



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ:- ความเกี่ยวข้องของ PI3 kinase and Ras-MAP kinase pathway ในการเคลื่อนที่ การบุกรุก และการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนู

**นางสาว ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล**

15 พฤศจิกายน 2549

สัญญาเลขที่ RSA468004

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ:- ความเกี่ยวข้องของ PI3 kinase and Ras-MAP kinase pathway ในการเคลื่อนที่ การบุกรุก และการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนู

**นางสาว ตวงพร สุทธิพงษ์ชัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล**

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัย (สกว) และ บางส่วนจากเงินงบประมาณปีพ.ศ. 2546 และ 2547 ของมหาวิทยาลัยมหิดล

ขอขอบคุณ Dr. K. Pienta, University of Michigan, Ann Arbor สำหรับ Dunning cell lines (AT-01 และ MLL)

ขอขอบคุณ Dr. S. Ishibe, Yale University, Connecticut สำหรับ antibody ต่อ phospho-paxillin

ขอขอบคุณ ผศ.พญ. อรุณี ธิติธัญญานนท์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง real time PCR

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์ และ ดร. ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆ และ นักศึกษาบัณฑิต สำหรับความทุ่มเทในการทำการทดลองวิจัย

รหัสโครงการ: **RSA43-8-0013**

ชื่อโครงการ: ความเกี่ยวข้องของ PI3 kinase and MAP kinase pathway ในการเคลื่อนที่
การบุกรุก และการแพร่กระจาย ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนู

ชื่อนักวิจัย : นางสาว ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : sctsc@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (2546-2549)

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งถือเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตของผู้ป่วย ความรู้ทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการดำเนินไปของมะเร็งมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาในการวินิจฉัย และรักษาโรคมะเร็ง

Ras/MAP kinase และ PI3 kinase Signaling pathways มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัว การเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์ (ซึ่งเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจาย) จากผลการทดลองที่ผ่านมาเราได้แสดงว่า MAP kinase มีบทบาทสำคัญในการ การเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ดังนั้นในโครงการนี้ เราจึงต้องการศึกษาถึงกลไกของการควบคุมการเคลื่อนที่ของ MAP kinase โดย ศึกษาผลของ MEK1 inhibitor, PD98059 ต่อโปรตีนต่างๆที่ควบคุมการเคลื่อนที่ นอกจากนี้ เรายังจะศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของ PI3 kinase ต่อการบุกรุกของเซลล์

การยับยั้งการ PI3 kinase ด้วย LY294002 มีผลลดการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูชนิดแพร่กระจาย (MLL) ซึ่งสอดคล้องกับการลดการกระตุ้น Akt สารยับยั้งนี้ยังสามารถลดการเคลื่อนที่และการสร้าง uPA โดยไม่มีผลต่อการมีชีวิตและปริมาณ MMP-2 ที่หลั่งออกมา ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่า PI3 kinase มีความสำคัญต่อการบุกรุกของเซลล์ MLL และ LY294002 ไปยับยั้งการบุกรุกของเซลล์โดยไปยับยั้งการเคลื่อนที่และการสร้าง uPA แต่ไม่มีผลต่อ MMP-2

การยับยั้งการ MAP kinase ด้วย PD98059 มีผลลดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน paxillin โดยไม่มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน myosin regulatory light chain และ focal adhesion kinase เลย ผลการทดลองนี้แนะว่าการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ PD98059 อาจเป็นผลมาจากการกีดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน paxillin

ทั้ง MAP kinase and PI3 kinase มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการบุกรุกของเซลล์มะเร็งที่มีการแพร่กระจายสูง ดังนั้นโปรตีนทั้งสองนี้จึงน่าจะเป็นจุดเป้าหมายของยาที่ใช้ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

Project Code : RSA43-8-0013

Project Title : Involvement of PI3 kinase and MAP kinase pathways in motility, invasion and metastasis of rat prostatic adenocarcinoma cell line

Investigator : Dr. Tuangporn Suthiphongchai Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : sctsc@mahidol.ac.th

Project Period : 3 years (2003-2006)

Abstract

Metastasis is the major course of death in cancer patients. Thus, it has become one of the primary concerns in cancer therapy.

Ras/MEK/ERK and PI3 kinase are the two most important mediators implicated in diverse biological activities including cell survival, invasion and migration, the characteristic of cancer metastasis. We have previously shown that MAP kinase plays an important role in invasion and motility of Dunning rat prostatic adenocarcinoma cells. In this project we study the mechanism by which MAP kinase controls cell motility by investigating the effect of PD98059, MEK1 inhibitor, on various proteins regulating migration in high metastatic Dunning cell line, MLL. Besides we also examined the role of PI3 kinase, another important signaling pathway, in the invasiveness of this cell.

Inhibition of PI3 kinase with LY294002 resulted in a dose-dependent reduction in the *in vitro* invasiveness which correlated with the decrease in the level of phosphorylated or activated Akt, its major downstream effector. This specific PI3 kinase inhibitor also suppressed cell motility, and urokinase plasminogen activator (uPA) without any significant effects on cell survival, and matrix metalloproteinase (MMP)-2 secretion. These results suggested that PI3 kinase is necessary for MLL cell invasiveness and the suppression of cell invasiveness upon LY294002 treatment may be due to the impairment of cell motility and uPA secretion but not MMP-2 secretion.

Inhibition of MAP kinase pathway by PD98059 reduced paxillin phosphorylation without significant effect on myosin regulatory light chain and FAK phosphorylation. This implied that the inhibitory effect of PD98059 on MLL cells motility may be due to suppression of paxillin phosphorylation.

Both MAP kinase and PI3 kinase play an important role in regulation of cell invasiveness of high metastatic prostate cancer cell line, thus becoming the potential targets for inhibition of cancer metastasis.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	24

บทนำ

มะเร็งเกิดจากการที่เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ระบบการควบคุมการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ผิดปกติ เซลล์จะแบ่งตัวมากผิดปกติและไม่สามารถควบคุมได้อย่างถูกต้อง สาเหตุสำคัญคือมีการเปลี่ยนแปลงของยีน (genetic alteration) โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การตายของเซลล์ และการส่งสัญญาณควบคุมขบวนการดังกล่าว นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้ (metastasis) การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนี้ถือเป็นสาเหตุสำคัญในการเสียชีวิตของผู้ป่วย ความรู้ทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน โดยเฉพาะความรู้เกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการเกิดมะเร็งมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาในการวินิจฉัย ป้องกัน และรักษาโรคมะเร็ง

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) เป็นขบวนการที่ซับซ้อน เกิดจากการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง โดยเริ่มจากการที่ เซลล์มะเร็งจะหลุดจากเซลล์ข้างเคียง, ปลอຍเอ็นไซม์ protease มาย่อย basement membrane จากนั้นเซลล์จะเคลื่อนที่ออกจากที่อยู่เดิม invade เข้าสู่ stroma และ เกาะกับ ECM ในที่ใหม่ได้ ขบวนการเหล่านี้ (ได้แก่ การหลุดจากเซลล์ข้างเคียง, ย่อย ECM, เคลื่อนที่ออกมา และ เกาะกับที่ใหม่) จะเกิดเป็นวงจร ทำให้เซลล์บุกรุก (invade) เนื้อเยื่อข้างเคียง และ stroma ได้ จากนั้น เซลล์จะ invade ผ่านเส้นเลือดเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะนำเซลล์มะเร็งไปสู่เนื้อเยื่ออื่นที่ห่างไกลออกไป [1]

ปกติเซลล์ในเนื้อเยื่อหนึ่งๆจะอยู่รวมกันโดยมี basement membrane เป็นตัวห่อหุ้มและเป็นขอบเขตของเนื้อเยื่อนั้นๆ การที่เซลล์จะแพร่กระจายออกจากแหล่งที่อยู่ของมันได้จะต้องมีการทำลาย basement membrane และ extracellular matrix ที่ห่อหุ้มอยู่ ฉะนั้นการทำลาย extracellular matrix จึงถือเป็นคุณสมบัติสำคัญสำหรับการบุกรุกของเซลล์ มีรายงานว่าเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีความสามารถในการสร้างและหลั่งเอ็นไซม์ที่ทำลาย extracellular matrix (matrix-degrading enzymes) เช่น collagenase I, IV, matrix metalloproteinases (MMPs) มากขึ้น และ ปริมาณ matrix-degrading enzymes มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการบุกรุก matrigel (artificial extracellular matrix) และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง [2] นอกจากนี้ MMPs แล้ว เอ็นไซม์อีกตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการทำลาย extracellular matrix และ พบ overexpress ในเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด คือ urokinase plasminogen activator (uPA) เอ็นไซม์นี้จะเร่งการทำลาย extracellular matrix โดยไปกระตุ้น plasminogen activator ให้เป็น plasmin ซึ่งเป็น protease ที่ไม่ค่อยมีความจำเพาะต่อ substrate มากนัก plasmin นอกจากจะสามารถย่อย extracellular matrix ได้เองแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ MMPs หลายชนิด โดยการย่อย pro-MMPs ให้เป็น active MMPs ได้อีก [3] นอกจากการทำหน้าที่เป็น protease แล้ว uPA ยังสามารถทำหน้าที่ส่งสัญญาณกระตุ้นขบวนการต่างๆของเซลล์ได้อีก ในการนี้ uPA จะมาจับ uPA receptor บนผิวเซลล์มะเร็ง ซึ่งการจับกันระหว่าง uPA และ uPA receptor สามารถส่งสัญญาณกระตุ้นการเคลื่อนที่และการแบ่งเซลล์ ผ่านทาง integrin [4]

คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของ cytoskeleton โดยเฉพาะ actin polymerization ในชั้นแรกเซลล์ยื่น membrane ส่วนด้านหน้าเซลล์ออกไป ซึ่งเกิดจากการ polymerization ของ actin ที่ บริเวณ leading edge ซึ่งจะดันให้

membrane ยื่นออกไปเป็นโครงสร้างแบบแผ่น (lamellipodium) หรือ แบบเส้น (filopodium) ต่อมา membrane ที่ยื่นออกมาจะเกาะติดกับพื้นผิว หรือ extracellular matrix ในตำแหน่งใหม่ ตามด้วยการที่ ส่วนท้ายของเซลล์จะหลุดจากพื้นผิว พร้อมกับการหดตัวของตัวเซลล์ ดึงตัวเซลล์เข้าไปข้างหน้า ซึ่งการหดตัวของเซลล์นั้นเกิดจากการทำงานของ actin polymer ประเภท stress fiber (ซึ่งเป็นสายใยของ actin ที่ ยึดระหว่าง focal adhesion (จุดที่เซลล์เกาะติดอย่างแน่นหนากับ extracellular matrix)) กับ myosin ใน ทำนองเดียวกับการหดตัวของกล้ามเนื้อ ขบวนการนี้จะเกิดเป็นวงจร ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ออกมาจากที่เดิม ได้ ฉะนั้นการหดตัวของเซลล์ การเกาะติด และการหลุดออกจากพื้นผิว หรือการเกิดและสลาย focal adhesion จะเกิดขึ้นสลับกันอยู่ตลอดเวลาในระหว่างที่เซลล์เคลื่อนที่ออกไป และเป็นขบวนการสำคัญในการเคลื่อนที่ของเซลล์

การบุกรุกและการเคลื่อนที่ของเซลล์นั้นเกิดขึ้นภายใต้การกระตุ้นของสัญญาณจากภายนอก มี รายงานว่า MAP kinase (ERK1/2) มีผลไปกระตุ้น myosin light chain kinase (MLCK) ทำให้มีการ กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ myosin regulatory light chain (MRLC) ซึ่งจะไปควบคุมส่วนหัวของ myosin เป็นผลไปกระตุ้น actomyosin contraction โดย myosin จะคืบไปตามสาย actin stress fiber ทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์ใน MCF-7 และ cos-7 cell lines [5] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า MAP kinase มีผลไปเติมหมู่ฟอสเฟตแก่โปรตีนที่ควบคุมการเกิดและสลาย focal adhesion ได้แก่ FAK และ paxillin ในเซลล์ HEK293 ด้วย [6] นอกจากผลต่อการเคลื่อนที่ MAP kinase ยังมีผลเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์ในการ ย่อยสลาย extracellular matrix ได้แก่ matrix metalloproteinase (MMP 9) และ urokinase plasminogen activator (uPA) ในเซลล์บางชนิดอีก [7].

