation

โดย พศ. ดร. วิไลรัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ และคณะ

เดือน กรกฎาคม พุทธศักราช 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การควบคุมการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรค

Regulation of WT1 gene expression in leukemic cells for therapeutic potentiation

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1. ผศ. ดร. วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี |
| 2. ดร. นพ. ชวบูลย์ เดชสุขุม | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี |
| 3. รศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ | มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในการสนับสนุนทุนวิจัยของโครงการนี้ และจัดประชุมประจำปีทุกปีเพื่อนำเสนองานวิจัยนี้เพื่อแลกเปลี่ยนความคิดเห็นกับนักวิจัยท่านอื่นๆ ทำให้ได้ข้อคิดเห็นในแง่มุมต่างๆมากขึ้นและสร้างเครือข่ายงานวิจัยต่อไปในอนาคต ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในการให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการวิจัยในการทำวิจัยในโครงการนี้ และขอขอบคุณ รศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น อาจารย์ที่ปรึกษาของโครงการนี้ในการให้คำปรึกษาและข้อคิดเห็นที่มีคุณค่าต่องานวิจัย

Abstract

Silencing of WT1 gene expression in leukemia for potential of gene therapy

Leeanansaksiri, W.^{1*}, Chavaboon Dechsukhum², Sopit Wongkham³

¹*School of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, ,*
²*School of Pathology, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima,*
³*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Khen, Thailand*

WT1 is a zinc finger transcription factor which regulates several genes involving the cellular processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis. This protein also plays a pivotal role in carcinogenesis. In this study, we are success to down regulate WT1 in leukemic cell line, CCRF cells, using siRNA technology. Our results revealed that after introducing siRNA-WT1 into CCRF cells, WT1 mRNA and protein were decreased and demonstrated the peak at 48 hours. The declination of WT1 gene expression exhibited profound inhibitory effect on cell proliferation with highest effect of 71.5% after 72h of treatment. We also found that the cells treated with siRNA induced apoptosis via activation of caspase 3+7. In addition, silencing of WT1 gene exhibited a significantly down regulation of the IL-2 α -, β -, and γ -chain receptor subunits mRNA expression but has no significant effect on IL-3, IL-7 and TCR receptor mRNA expression. Altogether, our finding suggests that WT1 may serve as a new candidate for a new avenue of controlling survival rate of the leukemic cells. The implication of this work is therapeutic value in leukemic treatment by gene therapy in the future.

Keywords: WT1, leukemia, siRNA, gene therapy

Corresponding author.

Tel:0-4422-4628 Fax:0-4422-4633

E-mail: Wilairat@sut.ac.th

บทคัดย่อ

WT1 เป็น transcription factor ในกลุ่ม zinc finger ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นเซลล์ที่จำเพาะและโปรแกรมการตายของเซลล์ นอกจากนี้โปรตีน WT1 นี้ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็งหลายชนิด ในการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการลดการแสดงออกของยีน WT1 โดยใช้ siRNA technology ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CCRF จากการทดลองพบว่าสามารถลดการแสดงออกของ WT1 ได้สำเร็จโดยหลังจากเซลล์ได้รับ siRNA-WT1 แล้ว ระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ WT1 นี้มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีการลดลงสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง การลดลงของ WT1 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวส่งผลให้เซลล์มีการตายเพิ่มขึ้น โดยมีอัตราการตายสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และมีการตายสูงถึง 71.5% จากการทดลองยังพบว่าการตายของเซลล์เกิดจากการกระตุ้น apoptosis โดยการกระตุ้น caspase 3/7 ให้เพิ่มปริมาณขึ้นซึ่งเป็นโมเลกุลสำคัญที่กระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ นอกจากนี้การลดการแสดงออกของ WT1 ยังส่งผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-2 receptor โดยลดการแสดงออกของ α -, β -, and γ -chain receptor subunits mRNA ของ IL-2 receptor นี้ อย่างไรก็ตามการลดการแสดงออกของ WT1 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ IL-3, IL-7 และ TCR receptors จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าการควบคุมการแสดงออกของยีน WT1 สามารถต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยควบคุมอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาต่อยอดต่อไปเพื่อประยุกต์ใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็งเพื่อการรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

Executive Summary

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การควบคุมการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อ

เป็นแนวทางในการรักษาโรค

(ภาษาอังกฤษ) Regulation of WT1 gene expression in leukemic cells for

therapeutic potentiation

2. คณะผู้วิจัย:

2.1. หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) น.ส.วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Wilairat LEEANANSAKSIRI

คุณวุฒิ ปริญญาเอก

สถานที่ทำงาน สาขาวิชาจุลชีววิทยา/ชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422 4628 โทรสาร 0-4422 4633

2.2 ผู้ร่วมวิจัย

(ภาษาไทย) นาย ชวบูลย์ เดชสุขุม

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Chavaboon Dechsukhum

คุณวุฒิ แพทย์เฉพาะทางพยาธิกายวิภาค

ปริญญาเอก

สถานที่ทำงาน สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422 4628 โทรสาร 0-4422 4633

2.3 ที่ปรึกษาของโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร. โสพิศ วงศ์คำ

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

Molecular Regulation of Cancer

4. ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) นับเป็นมะเร็งที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในระดับประเทศและระดับโลก โดยมีอุบัติการณ์ของโลกดังกล่าวโดยเฉลี่ย 8.5 คนในชายและหญิง 5.2 คน ต่อประชากร 100,000 คน ตามผลสำรวจของ WHO ในระหว่างปี 1993-1997(1) ส่วนในประเทศไทยนั้น ข้อมูลของทะเบียนมะเร็งระหว่างปี 1995-1997 พบอุบัติการณ์ของโรค (Age-specific incidence rate) ในเพศชายและเพศหญิง 4.1 และ 3.5 ต่อประชากร 100,000 คน ตามลำดับ(2) และเป็นที่น่าสังเกตว่า อุบัติการณ์ของโรคนี้นั้นในคนไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากอดีต(2) ซึ่งโรคนี้นับเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในเด็ก คือประมาณ 38.7% ของโรคมะเร็งทั้งหมดในวัยนี้ จึงนับเป็นปัญหาที่สำคัญในระดับประเทศ

ปัญหาการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวที่สำคัญในปัจจุบัน ได้แก่ การที่ต้องใช้ยาเคมีบำบัด เป็นหลักในการรักษาผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์มะเร็งในร่างกายผู้ป่วยเหลือน้อยที่สุดในขณะที่เซลล์อื่นๆสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งการให้ยาเคมีบำบัดก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยอย่างมาก โดยเฉพาะในรายที่โรคมีความรุนแรงและผู้ป่วยมีอายุน้อยมากๆ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยังเกิดปัญหาการดื้อยาได้บ่อย ดังนั้นจึงได้มีความพยายามคิดค้นหาวิธีการรักษาใหม่ๆเพื่อลดผลข้างเคียงของการรักษาและเพิ่มโอกาสในการหายขาดจากโรคมะเร็งดังกล่าว ซึ่งนอกจากการพัฒนาหายาด้านมะเร็งชนิดใหม่ ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งสูง (สามารถทำลายเฉพาะเซลล์มะเร็งโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ) ยังรวมถึงการนำเอาวิธีการรักษาใหม่ๆ เข้ามาร่วมในการรักษา โดยวิธีการรักษาแบบใหม่ ที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน ได้แก่ gene therapy, immunotherapy เป็นต้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL โดยวิธี siRNA เพื่อพัฒนาเป็น gene therapy ยังไม่มีผู้ใดศึกษาดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความตั้งใจที่จะศึกษาการนำ siRNA technology ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนมาใช้ในการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญและพัฒนาเป็น gene therapy เพื่อใช้ในการรักษาโรคนี้นี้ในผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยต่อไป

5. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 5.1 เพื่อลดการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
- 5.2 เพื่อทดสอบการตอบสนองในระดับเซลล์ของเซลล์มะเร็งหลังการลดการแสดงออกของยีน WT1
- 5.3 เพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ในระดับอนุชีววิทยาของการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยดูผลต่อการเกิด Apoptosis ของเซลล์

6. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

โปรตีน Wilms tumor 1 (WT1) จัดอยู่ในกลุ่ม transcription factor (zinc finger family) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะต่างๆ เช่น ไต ตับ ม้าม หัวใจ เป็นต้น (4) การแสดงออกของยีน *WT1* ในระดับที่ผิดปกติมีความสำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็งในมนุษย์ โดยมีหลักฐานจากงานวิจัยบ่งชี้ว่า ยีนดังกล่าวทำหน้าที่เป็น oncogene (ยีนก่อมะเร็ง) ในมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะ Acute Leukemia (5), Wilms tumor (6-8), ovarian cancer (9), melanoma (10), mesothelioma (11) เป็นต้น เนื่องจากพบว่ายีน WT1 ทำงานสูงขึ้นในส่วนใหญ่ของมะเร็งดังกล่าว ซึ่งต่างจากความรู้เดิมที่เชื่อว่ายีน WT1 เป็นยีนต้านมะเร็งเท่านั้น โดยพบว่า WT1 มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ และการตายแบบ Apoptosis การศึกษาให้เห็นกลไกในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งพบว่าโปรตีน WT1 (12-13) ที่สามารถควบคุมยีนเป้าหมายหลายชนิด ที่ทำหน้าที่โดยตรงในกระบวนการแบ่งตัว และการเกิด Apoptosis ของเซลล์ โดยยีนเป้าหมายที่สำคัญที่ถูกควบคุมโดยโปรตีน WT1 คือ

1. ยีนที่อยู่ในกลุ่ม growth factor และ growth factor receptor gene โดยเฉพาะ *IGF-IR* (14-15), *EGFR* (16), *IGF-II* (17), *PDGF-A* (18), *TGF-β* (19), Amphiregulin (20)
2. ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Apoptosis ได้แก่ *bcl2* (21), *c-myc* (22)
3. ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแพร่กระจายของมะเร็ง ได้แก่ *E-cadherin* (23)
4. ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ senescence (การแก่ของเซลล์) ได้แก่ *hTERT* (Telomerase) (24)

จากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน WT1 เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกในการทำงาน พบว่าโปรตีน WT1 มีได้หลาย isoforms (อย่างน้อย 24 isoforms) อันเป็นผลจาก alternative splicing (24), alternative Translational start sites (25), RNA editing (26) และพบว่า โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ต่างกัน โดยเฉพาะ

ระหว่าง isoforms ที่เกิดจาก alternative splicing ซึ่งมีอยู่ 4 isoforms ที่เกิดจาก splicing ใน 2 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งแรกทำให้เกิดการเพิ่มหรือหายไปของส่วนของโปรตีน ที่สร้างจาก exon 5 (17 aa) หรือ ที่เรียกว่า WT1 + 17 aa และ WT1 - 17 aa ตามลำดับ alternative splicing ตำแหน่งที่ 2 ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วน 3 aa บริเวณรอยต่อระหว่าง zinc finger 3 และ 4 ของโปรตีน มีชื่อเรียกว่า WT1+ KTS, WT1 -KTS ตามลำดับ การศึกษาพบว่า isoform ที่เกิดจาก alternative splicing มีหน้าที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะระหว่าง WT1+KTS และ WT1-KTS (27) ซึ่งเชื่อว่าที่เกิดจากคุณสมบัติในการจับกับส่วนของ promoter DNA ของยีนเป้าหมายที่ต่างกัน

การศึกษาพบว่าหน้าที่ของ WT1 ในเซลล์จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของเซลล์ ซึ่งเหตุผลที่สำคัญที่เชื่อว่า เกิดจากการควบคุมการทำงานของ WT1 โดยโปรตีนอื่น ที่สำคัญได้แก่ P53 (28) และ Par-4 (29-30) โดยพบว่า WT1 จะสามารถลดการทำให้เกิด Apoptosis จาก P53 ในขณะเดียวกัน P53 ทำให้การควบคุมยีนเป้าหมายของ WT1 ต่างไปด้วย ส่วน Par-4 จะยับยั้งการกระตุ้นยีนเป้าหมาย และลดคุณสมบัติการยับยั้งการแบ่งตัว (growth suppression) ของ WT1 ในขณะเดียวกัน WT1 ทำให้ความสามารถในการทำให้เกิด apoptosis โดย Par-4 ลดลง เช่นกัน ตัวอย่างการศึกษาที่สำคัญ คือการแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการควบคุมยีนเป้าหมาย *IGF-IR* โดย WT1 ขึ้นอยู่กับภาวะ P53 ในเซลล์ โดยในการทดลองที่ใช้ Transient Transfection เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการทำงานของยีน *IGF-IR* โดย WT1 (31) พบว่า WT1-KTS สามารถยับยั้งการทำงานของยีน *IGF-IR* เฉพาะเมื่อไม่มีการผ่าเหล่า (mutations) ของยีน P53 ดังนั้น การศึกษาว่า WT1 ทำหน้าที่อย่างไรในการควบคุมยีนเป้าหมาย และจะมีคุณสมบัติส่งเสริม (oncogenic) หรือ ยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Tumor suppression) จำเป็นต้องคำนึงถึงภาวะความผิดปกติของโปรตีนอื่นๆ เหล่านี้ ด้วย

มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งชนิดย่อยๆ ได้เป็น 4 ชนิด ตามลักษณะการติดสีที่สังเกตโดยกล้องจุลทรรศน์ และการใช้ตรวจทาง Cytochemistry เป็น Acute lymphoblastic leukemia, Acute non-lymphoblastic leukemia, chronic myelogenous leukemia และ Chronic lymphocytic leukemia โดยมีอุบัติการณ์การดำเนินโรคและการพยากรณ์โรคที่ต่างกัน (2-3) โดยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Acute lymphoblastic leukemia เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในเด็ก (อายุน้อยกว่า 15 ปี) โดยมีอุบัติการณ์ 2.6 รายต่อประชากรเด็ก 100,000 คน แต่พบน้อยลงในผู้ใหญ่ ส่วนมะเร็งชนิด Acute non-lymphoblastic leukemia พบบ่อยในผู้ใหญ่ และเป็นสาเหตุ ประมาณ 40% ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ใหญ่ มะเร็งชนิด Chronic myelogenous leukemia ซึ่งพบได้น้อยมากในเด็ก โดยพบในผู้ใหญ่ 1 รายต่อประชากร 100,000 คน⁽²⁾ มะเร็ง

ชนิด chronic lymphocytic leukemia ไม่พบเลยในเด็ก แต่พบในผู้สูงอายุเป็นส่วนใหญ่(2) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า leukemia เป็นโรคที่มีความสำคัญในกลุ่มเด็ก ซึ่งถือเป็นกลุ่มประชากรที่จะเป็นทรัพยากรบุคคลที่สำคัญของประเทศ WT1 มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ growth factors ของเซลล์ในระบบเลือดหลายชนิดเช่น macrophage colony stimulating factor (M-CSF), transforming growth factor β -1 (TGF- β 1)(32-34) เป็นต้น

ในระบบเลือด WT1 มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ growth factors หลายชนิดเช่น macrophage colony stimulating factor (M-CSF), transforming growth factor β -1 (TGF- β 1)(32-34) เป็นต้น ในสภาวะปกติเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูกมีการแสดงออกของยีน WT1 อยู่ในระดับที่ต่ำมาก การแสดงออกของยีน WT1 ในระดับที่สูงขึ้นมากกว่าระดับปกติเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวหลายชนิดได้แก่ acute myeloid leukemia (AML), acute lymphoid leukemia (ALL), chronic myelocytic leukemia (CML), and myelodysplastic syndrome (MDS) (35-47) นอกจากนี้ WT1 ยังสามารถใช้เป็น marker ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ใช้ติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งนี้หลังการรักษาโดยวิธีเคมีบำบัด หรือหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก (48) จากคุณสมบัติของ WT1 ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งและความสามารถในการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นๆ หลายยีนที่สำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง จึงมีการพัฒนารูปแบบการรักษา มะเร็งโดยวิธีการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ในเซลล์มะเร็งที่เรียกว่า gene –targeting therapy โดยหวังว่าผลที่ได้ย่อมจะดีขึ้น เพราะสามารถส่งผลกระทบต่อยีนอื่นๆ ที่ถูกควบคุมโดย WT1 ได้พร้อมกัน โดยได้มีงานวิจัยได้ศึกษาความเป็นไปได้ดังกล่าวและพบว่า การยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* มีผลช่วยลดคุณสมบัติของความ เป็นมะเร็งได้ เช่น การยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* โดยวิธี Anti-sense technology ในเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงใน ห้องทดลอง หลาย ชนิด คือ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (AZ-521) เซลล์มะเร็งปอด(OS3) เซลล์มะเร็งรังไข่ (TYK-nu) มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML (MV4-11, NB4, K562) และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ (48-50) งานวิจัยที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีน *WT1* ต่อกระบวนการเกิด มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL และ MDS โดยวิธี siRNA ยังไม่มีผู้ใดศึกษาและเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญเพื่อ เป็นแนวทางในการพัฒนาการรักษาโดยวิธี gene therapy ในผู้ป่วยต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยในอนาคต

7. ระเบียบวิธีวิจัย

7.1 การเลี้ยงเซลล์สายมนุษย์ (Human Cell Line)

นำเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CCRF (lymphoblastic cell line) ซึ่งจาก ATCC มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ถูกเสริมด้วย 10% fetal bovine serum, 0.1% penicillin-streptomycin, 0.1% L-glutamine ในขวดเลี้ยงเซลล์และอบที่ 37°C, 5%CO₂ หลังจากเลี้ยง 4-7 วันจะ passage เซลล์ที่เจริญขึ้นมาใหม่โดยใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ชุดใหม่ แล้วนำเซลล์ส่วนหนึ่งไปแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว ส่วนเซลล์ที่เหลือจะเลี้ยงต่อไปเพื่อใช้ในการทดลอง

7.2 RNA interference and Transfection

ทำการคัดเลือก siRNA oligonucleotides โดยใช้โปรแกรม siRNA Target Designer program จากนั้นสั่งสังเคราะห์จากบริษัท invitrogen นำ WT1-siRNA ที่ได้นี้ใส่เข้าไปในเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง โดยใช้ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยง เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ต่อไป โดยมีเซลล์ที่ได้รับ siRNA control sequence เป็น Control

7.3 ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน WT1 และกลุ่มยีนเป้าหมายของ WT1 โดยวิธี Real-Time PCR