PI3 kinase signaling pathway เป็นอีกสัญญาณหนึ่งที่มีบทบาทในการควบคุมพฤติกรรมทาง ชีววิทยาหลากหลายอย่าง ได้แก่ การมีชีวิตอยู่ การแบ่งเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ PI3 kinase ถูก กระตุ้นได้โดยสัญญาณจากภายนอกหลากหลายชนิด เช่น growth factor ผ่านทาง receptor บนผิวเซลล์ และ extracellular matrix ผ่านทาง integrin บนผิวเซลล์ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้น PI3 kinase จะถูกดึงมายังผิว เซลล์ และไปกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งที่ 3 ให้กับ phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) บนเมมเบรนให้เป็น phosphatidylinositol triphosphate (PIP₃) PIP₃ ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวดึงให้โปรตีนที่มี PH domain เช่น Akt, PDK1 และอื่นๆ มาจับ ซึ่งเป็นการส่งสัญญาณเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง ชีววิทยาต่างๆ ต่อไป เช่นในกรณีของ Akt เมื่อถูกดึงมาที่เมมเบรนจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต และ ถูกกระตุ้น โดย PDK1 ซึ่งก็ถูกดึงมาที่เมมเบรนโดย PIP₃ เช่นเดียวกัน จากนั้น Akt ซึ่งเป็น protein kinase จะไปเติม หมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนตัวอื่นๆต่อ เช่น Bad ทำให้มีผลต้านการตายของเซลล์ ทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ [8]

PI3 kinase มีบทบาทต่อการเกิดมะเร็ง การบุกรุกและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งหลากหลาย ชนิด มีการรายงานว่ พบการเพิ่มขึ้นของสัญญาณในวิธีนี้ เช่นการเพิ่ม หรือการกลายพันธุ์ของ catalytic subunit ของ PI3 kinase, Akt (downstream effector ของ PI3 kinase) ในมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งรัง ไข่ เต้านม ปอด ลำไส้ และ อื่นๆ [9, 10] การยับยั้ง PI3 kinase pathway มีผลยับยั้งความสามารถในการ บุกรุกของเซลล์มะเร็งที่ถูกระตุ้นโดยอินซูลิน [11]

สัญญาณทั้งสองนี้มีความสำคัญในการควบคุมพฤติกรรมทางชีววิทยาหลายอย่างรวมทั้งการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ และการบุกรุกของเซลล์ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งบางชนิด สัญญาณเหล่านี้จะมีบทบาทในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากอย่างไร และมีกลไกอย่างไร

วัตถุประสงค์

จากที่ได้กล่าวมาแล้วจะเห็นว่า ขบวนการทางชีววิทยาหลายอย่างเหล่านี้เกิดขึ้นภายใต้การควบคุมของสัญญาณจากภายนอก ซึ่งจะส่งสัญญาณผ่านทาง signal transduction pathway ต่างๆ Signaling pathway ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งตัว และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (ซึ่งเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจาย) ได้แก่ PI3 kinase, Ras/MAP kinase และ Rho pathways จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ เราพบว่า ระดับ MAP kinase ที่ active มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับความสามารถในการแพร่กระจาย (metastatic potential) ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของหนู นอกจากนี้ ยังพบว่า MAP kinase มีบทบาทสำคัญในการ invasion และ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงด้วย

ในโครงการนี้ เราต้องการศึกษาถึงกลไกการควบคุมการเคลื่อนที่ของ MAP kinase ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้ เรายังจะศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของ PI3 kinase ต่อการบุกรุกของเซลล์ และการถ่ายทอดสัญญาณ ผ่านทาง PI3 kinase ซึ่ง PI3 kinase อาจส่งสัญญาณผ่านทาง MAP kinase

- 1.1. ศึกษาความสำคัญของ PI3 kinase ต่อความสามารถในการ invade ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก โดยใช้ specific inhibitor (LY294002)
- 1.2. ศึกษากลไกในการยับยั้งการบุกรุกของเซลล์โดย PI3 kinase inhibitors โดยตรวจสอบผลของ inhibitor ต่อบัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและการบุกรุกของเซลล์ ได้แก่
 - การเคลื่อนที่โดย Transwell assay
 - เอนไซม์ที่ย่อย extracellular matrix เช่น MMP2, uPA ทั้งในระดับเอนไซม์ที่หลั่งออกมา และระดับ mRNA
 - การจัดเรียงตัวของ actin ซึ่งสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์
- 1.3. ศึกษาการส่งสัญญาณระหว่าง PI3 kinase และ MAP kinase
- 1.4. ศึกษากลไกของ MAPK ในการควบคุมความสามารถในการ invade ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่มี metastatic potential สูงเพิ่มเติม โดยศึกษาผลของสารยับยั้งต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ myosin regulatory light chain (MRLC) และ focal adhesion kinase (FAK) ซึ่งสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์
- 1.5. ศึกษาการทำงานร่วมกันของ MAP kinase และ PI3 kinase ในการควบคุมการเคลื่อนที่ และการบุกรุกของเซลล์

วิธีการทดลอง

2.1) cell lines ที่ใช้ในการทดลอง

เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก Dunning rat prostrate tumor sublines ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง (MLL) จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มี 10% FBS ในตู้บัพ 37°C, 5% carbon dioxide

2.2) การวัดความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation assay) โดยวิธี MTT assay

Trypsinized เซลล์จากจานเลี้ยงเซลล์ เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS ให้ได้ปริมาณเซลล์ 2500 เซลล์ ต่อ 100µl ใส่เซลล์ลงใน 96 well plate หลุมละ 2500 เซลล์ เลี้ยงไว้ข้ามคืนวันรุ่งขึ้น เปลี่ยนเป็น media ที่มี DMSO หรือ LY294002 (PI3 kinase inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ incubate ไว้ในตู้บัพ carbon dioxide 37°C นาน 48 ชม. เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะ ถูกย้อมด้วย MTT โดยการเติม 5 mg/ml MTT ลงใน media ในอัตราส่วน 1:10 incubate ต่ออีก 3-4 ชม. เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยน MTT ให้เป็นผลึก Formazan dye ซึ่งมีสีม่วง หลังจากนั้นเอา media ออกและละลายผลึกโดยการเติม DMSO 200 µl อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยใช้ microtiter plate reader จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะบอกเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

2.3) การตรวจวัดความสามารถในการบุกรุกผ่าน Matrigel (Invasion assay) โดยใช้ Transwell

ความสามารถของเซลล์ ในการบุกรุกผ่าน Matrigel (synthetic extracellular matrix) และ 8 µm เมมเบรน (หรือ ที่เรียกว่า invasive ability) จะถูกตรวจวัด โดยใช้วิธี Transwell in vitro invasion assay โดยดูจากจำนวนเซลล์ที่สามารถบุกรุก ลงไปอยู่ด้านล่างของเมมเบรน

ก่อนทำการทดลองจะต้องทำการเคลือบเมมเบรนของ upper chamber ของ transwell ด้วย 30 µg matrigel (Collaborative Research, Becton Dickinson, U.K.) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum ทิ้งไว้ 1 คืน ในตู้บัพ 37°C Trypsinize เซลล์ที่เตรียมไว้ และเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS แต่มี DMSO หรือ LY294002 (PI3 kinase inhibitor) ความเข้มข้นต่างๆ นำเซลล์ 2×10^5 เซลล์ใส่ใน upper chamber ที่เคลือบด้วย Matrigel ไว้แล้ว ส่วนใน lower chamber ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS 600µl incubate ในตู้บัพ CO₂ 37°C 6 ชม. เมื่อครบกำหนดเช็ดเซลล์บน upper chamber ออก และย้อมเซลล์ที่บุกรุกเข้าไปใต้เมมเบรนด้วย 0.5% crystal violet ใน 25% Methanol 20 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น และนับจำนวนเซลล์ได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10x ได้ค่าเป็น จำนวนเซลล์/ field

2.4) การตรวจหาปริมาณ matrix metalloproteinases (MMPs) ที่หลั่งออกมาโดย Gelatin zymography

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS จนได้ 80% confluent จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum แต่มี LY294002 ในความเข้มข้นต่างๆ incubate เป็นเวลา 6 ชม. แล้วจึงเก็บ conditioned media มาตรวจสอบ gelatinase activity โดย gelatin zymography ผสมสารตัวอย่าง (conditioned media) กับ SDS sample buffer ที่ไม่มี reducing agent และแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 7.5% SDS-PAGE ที่มี gelatin 1 mg/ml หลังจากนั้นนำ gel มาล้างด้วย 2.5% triton X-100 และ incubate gel ใน

reaction buffer (500mM Tris-Cl pH7.5, 100mM CaCl₂, 1mM ZnCl₂, 10% triton X-100, 2% NaN₃) 17 ช.ม. ที่ 37°C ย้อม gel ด้วย Coomassie blue บริเวณที่มี gelatinase activity จะปรากฏเป็นแถบใส

2.5) การตรวจหาปริมาณ urokinase plasminogen activator (uPA) ที่หลั่งออกมา และที่อยู่ผิวเซลล์โดย Plasminogen gelatin zymography

เลี้ยงเซลล์และใส่ยาในทำนองเดียวกับการหา MMP เก็บ conditioned media มาทำให้เข้มข้น และตรวจสอบ uPA ที่หลั่งออกมา ส่วน uPA บนผิวเซลล์ เตรียมโดย elute uPA ที่จับกับ uPA receptor บนเซลล์ด้วย glycine pH3 uPA activity ใน conditioned media และที่สกัดจากผิวเซลล์ ถูกตรวจวัด โดย Plasminogen gelatin zymography ใน 10% SDS-PAGE ที่มี gelatin 1 mg/ml และ Plasminogen 10 µg/ml หลังจากนำ gel มาล้างด้วย 2.5% triton X-100 และ incubate gel ใน reaction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.15 M NaCl, and 1% triton X-100) 17 ช.ม. ที่ 37°C ย้อม gel ด้วย Coomassie blue บริเวณที่มี uPA activity จะปรากฏเป็นแถบใส

2.6) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ mRNA ของยีน uPA และ MMP2

ลงเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ใน plate ขนาด 60 มม แล้วนำไป incubate ในตู้ CO₂ incubator อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เซลล์จะถูก treated ด้วย LY294002 ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 µM โดยใช้ DMSO เป็น control แล้ว incubate ต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงทำการ trypsinize เซลล์เพื่อนำเซลล์มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNA, RNeasy mini kits (Qiagen), วัดปริมาณ RNA ที่ OD260 แล้วคำนวณปริมาณ RNA จากสูตร (RNA (ng/µl) = 40 x dilution factor x OD260)

ทำการเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้ จำนวน 2 µg ไปเป็น cDNA ด้วย Superscript III-Reverse transcription (Invitrogen) แล้วนำ cDNA ที่ได้ ไปทำการหาปริมาณของการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยวิธี realtime PCR ด้วยเครื่อง Rotor gene 3000 (Corbett) และทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Rotor-gene 5.0 โดยใช้ Primers ดังตารางที่แสดงไว้ข้างล่าง

ตารางที่ 1 แสดง primers ในการทำ Realtime-PCR

	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→ 3')
Actin	GCCCTGGCTCCTAGCACC	CCACCAATCCACACAGAGTACTTG
MMP2	TGACCTTGACCAGAACACCA	CCCATACTTTACGCGGACCA
uPA	GTGGAGAACCAGCCCTGGT	GGCAGGCAGATGGTCTGTAT

ส่วนประกอบในการทำ PCR reaction

10X buffer	2.0	µl
dNTP	0.4	µl
F-primer	0.4	µl

R-primer	0.4	μl
HotstarTaq-Polymerase	0.1	μl
SyBr-Green	0.5	μl
Template	1.0	μl
DW	15.2	μl

โดยจำนวนของ Template ที่ใช้ในการทำ Realtime-PCR ของยีน Actin และยีน uPA เท่ากับ 5 ng และ สำหรับยีน MMP2 เท่ากับ 50 ng

อุณหภูมิที่ใช้ในการทำ Realtime PCR

Initiation	95 °C	15 นาที	} 40 Cycles
Denaturation	94 °C	30 วินาที	
Annealing	56 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	30 วินาที	

2.7) Western blot เพื่อหาปริมาณ MAP kinase, MLCK, Akt, FAK และ Paxillin ทั้งหมด และ ที่ถูกเติม หมู่ฟอสเฟต

เนื่องจาก MAP kinase ถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต เราจึงใช้ระดับของ MAP kinase ที่มีหมู่ฟอสเฟต (phospho-MAP kinase) เป็นตัวบ่งชี้ถึง MAP kinase ที่ถูกกระตุ้น ปริมาณ MAP kinase ทั้งหมด และ MAP kinase ที่ถูกกระตุ้น ในเซลล์ หาได้โดย western blotting โดยใช้ anti-MAP kinase และ anti-phospho-MAP kinase antibodies เป็น primary antibodies

ในทำนองเดียวกัน Akt, phospho-Akt, FAK, phospho-FAK, paxillin และ phospho-paxillin ได้ถูกตรวจหาโดย western blotting โดยใช้ anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-FAK, anti-phospho-FAK, anti paxillin และ anti-phospho-paxillin (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Ishibe S) เป็น primary antibodies

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่มี 10% FBS จนกระทั่งมีปริมาณประมาณ 80 % confluent Treat เซลล์ด้วย inhibitor 1 หรือ 6 ชั่วโมง หรือ DMSO เพื่อเป็น control Harvest cell lyse และแยกโปรตีนในเซลล์ lysate ด้วยกระแสไฟฟ้าโดย SDS-PAGE โปรตีนในเจลจะถูก transfer ลงบน nitrocellulose membrane ด้วยกระแสไฟฟ้า ตรวจหาโปรตีนและฟอสโฟโปรตีนที่ต้องการด้วยวิธี western blotting โดยใช้ antibodies ต่อโปรตีนนั้นๆ เป็น primary antibodies ตามด้วย secondary antibodies ที่ต่อกับ horse raddish peroxidase และตรวจหาแถบโปรตีนด้วยการทำปฏิกิริยากับ ECL plus (GE Health Care)

2.8) การสร้าง cell line ที่มี active MAP kinase สูง

เซลล์ ที่มี active MAP kinase สูงจะถูกสร้างโดยการ transfect AT-01 cell ที่มี metastatic potential และ active MAP kinase ต่ำ ด้วย MEK-EE plasmid โดยใช้ Lipid Fugene6 (Roche)

MEK-EE pcDNA3 ได้จากการตัดต่อจาก MEK-EE gene ของกระต่าย จาก MEK-EE pGEX3X ซึ่งได้จาก Prof C Marshall ต่อเข้ากับ pcDNA3 vector MEK-EE pcDNA3 เป็น plasmid ที่คาดว่าจะผลิต MEK mutant ที่ active ซึ่ง MEK เป็นโปรตีน kinase ที่เติมหมู่ phosphate ให้ และ กระตุ้น MAP kinase plasmid นี้มี neomycin เป็น selectable marker

ขั้นแรกศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfection โดยใช้ plasmid ที่สร้าง beta-galactosidase (pCH110) เป็นตัวบ่งชี้สถานภาพของการ transfection เติม 2-12 ul FuGENE 6 ลงใน media ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้ว หยดลงในหลอดที่มี 1-2 ug DNA (pCH110 plasmid) ตั้งไว้อีก 15 นาที จึงใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ 70-80% confluent และหลังการ transfection 48 ชั่วโมงย้อมเซลล์ ด้วย X-gal เซลล์ที่มี pCH110 จะผลิต beta-galactosidase ซึ่งจะ hydrolyze X-gal ให้ได้สีน้ำเงิน

Transfect AT-01 cell ด้วย MEK-EE plasmid โดยใช้ condition ที่เหมาะสม ที่ทำให้ความสามารถในการ transfect สูงสุด และทำการคัดเลือก โดยเลี้ยงใน media ที่มี 0.5 mg/ml G418 สองสัปดาห์ เก็บเซลล์ที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะนี้มาตรวจสอบปริมาณ MAP kinase ทั้งหมด และ active (phospho) MAP kinase โดย western blotting ตามข้อ 2.7

2.9) การศึกษาการจัดเรียงตัวของ actin ในเซลล์

เลี้ยงเซลล์บน coverslip ปลอดเชื้อ 2 วัน และนำเซลล์ที่ต้องการย้อม actin cytoskeleton มาล้างเซลล์ 2 รอบด้วย PBS แล้ว Fix เซลล์ใน Fixative solution ซึ่งประกอบด้วย 3% Paraformaldehyde, 2% sucrose 10 นาที ล้างด้วย PBS อีก 2 รอบ แล้ว Permeabilize เซลล์ด้วย 0.5 % TritonX-100 ที่ละลายใน PBS 5 นาที แล้วล้างเซลล์ ด้วย PBS อีกครั้ง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย 0.4 μ g/ml phalloidin-TRITC (Sigma) 5 นาที (ซึ่ง phalloidin จะจับกับ F-actin) และล้างด้วย PBS 10 รอบ ตามด้วยการ mount coverslip บน slide โดยใช้ 75 % glycerol เป็น permount แล้วจึงนำไปศึกษาภายใต้กล้อง Fluorescence microscope

2.10) การศึกษาผลของ PD98059 ต่อการจับกันระหว่าง paxillin และ FAK โดย immunoprecipitation

เลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงขนาด 100 มม. จนได้ 80% confluent แล้วจึง Incubate เซลล์ใน media ที่มีและไม่มี 100 μ M PD98059 6 ชม. Harvest และ Lyse เซลล์ด้วย EBC lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.2 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 1x protease inhibitor cocktail) นำ cell lysate ที่มีโปรตีน 1500 มก. มา immunoprecipitate โดยการเขย่ากับ antibody ต่อ FAK ตามด้วย protein A-sepharose bead โปรตีน FAK และโปรตีนที่เกาะอยู่กับ FAK จะถูกดึงลงมาด้วย anti-FAK ซึ่งไปจับกับ protein A-sepharose bead และตกตะกอนลงมา หลังจากล้าง bead โปรตีนที่จับอยู่กับ bead จะถูกปล่อยออกมาโดยการเติม SDS-loading buffer แล้วจึงแยกโปรตีนในสารตัวอย่างกระแสไฟฟ้าโดย 7% SDS-PAGE และ blot ด้วย antibody ต่อ paxillin

2.11) การศึกษาตำแหน่งที่อยู่ของ FAK, paxillin และ vinculin โดย immunofluorescence

เลี้ยงเซลล์บน coverslip ปลอดเชื้อ 2 วัน Fix เซลล์ และ permeabilize เช่นเดียวกับการย้อม actin จากนั้นย้อมเซลล์โดย incubate กับ primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้นๆ หลังจากล้าง antibody ส่วนเกินออก แล้ว incubate กับ secondary antibody ที่ต่อกับสารเรืองแสง mount coverslip แล้วจึงนำไปศึกษาภายใต้กล้อง confocal microscope

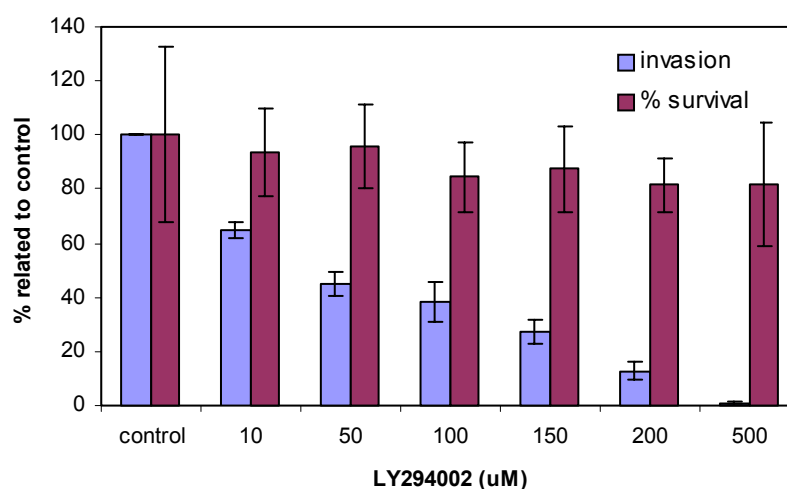
ผลการทดลอง

การศึกษาบทบาทของ PI3 kinase ในขบวนการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก

3.1) ศึกษาผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ในการยับยั้งขบวนการ invasion

เราได้ทำการศึกษาความสำคัญของ PI3 kinase ในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งโดยใช้ PI3 kinase inhibitor (LY294002) และพบว่า inhibitor นี้สามารถยับยั้งการบุกรุกผ่าน Matrigel และ เมมเบรน (invasion) ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก rat prostatic adenocarcinoma, Dunning subline ชนิด แพร์กระจายสูง (MLL) ได้ (รูปที่ 1) โดยมี ค่า IC_{50} (50 % inhibition concentration) ประมาณ 40 μM

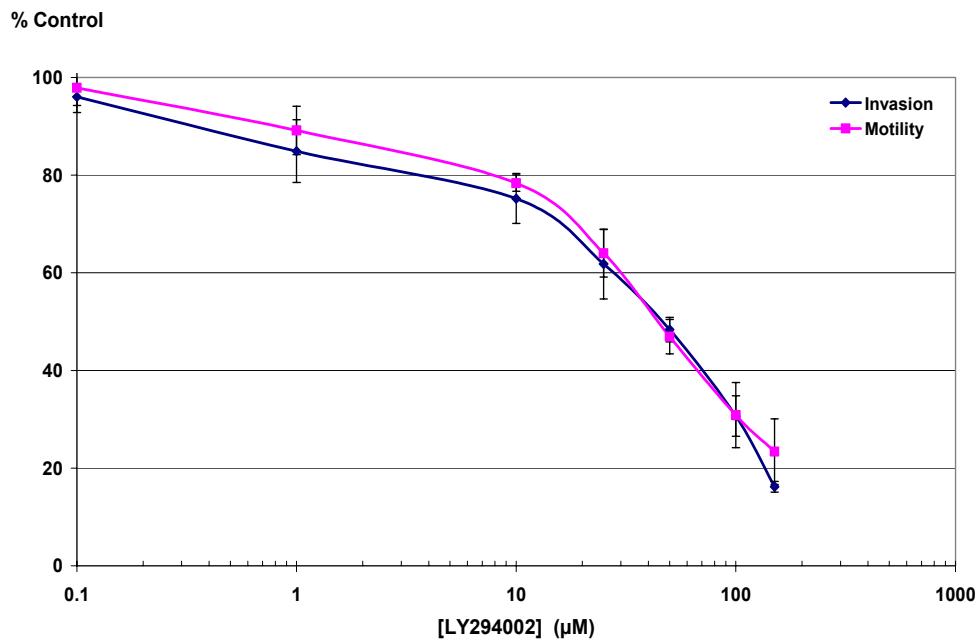
เพื่อเป็นการยืนยันว่า การยับยั้งการบุกรุก Matrigel ของ inhibitor นี้ ไม่ได้เป็นผลเนื่องมาจากการฆ่าเซลล์หรือความเป็นพิษของ inhibitor จึงได้ทำการศึกษาผลของ inhibitor ต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (cell survival) และพบว่า LY294002 (ในสภาวะที่ทำการศึกษายับยั้ง invasion) มีผลต่อ cell survival น้อยมาก โดยที่ความเข้มข้นสูงสุด (500 μM) (ที่ยับยั้ง invasive ability ของ MLL ได้เกือบสมบูรณ์) สามารถยับยั้ง cell survival ได้เพียงไม่ถึง 20% เท่านั้น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ผลของ PI3 kinase inhibitor ในการยับยั้งการบุกรุกและการอยู่รอดของเซลล์ MLL Resuspend เซลล์ในอาหารที่มี และไม่มี LY294002 แล้วนำมาวัดความสามารถในการบุกรุกด้วย Transwell ที่เคลือบด้วย matrigel และ incubate เป็นเวลา 6 ชม. ในการวัดความอยู่รอดของเซลล์ treat adherence cells ด้วยอาหารที่มี และไม่มี LY294002 ใน 96 well plate เป็นเวลา 6 ชม. และวัดความอยู่รอดของเซลล์โดย MTT assay ข้อมูลที่แสดงคือ mean $\pm$ SEM จากการทดลอง 3 ครั้งที่ย้ำ

3.2) ศึกษาผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ในการยับยั้งขบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า PI3 kinase มีความสำคัญต่อการบุกรุกของเซลล์ เพื่อศึกษาถึงกลไกในการควบคุมการบุกรุก เราจึงศึกษาถึงผลของ inhibitor ต่อคุณสมบัติต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมความสามารถในการบุกรุกของเซลล์ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสลาย extracellular matrix จากการทดลองพบว่า PI3 kinase inhibitor (LY294002) ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ MLL โดยที่มีรูปแบบของ dose response curve และ IC_{50} ที่เหมือนกับ การยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ (รูปที่ 2)

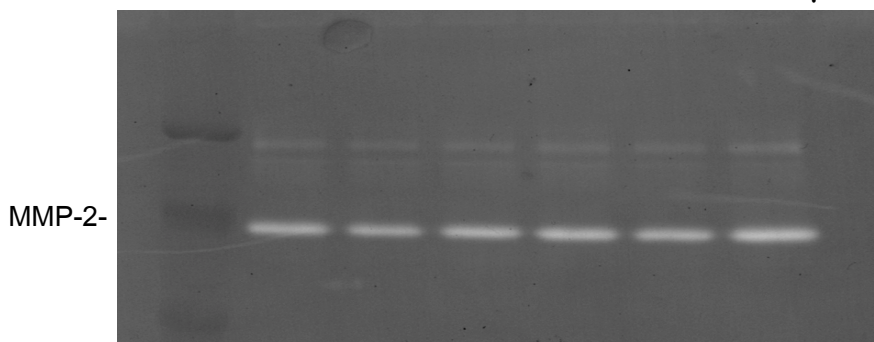


รูปที่ 2 ผลของ PI3 kinase inhibitor ในการยับยั้งการเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์ Resuspend เซลล์ในอาหารที่มี และไม่มี LY294002 แล้วนำมาวัดความสามารถในการเคลื่อนที่และการบุกรุกด้วย Transwell ที่ไม่เคลือบ และ เคลือบด้วย matrigel ตามลำดับ และ incubate เป็นเวลา 6 ชม. ข้อมูลที่แสดง คือ mean $\pm$ SEM จากการทดลอง 3 ครั้งที่อิสระ