สกัด Total RNA จากเซลล์ในข้อ 7.2 โดย Trizol extraction reagents และสร้าง cDNA โดยอาศัย reverse transcription reagent kit (Invitrogen) จากนั้นทำการทดลอง real-time PCR เพื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน WT1 ทั้งในเซลล์ที่ได้รับ RNA interference, untransfected cell control, cells transfected with RNAi vector and cell transfected with control vector โดยวิธี SyBr green real-time PCR และ กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ IL2, IL3, IL7, TCR receptor โดยมี GAPDH เป็น control

7.4 ตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1 โดยวิธี Western Blotting

ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ในข้อ 7.2 โดยใช้ lysis buffer ที่มีส่วนผสมของ 1X PBS, 1% NP40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1% SDS และ 10 mg/ml PMSF หลังจากทำการสกัดโปรตีน (total protein

extraction) จากเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม คือกลุ่มทดลองที่ถูกกระตุ้นหรือยับยั้ง WT1) และกลุ่มควบคุม เมื่อวัดปริมาณโปรตีนที่ได้แล้ว นำ lysate ที่ได้มาผสมกับ 2X reducing buffer ในสัดส่วน 1:1 และนำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์โดย 8-10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis หลังจากนั้นทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยัง PVDF membrane แล้ววิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน WT1 จากนั้นใช้ secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase ตามด้วย chemiluminescent method และ autoradiography แล้วทำการเปรียบเทียบผลทั้งก่อนและหลังการยับยั้งการแสดงออกของ WT1 การทดลองจะตรวจวัดระดับโปรตีน actin เป็นตัวควบคุมปริมาณ

7.5 Cell proliferation assays

7.5.1. ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ทุกวันในระหว่างทำการทดลองโดยการย้อมเซลล์ด้วยน้ำยา Trypan blue และนำไปใส่ใน hemocytometry chamber เพื่อทำการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำจำนวนเซลล์ที่นับได้ไปสร้างเป็นกราฟเพื่อการวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดและ การตายของเซลล์ต่อไป

7.5.2 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังการยับยั้ง WT1 จะใช้น้ำยาสำเร็จรูป CellTiTer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit โดยมีวิธีการทดลองโดยสรุปดังนี้

เลี้ยงเซลล์มะเร็งใน 96-well titer plate ให้ได้ปริมาณ 3000 cell ต่อหลุม โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารปกติ ทำการเคลื่อนย้าย plasmid vector เข้าสู่เซลล์ ตามวิธีการข้างต้น หลังจากนั้น 24 และ 48 ชม. จึงเติมสารละลาย MTS+PES ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปล่อยทิ้งไว้ 4 ชม. และนำเซลล์ที่ได้ไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 490 nm แล้วนำค่าที่วัดได้ไปสร้างเป็น growth curve

7.6 Apoptosis Assays

หลังจากเลี้ยงเซลล์ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดระดับ caspases 3/7 โดยใช้ caspases 3/7 assay kit (Promega) ตามวิธีการทดสอบที่อธิบายไว้ในคู่มือการใช้ kit ของบริษัท

เนื้อหาการทดลอง/ผลการทดลอง

1. การลดการแสดงออกของยีน WT1 และการตรวจสอบโดยวิธี real-time PCR

นำเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CCRF (lymphoblastic cell line) เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ถูกเสริมด้วย 10% fetal bovine serum, 0.1% penicillin-streptomycin, 0.1% L-glutamine ในขวดเลี้ยงเซลล์และอบที่ 37°C, 5%CO₂ จากนั้นแยกนำ WT1-siRNA หรือ siRNA control เข้าสู่เซลล์ CCRF โดย Lipofectamine 2000 (Invitrogen) นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงที่ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยตรวจวัดระดับการแสดงออก WT1 โดย real-time RT-PCR ที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมงจากการทดลองพบว่า WT1-siRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน WT1 ได้สำเร็จดังแสดงใน Figure 1 โดยระดับของ WT1 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีร้อยละในการลดลงเท่ากับ 47%, 76%, 92%, 33% ตามลำดับ ระดับของ WT1 mRNA ลดลงอย่างสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงหลังได้รับ WT1-siRNA และฤทธิ์การยับยั้งการแสดงออกของ WT1 mRNA โดย WT1-siRNA ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงเนื่องจากการได้รับ siRNA นี้เป็นแบบ transient expression

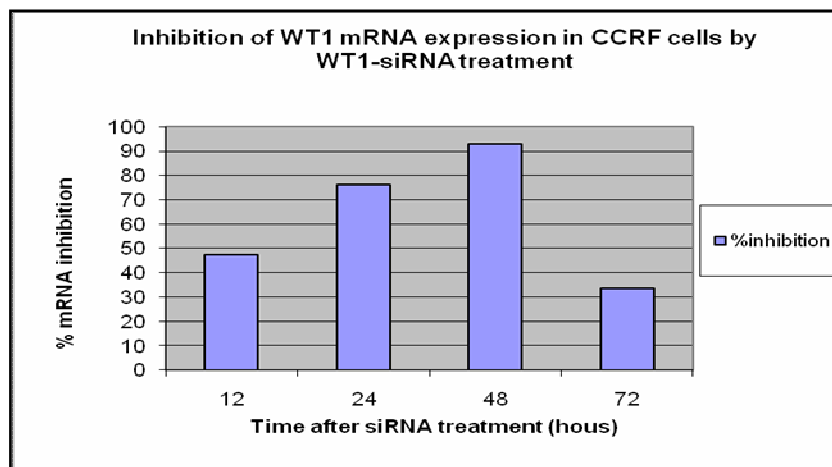


Figure 1. WT1 expression in CCRF cells after WT1-siRNA treatment by real-time PCR.