3.3) ศึกษาผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ต่อปริมาณการหลั่ง MMP2

การหลั่ง matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง ในการสลาย extracellular matrix และทำให้เซลล์บุกรุก basement membrane และ stroma และเคลื่อนที่ออกจากแหล่งที่อยู่เดิมได้ จากการศึกษาค้นคว้าของ inhibitor ต่อการหลั่ง MMP โดย gelatin zymography พบว่า LY294002 ไม่มีผลลดปริมาณ MMP2 ที่หลั่งจากเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3)

LY294002 0 10 25 50 100 150 μM

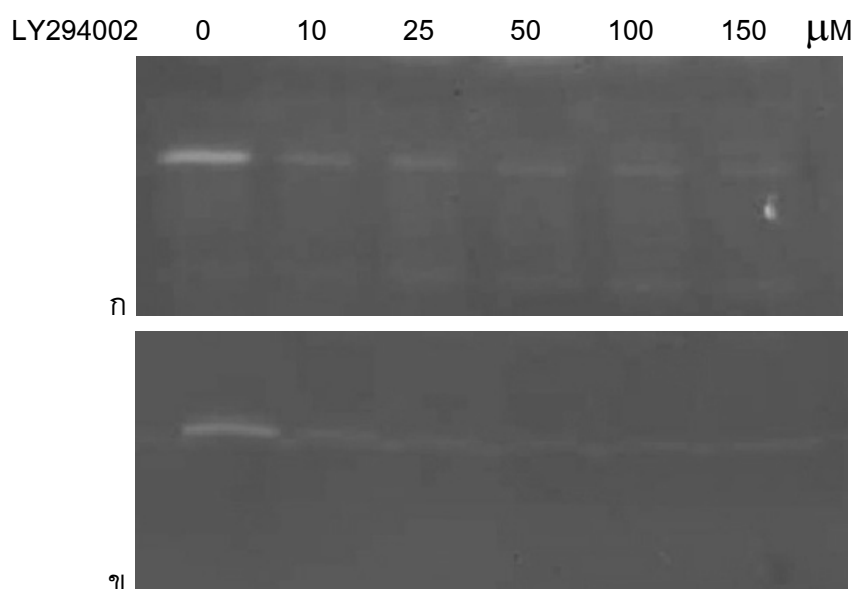


รูปที่ 3 Gelatin zymogram แสดงผลของ PI3 kinase inhibitor ต่อการหลั่ง MMP2 Treat adherence cells ด้วยอาหารที่ไม่มี serum ที่มี และไม่มี LY294002 เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำ conditioned media มาตรวจหา MMP-2 และ 9 โดย gelatin zymography

3.4) ศึกษาผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ต่อ urokinase plasminogen activator (ทั้งที่หลั่งออกสู่ media และ ที่เกาะที่ผิวเซลล์)

urokinase plasminogen activator (uPA) คือ serine protease ที่ไปกระตุ้น เอ็นไซม์ plasminogen ให้เป็น plasmin ซึ่งเป็น protease ที่ไม่จำเพาะ สามารถย่อย extracellular matrix หรือ กระตุ้น MMPs ให้ไปย่อย extracellular matrix ฉะนั้น uPA จึงเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ MLL cell ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง ยังมีการแสดงออกของ uPA สูงเมื่อเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำอย่าง AT-01 แม้จะมีการเพิ่มขึ้นของ uPA ใน MLL cell ปริมาณ uPA ที่หลั่งออกจากเซลล์ยังคงน้อยมาก จึงจำเป็นต้องทำให้เข้มข้นถึง 100 เท่า ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย plasminogen-gelatin zymography

จากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี PI3 kinase inhibitor พบว่า ปริมาณ uPA ทั้ง ที่หลั่งออกสู่ media และ ที่เกาะที่ผิวเซลล์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและเป็นไปตามขนาดของยาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4ก, ข) โดยที่ความเข้มข้นนี้ยาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมาก (จาก survival)

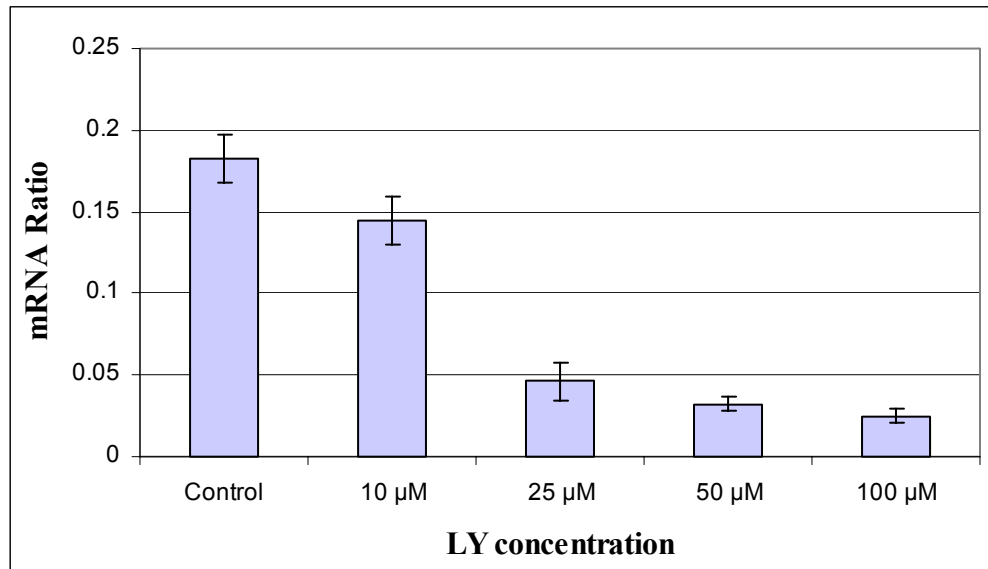


รูปที่ 4 Plasminogen gelatin zymogram แสดงผลของ PI3 kinase inhibitor ต่อปริมาณ uPA ที่หลั่งสู่ media (ก) และ uPA ที่เกาะที่ผิวเซลล์ (ข) Treat adherence cells ด้วยอาหารที่ไม่มี serum ที่มี และไม่มี LY294002 เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำ conditioned media (ก) และโปรตีนที่ elute จากผิวเซลล์ (ข) มาตรวจหา uPA โดย Plasminogen-gelatin zymography

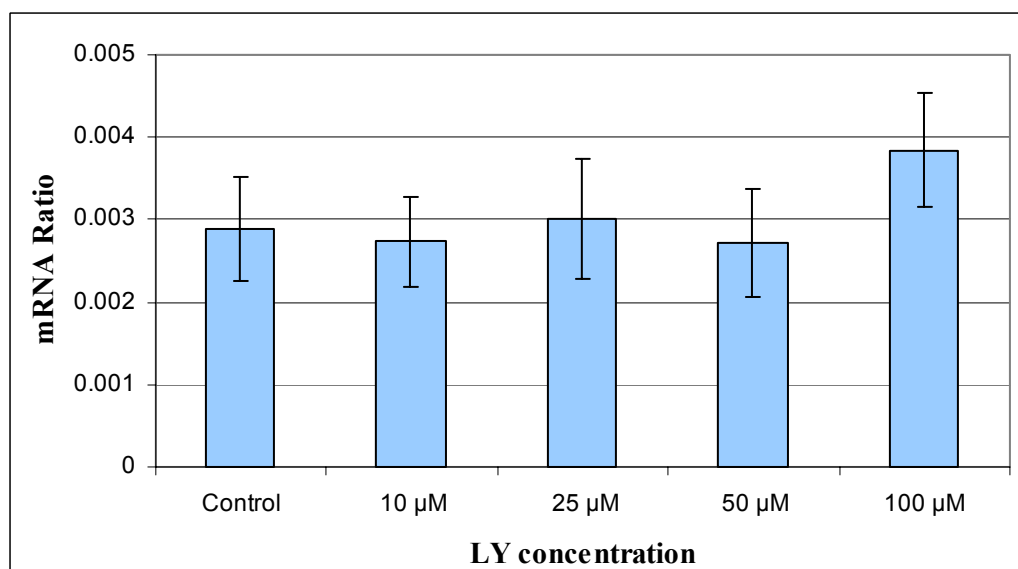
3.5) ศึกษาผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ต่อ ระดับ MMP2 และ uPA mRNA ในเซลล์

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า PI3 kinase inhibitor ลดปริมาณ matrix degrading enzyme ที่หลั่งออกจากเซลล์ เราจึงทำการศึกษาต่อว่า การยับยั้งนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการลดระดับ mRNA ของเอ็นไซม์หรือไม่ เมื่อ treat เซลล์ ด้วย LY294002 ที่ความเข้มข้นต่างๆ สกัด RNA และนำมาหาการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วย realtime RT-PCR และ ทำการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Comparative quantification (เป็นการเทียบปริมาณ mRNA ของยีนที่สนใจ (uPA และ MMP2) กับปริมาณ mRNA ของ actin ที่ใช้เป็นตัว normalize) โดยใช้โปรแกรม Rotor-gene 5.0 พบว่า ปริมาณ mRNA ของ uPA ลดลงตามความเข้มข้น

ของ LY294002 ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 5) ในขณะที่ mRNA ของ MMP2 ที่ความเข้มข้นต่างๆของ LY294002 นั้น มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6) ผลการทดลองในกราฟเป็นค่า mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ครั้ง จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการยับยั้ง PI3 kinase ด้วย LY294002 ทำให้ระดับ mRNA ของ uPA ลดลงซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณการหลั่งเอ็นไซม์ชนิดนี้น้อยลง แต่ไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของ MMP2 แต่อย่างไร



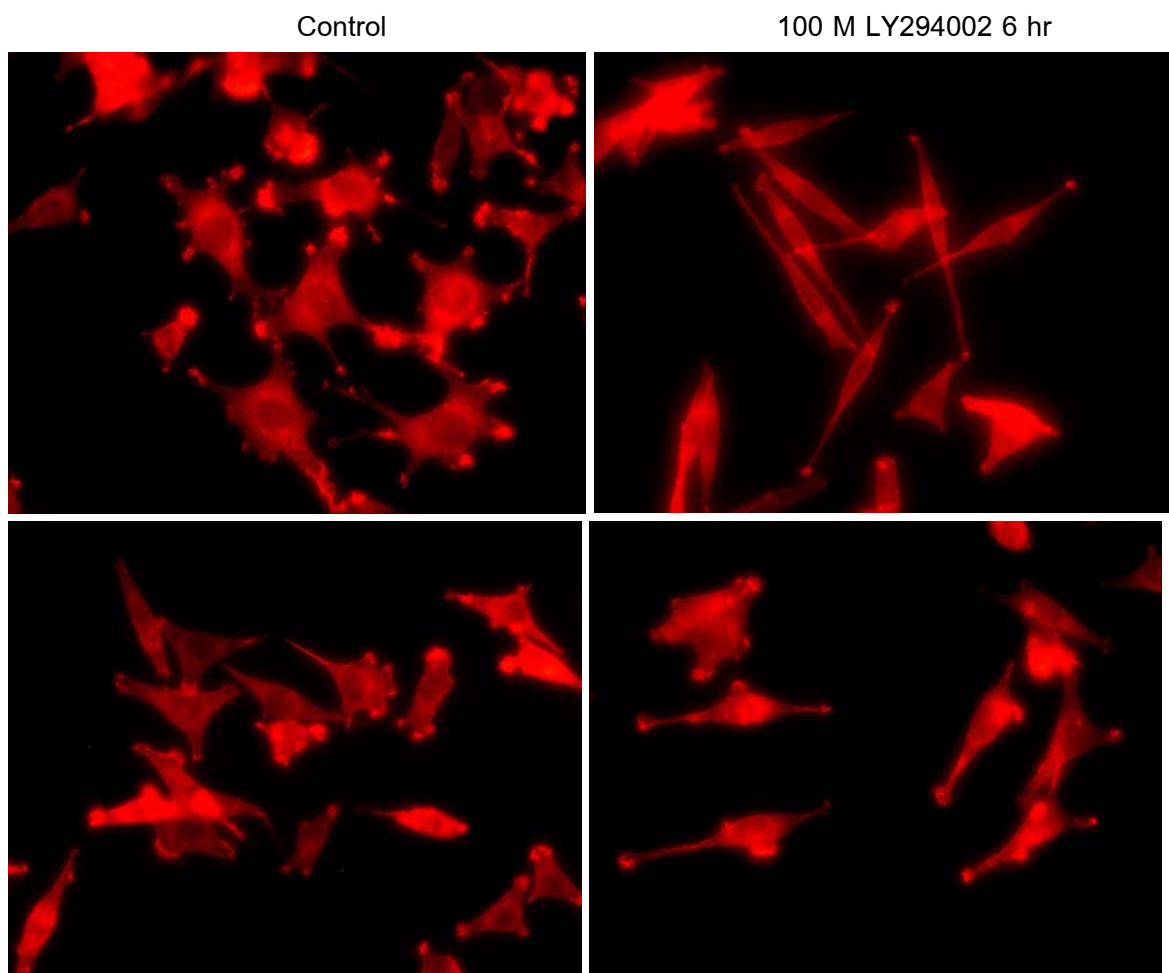
รูปที่ 5 ผลของ LY294002 ต่อระดับ mRNA ของยีน uPA ภายในเซลล์ Treat เซลล์ด้วย LY294002 เป็นเวลา 6 ชม. Lyse เซลล์ และ สกัด RNA แล้วนำมาหาการแสดงออกของยีน uPA โดย realtime RT-PCR เทียบกับยีน actin ค่าที่ได้เป็นค่า mean $\pm$ SD ของ 3 independent experiments หลังจาก normalize ด้วย actin



รูปที่ 6 ผลของ LY294002 ต่อระดับ mRNA ของยีน MMP2 Treat เซลล์ด้วย LY294002 เป็นเวลา 6 ชม. Lyse เซลล์ และ สกัด RNA แล้วนำมาหาการแสดงออกของยีน MMP2 โดย realtime RT-PCR เทียบกับยีน actin ค่าที่ได้เป็นค่า mean $\pm$ SD ของ 3 independent experiments หลังจาก normalize ด้วย actin

3.6) ศึกษาผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ต่อ การจัดเรียงตัวของ actin ในเซลล์

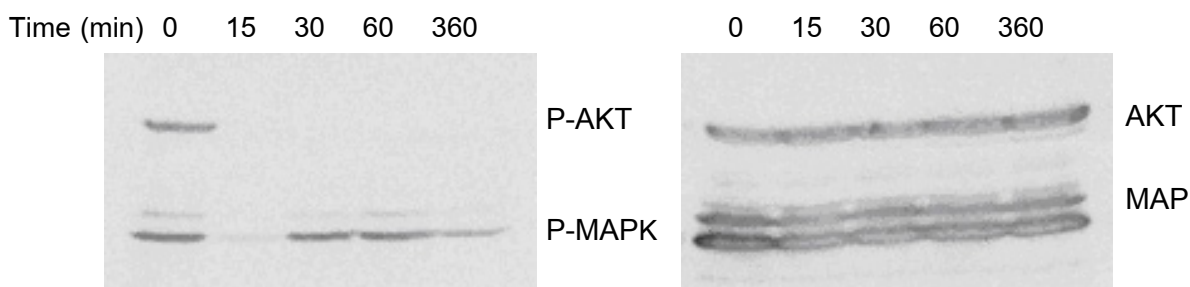
เนื่องจากการยับยั้ง PI3 kinase ส่งผลให้เซลล์มีการเคลื่อนที่น้อยลง จึงได้ศึกษาต่อว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการจัดเรียงตัวของ actin ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเคลื่อนที่ของเซลล์หรือไม่ เราจึงได้ศึกษาผลกระทบของ PI3 Kinase inhibitor (LY294002) ต่อการจัดเรียงตัวของ actin cytoskeleton ด้วยวิธี Fluorescence staining เซลล์ปกติที่ไม่ได้ treat ยาจะมีลักษณะแผ่ และมีส่วนของเมมเบรนยื่นเป็นแผ่น (lamellipodia) และ ส่วนของเมมเบรนยื่นเป็นเส้นเล็กๆ เรียก filopodia โดยเฉพาะบริเวณปลายรยางค์ร่วมด้วย บริเวณเหล่านี้จะมีการสะสมของ F-actin ซึ่งจะเห็นได้จากการย้อมเซลล์ด้วย Phalloidin-TRICT (รูปที่ 7) เมื่อ treat ด้วย LY294002 ที่ความเข้มข้น 100 μ M เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (เท่ากับเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์การบุกรุกของเซลล์) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของเซลล์และการจัดเรียงตัวของ F-actin โดยผลการทดลองแสดงเป็นภาพถ่ายเซลล์ที่กำลังขยาย 40X Fluorescence Light LY294002 มีผลต่อรูปร่างของเซลล์ และการจัดเรียงตัวของ actin cytoskeleton โดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากรูปแบบแผ่แบนไปเป็นลักษณะคล้ายกระสวยและมีรยางค์ที่ผอมยาวเป็นส่วนใหญ่ และมีการลดลงของ F-actin ในรูปแบบ lamellipodia และ filopodia (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 รูปร่างเซลล์ในกล้องจุลทรรศน์ แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ F-actin โดยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ในเซลล์ที่ย้อมด้วย Phalloidin-TRICT ในเซลล์กลุ่มที่ treat ด้วย 100 μ M LY294002 (ขวา) และ กลุ่ม control (ซ้าย) (ด้วย objective lens กำลังขยาย 40x)

3.7) ผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ต่อ การกระตุ้น MAP kinase

จากการทดลองที่ผ่านมา เราพบว่า ทั้ง MAP kinase และ PI3 kinase มีความสำคัญต่อความสามารถในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูชนิดแพร่กระจาย (Dunning MLL cell line) โดย MAP kinase inhibitor (PD98059) มีผลต่อการบุกรุกและการเคลื่อนที่ของเซลล์ ส่วน PI3 kinase inhibitor (LY294002) มีผลต่อการบุกรุกการเคลื่อนที่และการแสดงออกของเอนไซม์ที่ย่อย extracellular matrix ทั้งสองสัญญาณจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องเชื่อมโยงกันในการทำให้เกิดผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาเหล่านี้หรือไม่ PI3 kinase อาจส่งสัญญาณผ่านทาง MAP kinase เราจึงได้ศึกษาการส่งสัญญาณระหว่าง PI3 kinase และ MAP kinase จากรูปที่ 8 การยับยั้ง PI3 Kinase มีผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ MAP kinase ในช่วงเวลาหนึ่ง (ใน 15 นาทีแรก) (Transient effect) ขณะที่การยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt ซึ่งเป็นโปรตีนหลักตัวหนึ่งที่ตอบสนองต่อ PI3 kinase ยังคงดำรงอยู่ต่อไปอีก 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตัวชี้ว่า PI3 kinase น่าจะยังคงถูกยับยั้งอยู่



รูปที่ 8 ผลของ PI3 kinase inhibitor (LY294002) ต่อการกระตุ้น (เติมหมู่ฟอสเฟต) MAP kinase และ Akt Treat adherence cells ในอาหารที่มี และ ไม่มี LY294002 เป็นเวลา 6 ชม. และนำ cell lysate มาหาปริมาณโปรตีนที่ต้องการด้วย western blot ต่อ antibody ของโปรตีนนั้นๆ

ศึกษากลไกของ MAP kinase inhibitor (PD98059) ในการยับยั้งขบวนการ migration

จากการทดลองที่ผ่านมาเราพบว่า MAP kinase มีความสำคัญต่อความสามารถในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก Dunning MLL cell line โดย MAP kinase inhibitor (PD98059) ยับยั้งการบุกรุกและการเคลื่อนที่ของเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ MMP2 และ uPA มาย่อย extracellular matrix ในโครงการนี้ จึงได้ศึกษากลไกในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดย PD98059 นอกจากนี้ ยังได้พยายามสร้างเซลล์ ที่มี constitutively active MAP kinase เพื่อศึกษาผลในทางการเพิ่ม activity ของ MAP kinase

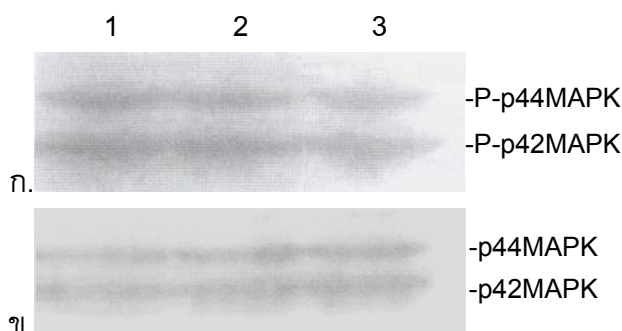
3.8) การสร้างเซลล์ ที่มี constitutively active MAP kinase

สร้างเซลล์ ที่มี constitutively active MAP kinase โดย transfect AT-01 cell ที่มี metastatic potential และ active MAP kinase ต่ำ ด้วย MEK-EE plasmid ซึ่งผลิต MEK ที่ active จึงไปเติมหมู่ phosphate และ กระตุ้น MAP kinase ให้ active

ขั้นแรกศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfection โดยใช้ plasmid ที่สร้าง beta-galactosidase (pCH110) เป็นตัวบ่งชี้สถานภาพของการ transfection และย้อมเซลล์ด้วย X-gal หลังการ transfection

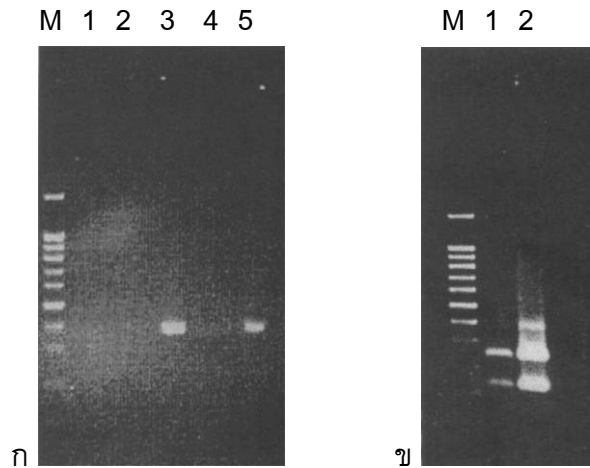
จากการ vary ปริมาณ lipid (Fugene6) และ DNA (pCH110 plasmid) พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ (lipid (ul): DNA (ug)) =12:1

Transfect AT-01 cell ด้วย MEK-EE plasmid โดยใช้ condition ดังกล่าว และทำการคัดเลือก โดยเลี้ยงใน media ที่มี 0.5 mg/ml G418 สองสัปดาห์ เซลล์ที่มีชีวิตรอด น่าจะเป็นเซลล์ ที่มี MEKEE plasmid เก็บเซลล์ หลังจากตรวจสอบปริมาณ MAP kinase ทั้งหมด และ MAP kinase ที่ถูกกระตุ้น ในเซลล์ที่ transfect ด้วย MAP kinase เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ transfect และ ที่ transfect ด้วย vector พบว่าปริมาณ MAP kinase ที่ถูกกระตุ้นไม่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ transfect ด้วย MEK-EE plasmid (รูปที่ 9) อาจเนื่องจากการ transfect ไม่ประสบผลสำเร็จ และ เซลล์พัฒนาตัวเองให้ดื้อต่อ G418 ได้มากขึ้น จึงเจริญในสภาวะที่มี G418 ได้ ไม่ประสบผลสำเร็จในการสร้าง cell line ที่มี active MEK สูง



รูปที่ 9 ปริมาณ MAP kinase ที่ถูกกระตุ้น (ก) และ MAP kinase ทั้งหมด (ข) ในเซลล์ที่ไม่ได้ถูก transfect (lane 1) transfect ด้วย pcDNA3 vector (lane 2) และ transfect ด้วย MEK-EE pcDNA3 (lane 3) นำ cell lysate มาหาปริมาณ MAP kinase และ phospho-MAP kinase ด้วย western blot

นำเซลล์มาสกัด DNA และตรวจหา MEK-EE โดยวิธี PCR โดยใช้ specific primer ที่ amplify MEK ของกระต่าย (จาก MEK-EE plasmid) แต่ไม่ amplify MEK ของหนู (endogenous MEK ในเซลล์) พบว่า เฉพาะ DNA extract จากเซลล์ที่ transfect ด้วย MEK-EE (แต่ไม่ใช่เซลล์ที่ไม่ได้ถูก transfect หรือ ที่ transfect ด้วย pcDNA3 vector) มีผลิตภัณฑ์ของ PCR (รูปที่ 10ก) และ ผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ถูกย่อย ด้วย HindIII แสดงว่า plasmid เข้าไปในเซลล์ แต่อาจไม่ express หรือ express แต่ไม่มี activity สำหรับ ความแตกต่างในด้าน species (เนื่องจาก MEKEE เป็นของกระต่าย ส่วนเซลล์ AT-01 เป็นเซลล์หนู) เป็นไปได้น้อย เนื่องจาก การใช้ overexpress ยีนนี้ ในเซลล์หนู NIH 3T3 ทำได้สำเร็จ และทำให้มี MAPK activation สูง (เนื่องจากเวลาและทุนมีจำกัด งานส่วนนี้จึงถูกยกเลิกไป และไปเพิ่มเติมในส่วนอื่นแทน)