2. การลดการแสดงออกของโปรตีน WT1

จากนั้นแยกน้ำ WT1-siRNA หรือ siRNA control เข้าสู่เซลล์ CCRF โดย Lipofectamine 2000 (Invitrogen) นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงที่ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน WT1 โดย western blotting ที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า WT1-siRNA สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน WT1 ได้สำเร็จดังแสดงใน Figure 2 โดยระดับของโปรตีน WT1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากการได้รับ siRNA นี้เป็นแบบ transient expression ดังนั้นโปรตีนจึงถูกยับยั้งเพียงชั่วคราวก่อนเริ่มกลับสู่สภาวะปกติดังจะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงระดับโปรตีน WT1 เริ่มมีมากขึ้นโดยมีระดับน้อยกว่า control ไม่มากนัก

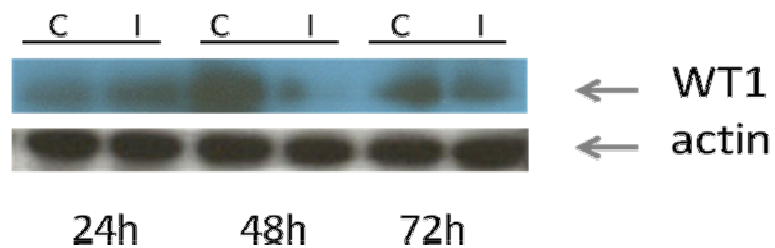


Figure 2. WT1 protein expression in CCRF cells either received siRNA-WT1 (shown as I) or received siRNA control (shown as C) by western blot analysis.

3. การลดการแสดงออกของยีน WT1 เพิ่มการตายของเซลล์และกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis มากขึ้น

หลังจากนำ WT1-siRNA เข้าสู่ CCRF cells แล้ว นำเซลล์ที่ได้มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตผลการทดลองพบว่าเซลล์เริ่มมีการตายมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม โดยมีเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเป็นจำนวนมากอย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดัง แสดงใน Figure 3 นอกจากนี้การลดการแสดงออกของยีน WT1 กระตุ้นให้การเพิ่มปริมาณ caspases 3/7 ดังแสดงใน Figure 4 ซึ่ง caspases 3/7 เป็นสารสำคัญในการกระตุ้น program cell death ของเซลล์และทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จากการทดลองโดยการตรวจวัดระดับ caspase 3 + 7 พบว่าการลดลงของ WT1 ทำให้เกิดการกระตุ้น caspase 3 & 7 สูงขึ้นตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับ siRNA เมื่อเทียบกับ control cells ซึ่งได้รับ siRNA control โดยมีการกระตุ้น caspase 3 & 7 เพิ่มขึ้นและสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่อธิบายถึงการที่มีเซลล์อยู่รอดได้ลดลง Figure 3 หรือมีการตายของเซลล์ที่ได้รับ siRNA เพิ่มขึ้นตามเวลาการ treatment ที่นานขึ้น ซึ่งการทดลองนี้มีสัมพันธ์กับการทดลองที่ Figure 1 และ Figure 2 สรุปได้ว่าหลังการลดลงของ WT1 ซึ่งสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงนั้นทำให้เกิดการกระตุ้น apoptosis โดยกระตุ้น caspase 3 & 7 ต่อมาและสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง (Figure 4) ซึ่งต่อมาส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์มากขึ้น (Figure 3) โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์ที่สามารถอยู่รอดได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและลดลงมากที่สุดในเวลา 72 ชั่วโมง

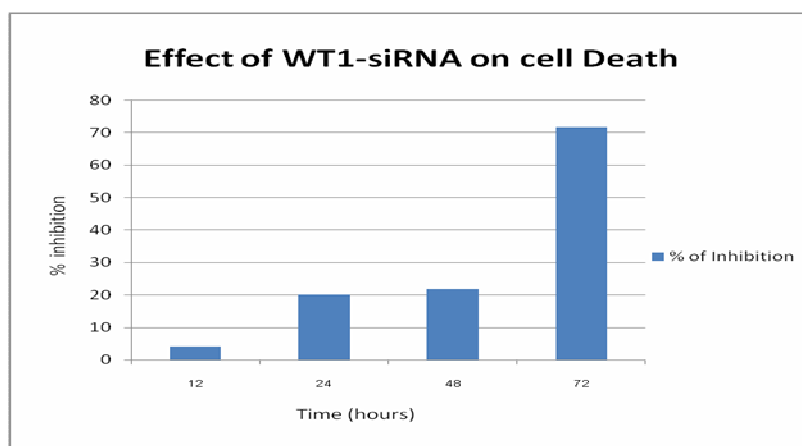


Figure 3. Down regulation of WT1 expression inhibits cell survival of CCRF cells.

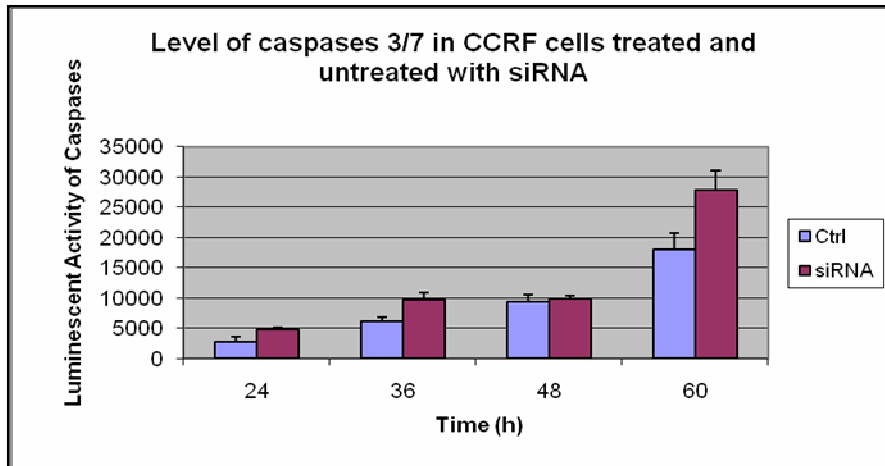


Figure 4. Down regulation of WT1 expression induced program cell death of CCRF cells via activation of caspases 3/7 expression.

4. การลดการแสดงออกของยีน WT1 ส่งผลต่อการแสดงออกของ IL-2 receptor

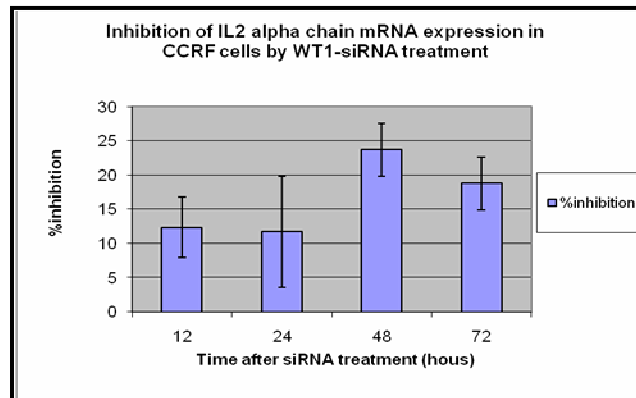
การยับยั้งการแสดงออกของ WT1 โดย WT1-siRNA นอกจากจะกระตุ้น caspases 3/7 และทำให้เซลล์มะเร็งตายมากขึ้นแล้ว ยังพบว่า WT1-siRNA ยังส่งผลในการลดการแสดงออกของ IL-2 receptor ดังแสดงใน figure 5 จากการทดลองพบว่า WT1-siRNA ส่งผลในการยับยั้ง α -subunit ของ IL-2 receptor เมื่อเซลล์ได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 12, 24, 48, 72 ชั่วโมง โดยมี % inhibition สูงสุดที่ 48 ชั่วโมงและลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง (Figure 5, panel A)

สำหรับการแสดงออกของ β -subunit ของ IL-2 receptor ได้รับผลกระทบจาก WT1-siRNA เช่นกัน โดย WT1-siRNA ยับยั้ง β -subunit ของ IL-2 receptor เมื่อเซลล์ได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยมี % inhibition of mRNA expression ของ α -subunit เป็น 40% และผลการยับยั้งมีมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับ WT1-siRNA นานขึ้นโดยที่ 24, 48, 72 ชั่วโมง โดยมี % inhibition สูงสุดที่ 72 ชั่วโมงและลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง (Figure 5, panel B)

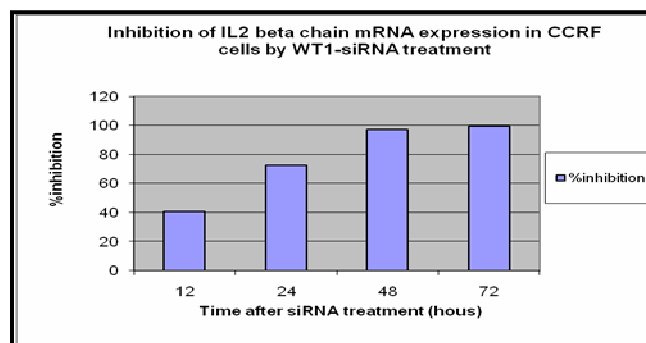
นอกจากนี้ WT1-siRNA ยังส่งผลในการยับยั้งการแสดงออกของ mRNA ของ gamma subunit ของ IL-2 receptor โดยมี % inhibition of mRNA expression ของ γ -subunit เมื่อเซลล์ได้รับ WT1-siRNA เป็นเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า WT1-siRNA มีผลในการยับยั้งทั้ง α -, β -, γ -subunit ของ IL-2 receptor ซึ่ง IL-2 receptor มีความสำคัญต่อความอยู่รอดของเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดลดลงนั่นเอง

A



B



C

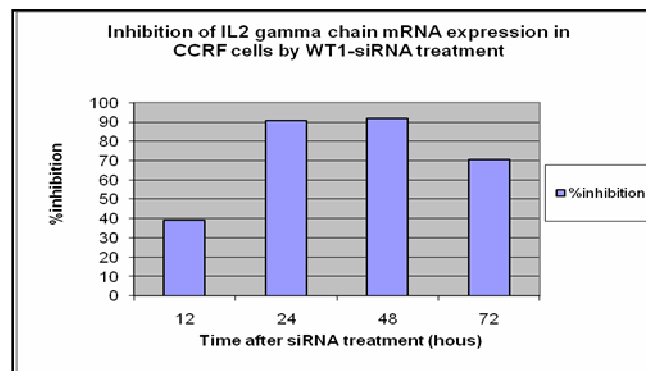


Figure 5. Down regulation of WT1 expression demonstrates inhibitory effect on IL-2 α -, β - and γ -subunits of IL-2 receptor mRNA expression.

5. ผลการลดการแสดงออกของยีน WT1 ต่อการแสดงออกของ IL-3 receptor

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดการแสดงออกของยีน WT1 มิได้ส่งผลต่อการแสดงออกของ IL-3 receptor อย่างมีนัยสำคัญ

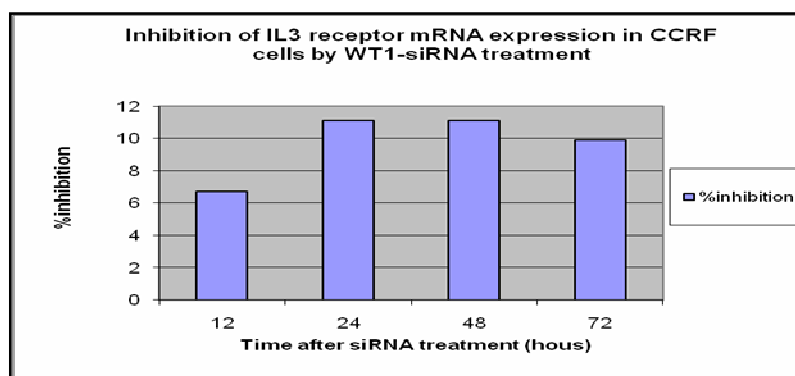


Figure 6. Down regulation of WT1 expression has no significant effect on IL-3 receptor mRNA expression.

6. ผลการลดการแสดงออกของยีน WT1 ต่อการแสดงออกของ IL-7 receptor

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดการแสดงออกของยีน WT1 มิได้ส่งผลต่อการแสดงออกของ IL-7 receptor อย่างมีนัยสำคัญ

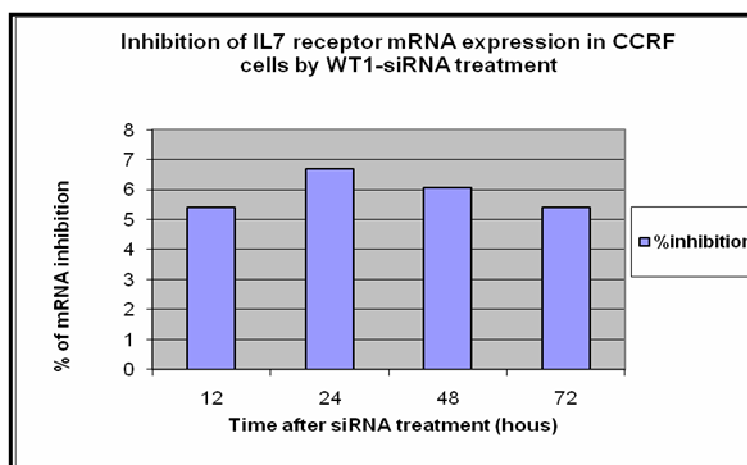


Figure 7. Down regulation of WT1 expression has no significant effect on IL-7 receptor mRNA expression.