รูปที่ 10 ผลผลิต PCR ของ DNA extract (ก) จากเซลล์ที่ transfect AT-01 (lane 2) AT-01 ที่ transfect ด้วย pcDNA3 vector (lane 3) และ ที่ถูก transfect ด้วย MEK-EE (lane 4), negative control ที่ไม่มี DNA (lane 5) และ positive control PCR MEKEE plasmid (lane 6); ผลผลิต PCR ที่ถูกย่อยด้วย HindIII (ข) DNA extract จาก AT-01 ที่ถูก transfect ด้วย MEK-EE (lane 2), จาก MEKEE plasmid (lane 3) M = 100 bp marker

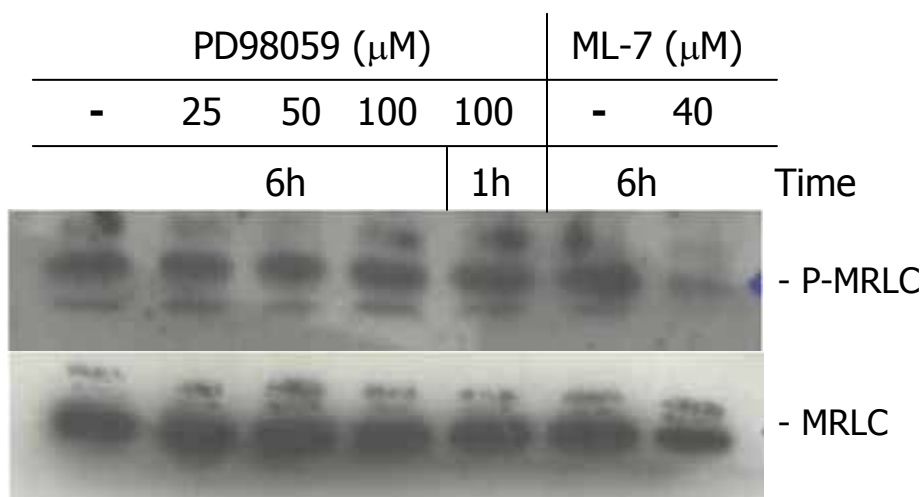
3.9) ศึกษาผลของ MAP kinase inhibitor (PD98059) ในการเติมหมู่ฟอสเฟตของ MLCK, FAK และ Paxillin

เนื่องจาก MAP kinase มีความสำคัญในการบงการและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก หนูในตระกูล Dunning subline ในรายงานนี้เราได้ศึกษากลไกการควบคุมการเคลื่อนที่โดย MAP kinase โดยตรวจสอบผลของ PD98059 ต่อ downstream effectors ของ MAP kinase ที่มีเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ ที่ได้เคยมีรายงานมา ได้แก่ Myosin light chain kinase (MLCK) /Myosin regulatory light chain (MRLC) Focal adhesion kinase (FAK) และ Paxillin ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก Dunning subline ชนิดแพร่กระจายสูง (MLL) เราตั้งสมมุติฐานว่า MAP kinase ควบคุมการเคลื่อนที่โดยผ่านทาง การเติมหมู่ฟอสเฟตและกระตุ้น MLCK FAK และ/หรือ Paxillin โดย MLCK จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ MRLC ซึ่งจะทำให้เกิด actomyosin contraction เป็น contractile force ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ แต่จากผลการทดลองของเราจะเห็นว่า PD98059 ในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ได้เกือบ 100 % ไม่มีผลยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ MRLC (รูปที่ 11) ในขณะที่ ML-7 ซึ่งเป็น MLCK inhibitor สามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ MRLC ได้ โดยเห็นได้จากความเข้มของ band phospho-MRLC ที่ลดลงเมื่อ treat เซลล์ด้วย ML-7 ในทำนองเดียวกันการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ Ser910 ของ FAK ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หลังจาก treat เซลล์ด้วย PD98059 (รูปที่ 12) ทั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยการแปรผันทั้งขนาดของสารยับยั้ง และเวลาในการ treat โดยที่สภาวะนี้สารยับยั้งสามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ MAP kinase ถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ใน western blot ในทางตรงกันข้ามการยับยั้ง MAP kinase มีผลลดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser83 ของ Paxillin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการเกิดและสลาย Focal adhesion complex

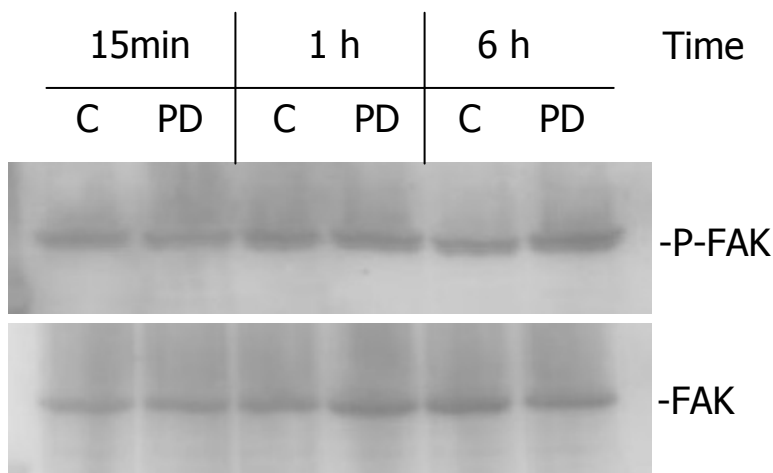
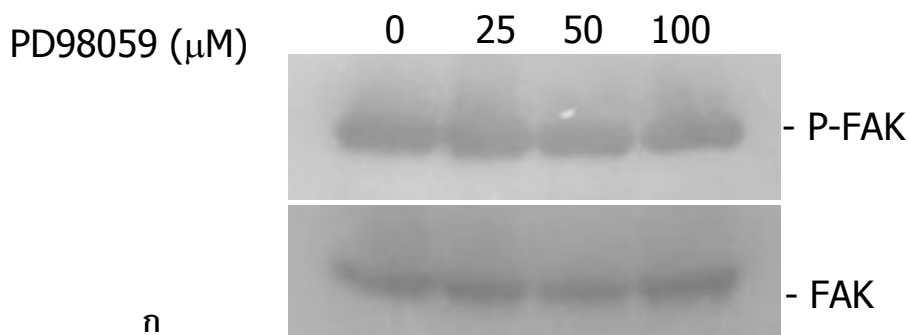
3.10 ศึกษาผลของ MAP kinase inhibitor (PD98059) ต่อการจับกันของ FAK และ paxillin และ

localization ของ FAK และ Paxillin ที่ Focal adhesion โดย immunofluorescence

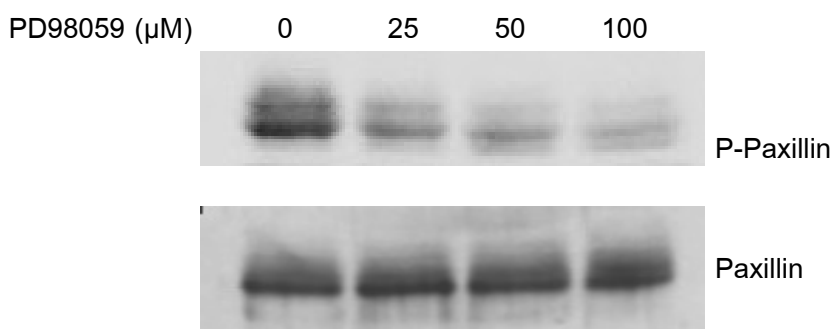
จากการที่ PD98059 สามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ paxillin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีรายงานว่าเมื่อถูกเติมหมู่ฟอสเฟต จะถูกดึงเข้ามาบริเวณ focal adhesion จับกับ FAK และมีผลต่อวงจรการเกิดและสลาย focal adhesion complex เราจึงได้ศึกษาผลของ PD98059 ต่อการจับกันของ FAK และ paxillin โดย immunoprecipitation รูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่า PD98059 ไม่มีผลต่อการจับกันระหว่าง FAK และ paxillin นอกจากนี้ยังศึกษาผลต่อ focal adhesion complex และการ localize ของ paxillin และ FAK ที่ focal adhesion site โดยดูจากการ colocalize กับ vinculin ซึ่งเป็นโปรตีนใน focal adhesion complex vinculin ย้อมด้วยสี fluorescence ให้เป็นสีแดง จากรูปที่ 15 และ 16 จะเห็นว่า vinculin อยู่เป็นจุดๆ บนผิวเมมเบรน ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งของ Focal adhesion จากผลการทดลอง ไม่พบความแตกต่างของการ localize ของ vinculin ระหว่างเซลล์ที่ treat ด้วย PD98059 และเซลล์กลุ่ม control ส่วน paxillin และ FAK แสดงด้วยสีเขียว จากรูปที่ 15 และ 16 พบว่า paxillin และ FAK colocalize อยู่กับ vinculin เป็นจุดๆ บนเมมเบรน ซึ่งแสดงเป็นสีเหลืองในภาพ Merge ซึ่งเป็นการซ้อนทับระหว่างภาพสีแดงและเขียว อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของเซลล์ที่ treat และ ไม่ treat ด้วย PD98059



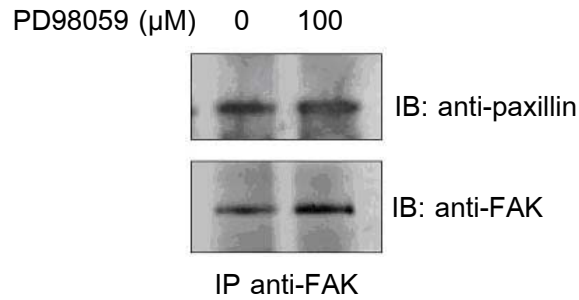
รูปที่ 11 ผลของ PD98059 ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ myosin regulatory light chain (MRLC) incubate เซลล์กับยา (PD98059 หรือ ML-7) เป็นเวลา 1 และ 6 ชม. Lyse เซลล์ แล้วนำ cell lysate มาทำ western blotting ด้วย antibody ต่อ MRLC และ phospho-MRLC.



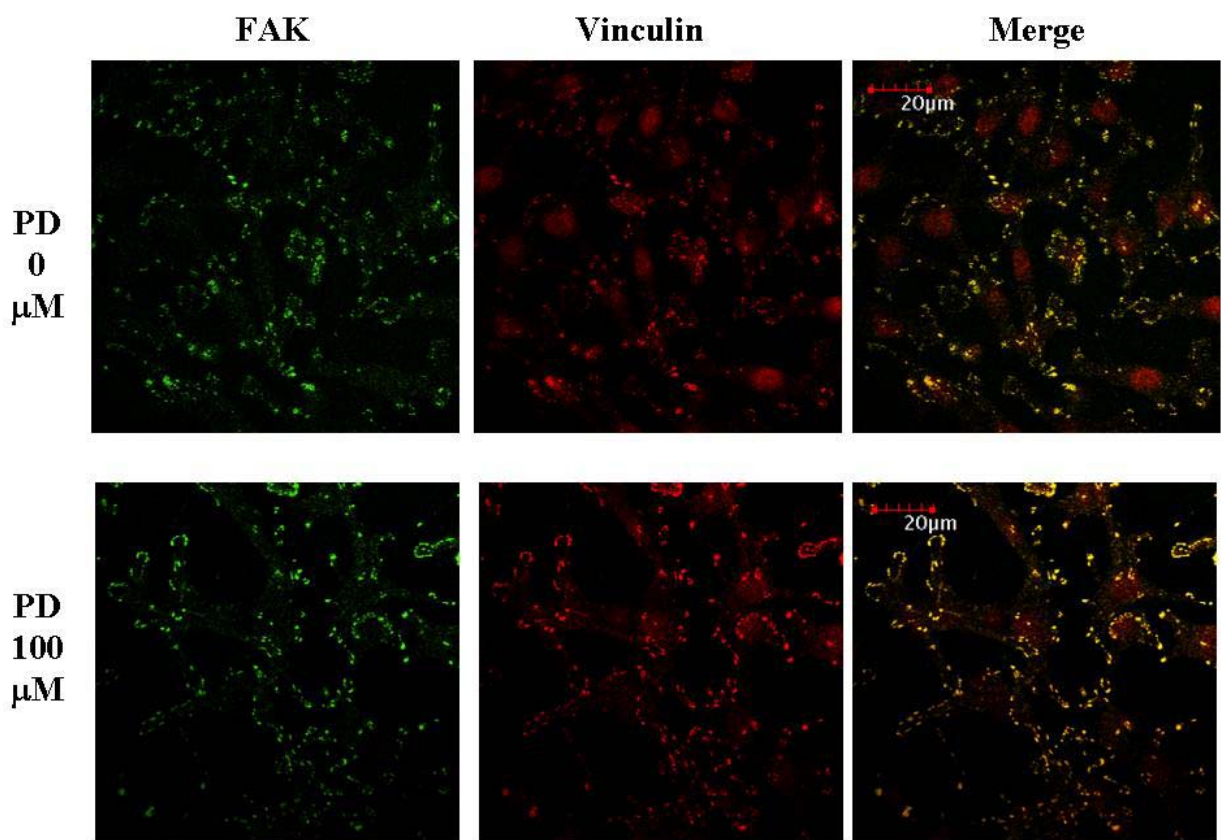
รูปที่ 12 ผลของ PD98059 ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ focal adhesion kinase (FAK) (ก) incubate เซลล์กับยา (PD98059) เป็นเวลา 6 ชม. Lyse เซลล์ แล้วนำเซลล์ lysate มาทำ western blotting ด้วย antibody ต่อ FAK และ phospho-FAK (Ser910). (ข) incubate เซลล์กับยา 100 μM PD98059 ที่เวลาต่างๆ (สำหรับ control (C) ใช้ DMSO แทนยา) นำ cell lysate มาทำ western blot ดังรูป (ก)