7. ผลการลดการแสดงออกของยีน WT1 ต่อการแสดงออกของ TCR receptor

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดการแสดงออกของยีน WT1 ไม่ได้
ผลกระทบใดๆ อย่างมีนัยสำคัญต่อการแสดงออกของ TCR receptor

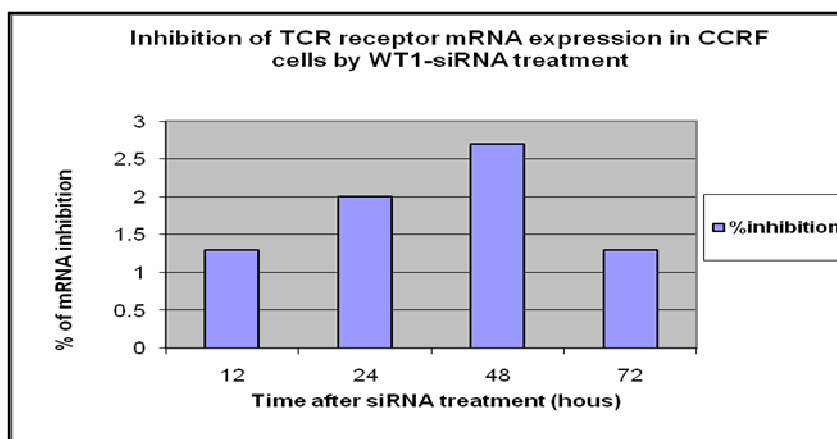


Figure 8. Down regulation of WT1 expression has no significant effect on TCR receptor mRNA expression.

9. สรุปผลการทดลอง

การลดการแสดงออกของยีน WT1 โดย siRNA against WT1 gene สามารถควบคุมการเจริญแบ่งตัวและความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้ โดยกระตุ้น apoptosis ของเซลล์มะเร็งโดยการกระตุ้น caspase 3/7 ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายและการเพิ่มจำนวนเซลล์จึงลดลง นอกจากนี้การลดการแสดงออกของยีน WT1 ยังส่งผลให้การแสดงออกของยีน IL-2 receptor ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม การลดการแสดงออกของยีน WT1 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน IL-3, IL-7, TCR receptors จากผลการทดลองนี้สามารถนำไปศึกษาและประยุกต์ใช้ในการควบคุมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด lymphoblastic leukemia ต่อไปได้

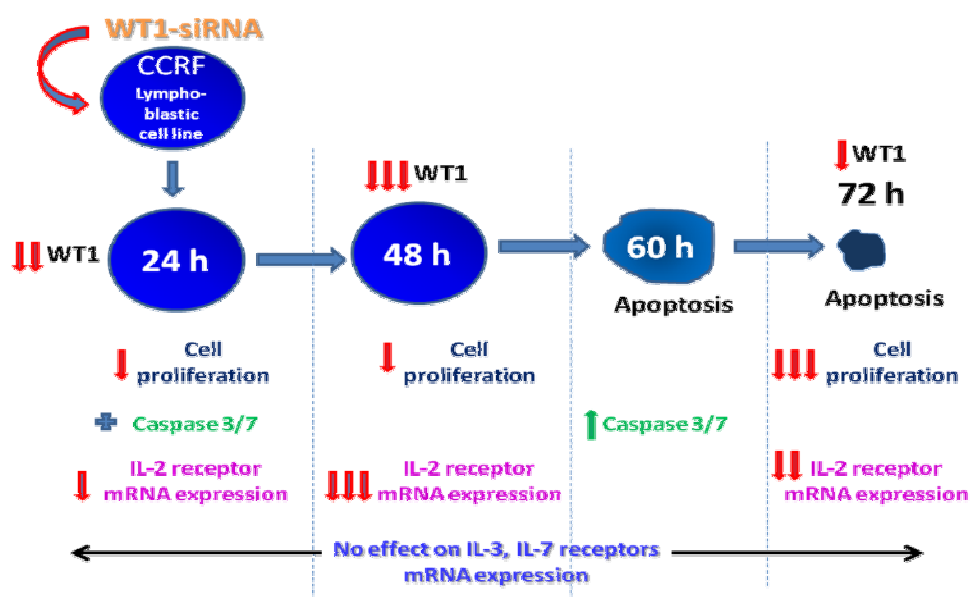


Figure 9. Summarization of the effect of down regulation of WT1 gene expression by siRNA-WT1 on lymphoblastic leukemia CCRF cells.

10. เอกสารอ้างอิง (reference) ของโครงการวิจัย

1. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (eds): Cancer Incidence in five Continents, Vol. VII. IACR Scientific Publications, 143, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2002.
2. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, Kanchanabat C, Khuhaprema : Cancer in Thailand, Vol III. Ministry of Public Health and Ministry of University Affair, 2003.
3. Mendelsohn J, Howlay PM, Israel MA, Liotta LA: The Molecular Basis of Cancer. W.B. Saunder, 2001
4. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Meada M, Pelletier J, Housman D, Jaenish R. WT1 is required for early kidney development. Cell 1993; 74: 679-691.

5. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071-9.
6. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, Jones C, Housman DE: Isolation and characterization of zinc finger polypeptide gene at the chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990; 60:509-20.
7. Gessler M., Konig A., Arden K., Grundy P., Orkin S., Sallan S., Peters C., Ruyle S., Mandell J., Li F., Cavenee W. and Brun G: Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' tumors. *Hum Mutat* 1994;3:212-222.
8. Little, M.H., Prosser, J., Condie, A., Smith, P.J., van Heyningen, V. and Hastie, N.D.: Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms' tumor patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4791-4795.
9. Bruening W, Gros P, Sato T, Stanimir J, Nakamura Y, Housman D, Pelletier J: Analysis of the 11p13 Wilms tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. *Cancer Invest* 1993;11(4):393-9.
10. Rodeck U, Bossler A, Kari C, Humpray CW, Gyorfı T, Maurer J, Thiel E, Messen HD: Expression of WT1 Wilms' tumor suppressor gene by normal and malignant melanocytes. *Int J Cancer* 1994;59:78-82.
11. Amin KM, Litzky LA, Smythe WR, Mooney AM, Morris JM, Mews DJY, Pass HI, Kari C, Rodeck U, Rauscher FJ, Kaiser IR, Albelda SM: Wilms' tumor (WT1) susceptibility gene product are selectively expressed in malignant mesothelioma. *Am J Pathol* 1995; 146:344-356
12. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ III. Transcriptional repression mediated by the WT Wilms' tumor gene product. *Science* 1991;253:1550-2.
13. Madden SL, Cook DM, Rauscher FJ III: A structure-function analysis of transcriptional Repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene* 1993;8:1713-20.