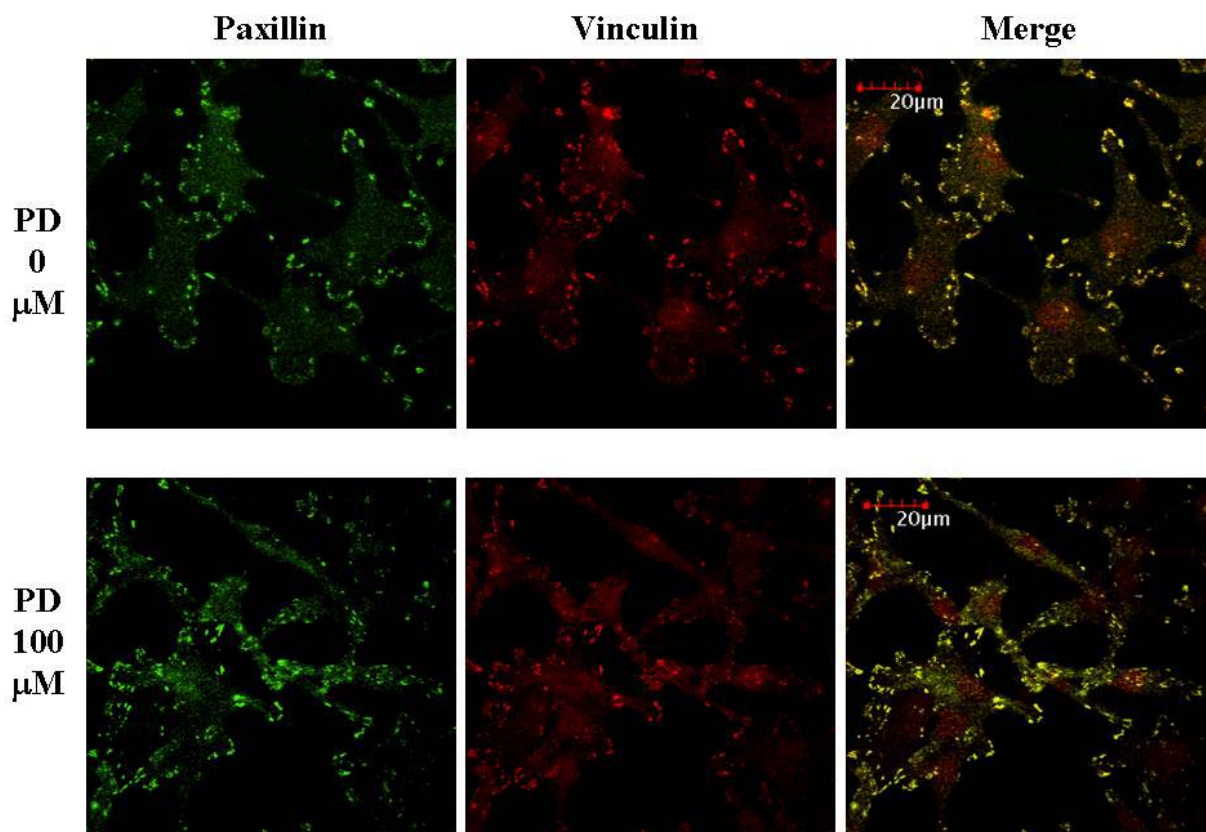
รูปที่ 13 ผลของ PD98059 ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ Paxillin Incubate เซลล์กับยา (PD98059) เป็นเวลา 6 ชม. Lyse เซลล์ แล้วนำ cell lysate มาทำ western blotting ด้วย antibody ต่อ Paxillin และ phospho-paxillin (Ser83).



รูปที่ 14 ผลของ PD98059 ต่อการจับกันระหว่าง paxillin และ FAK โดย immunoprecipitation Incubate เซลล์ใน media ที่มีและไม่มี PD98059 6 ชม. Lyse เซลล์ และ immunoprecipitate ด้วย anti-FAK และ western blot ด้วย anti-paxillin และ anti-FAK



รูปที่ 15 ผลของ PD98059 ต่อ focal adhesion (localization ของ vinculin) และ FAK โดย immunofluorescence culture เซลล์บน coverslip fix เซลล์ และย้อมด้วย antibody ต่อ vinculin และ FAK ตามด้วย secondary antibodies ที่ติดสี fluorescence ที่ต่างกัน คือ fluorescence ที่ให้สีแดง (vinculin) และ สีเขียว (FAK) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ confocal ที่ objective lens กำลังขยาย 40X ส่วน จุดสีเหลืองเป็นการซ้อนกันระหว่างภาพสีเขียวและแดง



รูปที่ 16 ผลของ PD98059 ต่อ focal adhesion (localization ของ vinculin) และ paxillin โดย immunofluorescence culture เซลล์บน coverslip fix เซลล์ และย้อมด้วย antibody ต่อ vinculin และ paxillin ตามด้วย secondary antibodies ที่ติดสี fluorescence ที่ต่างกัน คือ fluorescence ที่ให้สีแดง (vinculin) และ สีเขียว (paxillin) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ confocal ที่ objective lens กำลังขยาย 40X ส่วนจุดสีเหลืองเป็นการซ้อนกันระหว่างภาพสีเขียวและแดง

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

PI3 kinase และ MAP kinase signaling pathway นับเป็นสัญญาณ ที่มีบทบาทสำคัญทางชีววิทยา หลากหลายอย่าง รวมทั้ง การแบ่งเซลล์ การดำรงชีวิต การเคลื่อนที่ และ การบุกรุกของเซลล์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้ เป็นคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของสัญญาณในวิถีทั้งสองนี้ในมะเร็ง หลายชนิด และมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและการแพร่กระจายของมะเร็ง [12] โดยเซลล์มะเร็งมีการ เพิ่มสัญญาณทั้งสองนี้ด้วยวิธีการต่างๆ ดังเช่น สำหรับ PI3 kinase pathway มะเร็งหลายชนิดจะพบการ overexpress โปรตีนที่เป็น catalytic subunit ของ PI3 kinase (p110 α , PIK3CA) [13] โปรตีนที่เป็น downstream effector ของ PI3 kinase เช่น Akt หรือ การลดลงของโปรตีนที่ทำหน้าที่ปิดสัญญาณ PI3 kinase เช่น PTEN (phosphatase ที่ดึงหมู่ฟอสเฟตออกจาก PIP₃) [14] สำหรับ MAP kinase pathway มะเร็งหลายชนิดมีการเพิ่ม หรือ กลายพันธุ์ของ upstream regulator ของ MAP kinase เช่น Ras หรือ การเพิ่มของ MAP kinase เอง [15, 16] ในโครงการนี้เราจึงได้ศึกษาบทบาทของวิถีทั้งสองนี้ในการบุกรุก ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูที่มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงโดยศึกษาผลกระทบของสารยับยั้ง โปรตีนทั้งสองนี้

บทบาทของ PI3 kinase ในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูชนิดแพร่กระจายสูง

การยับยั้ง PI3 kinase โดยการ treat เซลล์ด้วย PI3 kinase inhibitor ที่จำเพาะ (LY294002) มีผล ยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ อย่างเป็นไปตามขนาดของยาที่เพิ่มขึ้น โดยมี IC₅₀ (ความเข้มข้นของยาที่มีฤทธิ์ ยับยั้งการบุกรุกครึ่งหนึ่ง) ประมาณ 40 μ M ซึ่งรูปแบบและ IC₅₀ ในการยับยั้งการบุกรุก มีความ สอดคล้องกับการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (รูปที่ 2) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ว่า PI3 kinase inhibitor ยับยั้งการเคลื่อนที่และการบุกรุกของเซลล์มะเร็งหลายชนิด และจากการศึกษารูปร่าง และการจัดเรียงตัวของสาย actin พบว่า เซลล์ที่ถูก treat ด้วย LY294002 มีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นรูป กระสวย และมีการจัดเรียงตัวของ actin ในลักษณะ filopodia ที่ลดลงด้วย การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ อาจเกิดเนื่องจาก LY294002 ไปการยับยั้งการเกิด filopodia และ/หรือ ไปยับยั้งการสลายการเกาะติดที่ ด้านท้ายของเซลล์ทำให้เซลล์ยืดยาวขึ้นเป็นรูปกระสวยก็เป็นได้

การย่อยสลาย extracellular matrix เป็นคุณสมบัติอีกประการหนึ่งที่สำคัญต่อความสามารถในการ บุกรุกของเซลล์ เซลล์มะเร็งมักมีการสร้างและหลั่งเอ็นไซม์ที่มาย่อย extracellular matrix และ basement membrane เพิ่มขึ้น และปริมาณเอ็นไซม์เหล่านี้ยังมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอีกด้วย [2] เอ็นไซม์ที่ย่อย extracellular matrix ที่พบใน MLL cell คือ MMP-2 และ uPA และปริมาณของเอ็นไซม์ ทั้งสองนี้ยังเพิ่มขึ้นใน MLL cell ซึ่งมีความสามารถในการแพร่กระจายสูง เมื่อเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดของ มันทึมีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำ (AT-01) [17] ดังนั้นปริมาณเอ็นไซม์ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นสาเหตุ หนึ่งที่ทำให้เซลล์ MLL มีความสามารถในการแพร่กระจายสูงกว่าเซลล์ฟอ-แม่มของมัน (AT-01) จาก การศึกษาบทบาทของ PI3 kinase ต่อการหลั่งของเอ็นไซม์ทั้งสองนี้ทั้งในระดับเอ็นไซม์แอกติวิตี และ mRNA โดยใช้สารยับยั้ง PI3 kinase พบว่า การยับยั้ง PI3 kinase ด้วย LY294002 มีผลลดปริมาณ uPA ทั้งที่หลั่งออกสู่ conditioned medium และ บนผิวเซลล์ โดยการลดลงนี้น่าจะเกิดเนื่องจากการยับยั้งการ แสดงออกของ uPA ในระดับ mRNA เนื่องจาก LY294002 มีผลลดปริมาณ uPA mRNA สอดคล้องกับผล

ของ plasminogen-gelatin zymogram อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่า LY294002 มีผลต่อ MMP-2 ทั้งในระดับ เอ็นไซม์ และ ระดับ mRNA

โดยสรุป PI3 kinase มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการบุกรุกของเซลล์ PI3 kinase inhibitor ยับยั้งการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูโดยการไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ และการยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ uPA แต่ไม่มีผลต่อการสร้างและหลั่ง MMP-2

บทบาทของ MAP kinase ในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากหนูชนิดแพร่กระจายสูง

ในโครงการก่อนหน้านี้เราได้แสดงว่า MAP kinase มีความสำคัญต่อกระบวนการบุกรุกของ cell line หลากหลาย sublines ในตระกูล Dunning rat prostatic cancer และระดับ MAP kinase ที่ active (phospho-MAP kinase) มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับ ความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์ [18] โดยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในตระกูล Dunning ที่ความสามารถในการแพร่กระจายต่ำดังเช่น AT-01 MLL ที่มีระดับ active MAP kinase สูง มีความสามารถในการแพร่กระจายสูง และมีคุณสมบัติต่างๆของเซลล์ที่แพร่กระจายได้ดี ได้แก่ มีการเพิ่มขึ้นของการเคลื่อนที่ การเกาะติดกับ extracellular matrix และระดับ เอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อย extracellular matrix (MMP-2 และ uPA) [17, 19] ซึ่งสนับสนุนว่า ระดับของ active MAP kinase ที่มีมากใน MLL อาจเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ MLL มีพัฒนาการจนมีความสามารถในการแพร่กระจายสูง นอกจากนี้เรายังได้แสดงว่า MEK1 inhibitor PD98059 ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ MLL โดยมี IC₅₀ และรูปลักษณะของกราฟระหว่างขนาดของยาต่อการยับยั้งที่ใกล้เคียงกับการยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ โดย inhibitor นี้ไม่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ การเกาะติด และปริมาณการหลั่ง MMP (gelatinase) และ uPA ฉะนั้นจึงชี้ว่า การยับยั้งการกระตุ้น MAP kinase ด้วย PD98059 ยับยั้งการบุกรุกของเซลล์ โดยไปมีผลหลักต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ ในโครงการนี้เราจึงได้ศึกษาถึงกลไกไปถึงผลของ PD98059 ต่อโปรตีนต่างๆที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยเฉพาะโปรตีนที่เคยมีรายงานว่าถูกควบคุมโดย MAP kinase