14. Werner H, Roberts CT Jr, LeRoith D: The regulation of IGF-I receptor gene expression by positive and negative zinc-finger transcription factors. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343:91-103.
15. Werner H, Rauscher FJ 3rd, Sukhatme VP, Drummond IA, Roberts CT Jr, LeRoith D: Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J Biol Chem* 1994;269:12577-82
16. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber DA: WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J* 1995;14:4662-75
17. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3d: Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 1992;257:674-8
18. Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher FJIII: The Wilms' tumor suppressor gene product, WT1, repress transcription of the platelet-derived growth factor A chain gene. *J Biol Chem* 1992;267:21999-22002
19. Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJIII, Kim SJ: Repression of the transforming growth factor - β 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol* 1994;8:595-602
20. Lee S.B., Huang K., Palmer R., Truong V.B., Herzlinger D., Kolquist K.A., Wong J., Paulding C., Yoon S.K., Gerald W., Oliner J.D. and Haber D.A.: The Wilms' tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 1999;98:663–673.
21. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJIII, Saunders GF: Regulation of the proto- oncogene bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res* 1995;55:5386-5389.
22. Hosono S., Gross I., English M.A., Hajra K.M., Fearon E.R. and Licht, J.D.: E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 2000;275:10943–10953.

23. Oh, S., Song, Y., Yim, J. and Kim, T.K.: The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem* 1999;274:37473–37478.
24. Morris JF, Madden SL, Tournay OE, Cook DM, Sukhatme VP, Rauscher FJ: Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus *Oncogene* 1991;6:2339-48.
25. Bruening W, Pelletier J: A non-AUG translation initiation events generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 1996;271:8646-54.
26. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher GJ, Sukumar S: RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene. *Genes Dev* 1994;8:720-31
27. Wang Z, Qiu Q, Haung J, Gurrieri M, Deuel TF: Products of alternative splice transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene , WT1, have alter DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 1995;10:415-422
28. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, Hill DF, Haber DA . Physical and functional interation between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5100-4.
29. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, Shi Y: A novel repressor, par-4, modulate transcription and growth suppressor function of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol* 1996;19:6945-6956
30. Sells SF, Han SS, Muthukkumar S, Maddiwar N, Johnstone R, Boghaert E, Gillis D, Liu G, Nair P, Monnig S, Collini P, Mattson MP, Sukhatme VP, Zimmer SG, Wood DP Jr, McRoberts JW, Shi Y, Rangnekar VM: Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17(7):3823-32.
31. Idelman G, Glaser T, Roberts CT Jr, Werner H: WT1–p53 interactions in insulin-liked growth factor-I receptor gene regulation. *J Biol Chem* 2003;278(5):3474-82. Epub 2002 Nov 19.
32. Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*. 1990 Nov 30;250(4985):1259

33. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ III. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science*. 1991 Sep 27;253(5027):1550-3.
34. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3rd. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science*. 1992 Jul 31;257(5070):674-8.
35. Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia*. 1994 Dec;8(12):2138-43.
36. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, Miyake S, Tamaki H, Oji Y, Yamagami T, Tatekawa T, Soma T, Kishimoto T, Sugiyama H. Aberrant overexpression of The Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood*. 1997 Feb 15;89(4):1405-12.
37. King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2171-9.
38. Maurer U, Brieger J, Weidmann E, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation in vitro. *Exp Hematol*. 1997 Aug;25(9):945-50.
39. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol*. 1997 Apr;25(4):312-20.
40. Fraizer GC, Patmasiriwat P, Zhang X, Saunders GF. Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood*. 1995 Dec 15;86(12):4704-6.
41. Pritchard-Jones K, King-Underwood L. The Wilms tumour gene WT1 in leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1997 Oct;27(3-4):207-20.
42. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*. 1998 Apr 15;91(8):2961-8.
43. Miyagawa K, Hayashi Y, Fukuda T, Mitani K, Hirai H, Kamiya K. Mutations of the WT1 gene in childhood nonlymphoid hematological malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Jun;25(2):176-83.

44. Deuel TF, Guan LS, Wang ZY. Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL-60 cells through its zinc-finger domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 8;254(1):192-6.
45. Carrington D, Algar E. Overexpression of murine WT1 + / + and - / - isoforms has no effect on chemoresistance but delays differentiation in the K562 leukemia cell line. *Leuk Res.* 2000 Nov;24(11):927-36.
46. Svedberg H, Chylicki K, Baldetorp B, Rauscher FJ 3rd, Gullberg U. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene.* 1998 Feb 19;16(7):925-32.
47. Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia.* 2003 Jul;17(7):1301-12.
48. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R, Klein-Hitpass L, Ottinger H, Beelen DW, Opalka B. WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica.* 2005 Mar;90(3):326-34.
49. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411 (6836):494-8.
50. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H et al. Expression of the Wilm's tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:194-204.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. สามารถลดการแสดงออกของยีน WT1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้สำเร็จ
2. ทราบผลการตอบสนองในระดับเซลล์ของเซลล์มะเร็งหลังการลดการแสดงออกของยีน WT1
3. ทราบกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นในระดับอนุชีววิทยาของการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยส่งผลต่อการเกิด Apoptosis ของเซลล์ โดยผ่านการกระตุ้น caspase 3/7
4. ทราบกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นในระดับอนุชีววิทยาของการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยส่งผลต่อการแสดงออกของ IL-2 receptor โดยไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อ IL-3, IL-7, TCR receptors
5. เตรียมผลงานเพื่อการตีพิมพ์ 1 เรื่อง

ภาคผนวก

ผลงานอยู่ในระหว่างการเตรียม manuscript เพื่อการตีพิมพ์ 1 เรื่อง