ในเซลล์ cos-7 และ MCF-7 มีรายงานว่า MEK1 กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ MLCK ซึ่งจะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้และกระตุ้น MRLC จึงทำให้เซลล์หดตัวและเคลื่อนที่ [5, 20] นอกจากนี้ MLCK ยังมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ MLL จึงเป็นไปได้ว่า MLCK อาจจะเป็นตัวจักรสำคัญในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ MLL โดย MAP kinase อย่างไรก็ดีตาม ผลการทดลองกลับแสดงว่า PD98059 ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับ phospho-MRLC ของ MLL แต่อย่างไร แม้ความเข้มข้นที่ใช้จะสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้เกือบสมบูรณ์ เราจึงได้ทำการทดสอบในโปรตีนอื่นที่ควบคุมการเคลื่อน และ มีรายงานว่าเปปไทด์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดย) MAP kinase ได้แก่ FAK และ paxillin [21] และพบว่า การยับยั้งการกระตุ้น MAP kinase ไม่มีผลต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ FAK ที่เวลาต่างๆเลย แต่มีผลลดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับตำแหน่ง Ser83 ของ paxillin ในเซลล์ HEK293 การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ paxillin โดย MAP kinase จะส่งเสริมการจับกันระหว่าง paxillin กับ FAK ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเกิดและสลาย focal adhesion ซึ่งสำคัญในการเคลื่อนที่ [22, 23] อย่างไรก็ดีตาม เราพบว่า PD98059 ไม่มีผลต่อการจับกันระหว่าง FAK และ paxillin (แสดงโดย immunoprecipitation) และไม่มีผลต่อ Focal adhesion ซึ่งดูจาก colocalization ของ vinculin (โปรตีนที่พบใน Focal adhesion

complex) กับ FAK หรือ paxillin โดย immunofluorescence แต่อย่างไรก็ตาม การยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ paxillin โดย MAP kinase inhibitor อาจมีกลไกอื่นในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์

MAP kinase และ PI3 kinase signaling pathway เป็นสัญญาณที่มีความสำคัญในการบุกรุกของเซลล์มะเร็งชนิดแพร่กระจาย โดยทั้งสองสัญญาณจะไปมีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เป็นหลัก สำหรับ PI3 kinase ยังมีผลต่อการสร้าง uPA ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อย extracellular matrix อีกด้วย นอกจากนี้การยับยั้ง PI3 kinase ด้วย LY294002 ยังมีผลยับยั้งการกระตุ้น MAP kinase ในช่วงเวลาหนึ่ง อย่างไรก็ตามการทดลองไม่ได้ยืนยันว่า LY294002 การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยไปยับยั้งการกระตุ้น MAP kinase การที่ทั้ง MAP kinase และ PI3 kinase มีความสำคัญต่อการบุกรุกของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิดแพร่กระจายสูง โปรตีนทั้งสองนี้จึงน่าจะเป็นจุดเป้าหมายของยาที่ใช้ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้

หนังสืออ้างอิง

1. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51 (18 Suppl): 5054s-59s.
2. Crowe DL, Shuler CF. Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix. *Histol Histopathol* 1999; 14 (2): 665-71.
3. Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH. The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis* 1999; 3 (1): 15-32.
4. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12 (5): 613-20.
5. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 1997; 137 (2): 481-92.
6. Ishibe S, Joly D, Liu ZX, et al. Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 2004; 16 (2): 257-67.
7. Lee KH, Hyun MS, Kim JR. Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction in uPA synthesis. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20 (6): 499-505.
8. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003; 4 (4): 257-62.
9. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 1995; 64 (4): 280-5.
10. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 2004; 3 (10): 1221-4.

11. Qi HL, Zhang Y, Ma J, et al. Insulin/protein kinase B signalling pathway upregulates metastasis-related phenotypes and molecules in H7721 human hepatocarcinoma cell line. *Eur J Biochem* 2003; 270 (18): 3795-805.
12. Mawrin C, Sasse T, Kirches E, et al. Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (11): 4074-82.
13. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7 (6): 561-73.
14. Tang JM, He QY, Guo RX, et al. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 2006; 51 (2): 181-91.
15. Liang B, Wang S, Zhu XG, et al. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulating signal in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (5): 623-8.
16. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, et al. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8 (6): 1747-53.
17. Quax PH, de Bart AC, Schalken JA, et al. Plasminogen activator and matrix metalloproteinase production and extracellular matrix degradation by rat prostate cancer cells in vitro: correlation with metastatic behavior in vivo. *Prostate* 1997; 32 (3): 196-204.
18. Suthiphongchai T, Promyart P, Virochut S, et al. Involvement of ERK1/2 in invasiveness and metastatic development of rat prostatic adenocarcinoma. *Oncol Res* 2003; 13 (5): 253-9.
19. Cooper CR, Donald C, Emmett N, et al. Adhesion and invasion potential of rat prostatic cancer cells: correlation with metastatic potential. *Invasion Metastasis* 1993; 13 (4): 178-84.
20. Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, et al. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 1999; 146 (1): 149-64.
21. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 2004; 117 (Pt 20): 4619-28.
22. Liu ZX, Yu CF, Nickel C, et al. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* 2002; 277 (12): 10452-8.
23. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, et al. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 2004; 6 (2): 154-61.

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1 . ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- Suthiphongchai T, Phimsen S, Sakulkhu U and Tohtong R (2006) PD98059-Inhibited Invasion of Dunning Rat Prostate Cancer Cell Involves Suppression of Motility but not MMP-2 nor uPA Secretion. Oncology report 15(6):1605-10
- Suthiphongchai T,Virojrat S Role of PI3 Kinase in Invasiveness of High Metastatic Rat Prostatic Adenocarcinoma Cell Line, MLL (in preparation)

2. ผลงานอื่นๆ

2.1. เสนอผลงาน

- Suthiphongchai T, Promyart P, Tohtong R and Wilairat P. Effect of MEK1 inhibitor on Suppression of Invasiveness of High Metastatic Rat Prostatic Adenocarcinoma, MLL. in HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX World Congress, Montreal, Canada, October 8-11, 2003
- Phimsen S, Promyart P, and Suthiphongchai T. Effect of PD98059 (MEK1 Inhibitor) on Invasiveness of Rat Prostate Cancer Cells in The 17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference on “Genomics and Health in the 21th Century”, Bangkok, Thailand, November 22-26, 2004
- Phimsen S and Suthiphongchai T. Effect of PD98059 (MEK1 Inhibitor) on Invasiveness of Rat Prostate Cancer Cells in The 8th National Cancer Conference on “Empowering Cancer Control for Healthy Thailand” Bangkok, Thailand, September 7-9, 2005

2.2. พัฒนานักศึกษาปริญญาโท 2 คน

PD98059-inhibited invasion of Dunning rat prostate cancer cells involves suppression of motility but not MMP-2 or uPA secretion

TUANGPORN SUTHIPHONGCHAI, SUCHADA PHIMSEN, USAWADEE SAKULKOO and RUTAIWAN TOHTONG

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Abstract. Up-regulation of extracellular-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) has been implicated in tumor progression and metastasis in many types of cancer. We have previously shown that ERK1/2 is necessary for invasiveness of Dunning rat prostatic adenocarcinoma cell lines in which levels of activated ERK1/2 correlate with the metastatic potential. Here, we further examined the biological effects of elevated ERK1/2 in the highly metastatic Dunning cell line, MLL, in which the abilities to invade and metastasize are enhanced relative to its progenitor strain. Inhibition of ERK1/2 activation by the MEK1 inhibitor, PD98059, dose-dependently reduced MLL cell invasiveness and motility with similar IC_{50} values. On the other hand, the abilities of MLL cells to adhere to the extracellular matrix, phosphorylate myosin regulatory light chain and secrete matrix-degrading enzymes, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and urokinase plasminogen activator (uPA) were marginally, if at all, affected by PD98059 treatment. These data indicated that the inhibitory effect of PD98059 on the invasiveness of MLL cells was primarily due to the suppression of cell motility, and the up-regulation of ERK1/2 is, at least in part, responsible for the enhanced cellular motility and invasiveness of the MLL cells.

Introduction

Metastasis, the spreading of malignant cells from the primary site to form a tumor mass at distant organs of the body, is the major cause of death in cancer patients. One of the critical characteristics of a metastatic cell is invasion, the ability to penetrate and invade the extracellular matrix and surrounding tissue. Invasion is a multistep process, requiring the coordination of various events, including alteration of cell

adhesion, promotion of cell migration, and degradation of the extracellular matrix barrier (1). Specifically, metastatic cells adhere to the basement membrane, secrete matrix-degrading enzymes [viz. matrix metalloproteinases (MMPs) and urokinase plasminogen activator (uPA)] to degrade the extracellular matrix barrier, and migrate from its original site. Many of these processes are regulated by various signaling pathways, one of the best characterized being the Ras/MEK/ERK signaling pathway.

ERK1/2 is a mediator that can be activated by a phosphorylation cascade caused by a variety of growth factors, cytokines and adhesion molecules such as integrins. Up-regulation of the MEK/ERK pathway has been found in many types of cancer, including breast, prostate, colon, and kidney cancer (2), and is correlated with tumor progression and metastasis (3,4). Apart from proliferation, ERK1/2 has been associated with diverse biological processes involved in acquisition of the invasive phenotype, such as cell motility and extracellular matrix degradation. Inhibition of the ERK pathway by the MEK1 inhibitor, dominant negative MEK or antisense ERK inhibits cell migration in a variety of cell types, such as COS-7 (5) and MCF-7 cells (6). In addition, ERK1/2 is involved in the regulation of matrix-degrading enzymes, such as MMPs and uPA. A MEK inhibitor, U0126, suppresses uPA expression as well as MMP-9 and MMP-2 secretion in an ovarian cancer cell, OVCA 433 (7).

The Dunning sublines are a family of rat prostatic adenocarcinoma cell lines developed from the same parental origin, a Dunning tumor. Their invasion, migration, adhesion and matrix-degrading enzyme production correlate with their metastatic ability (8,9). Previous studies from our laboratory on these cell lines showed that inhibition of ERK1/2 activation suppresses their invasive ability, and the level of activated ERK1/2 also correlates with their metastatic potential (10). Here, we further explored how ERK1/2 regulates the cell invasiveness of MLL, a highly metastatic Dunning cell line, and whether the enhancement of those metastatic factors results from an increase in ERK activation. The role of ERK1/2 in cell invasiveness was investigated by determining the effects of a MEK1 inhibitor, PD98059, on features critical for the invasiveness acquired by MLL cells. We show that PD98059 inhibited cell motility at a level similar to its inhibition of cell invasiveness, whereas its effects on adhesion and matrix-degrading enzyme activities were minimal, implying that PD98059 primarily inhibited cell invasion by suppressing cell motility.

Correspondence to: Dr Tuangporn Suthiphongchai, Department of Biochemistry, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand
E-mail: sctsc@mahidol.ac.th

Key words: extracellular-regulated kinases, invasion, metastasis, matrix metalloproteinase-2, motility, PD98059, urokinase plasminogen activator

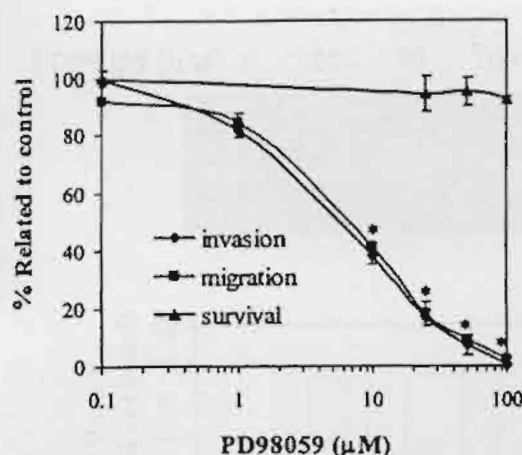


Figure 1. Effects of MEK1 inhibitor on *in vitro* invasion, motility and cell survival of MLL cells. MLL cells were resuspended in media containing indicated concentrations of PD98059 and plated on the upper compartment of a Matrigel-coated (for invasion assay) and non-coated (for motility assay) Transwell chamber. Cells treated with the same vehicle were used as the control. After 6-h incubation, the number of invaded cells was counted. In cell proliferation assay, cells were plated on a 96-well microplate for 48 h, replenished with media containing PD98058, and incubated for 6 h. The viable cells were analyzed by MTT assay, and OD was measured at 540 nm. The results represent mean $\pm$ SEM obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. *Significant difference of $P < 0.05$.

Materials and methods

Cell lines and culture condition. The highly metastatic Dunning rat prostatic adenocarcinoma cell line, MLL, was kindly provided by Dr Kenneth Pienta (University of Michigan, Ann Arbor, MI). In animal models, the MLL cells exhibited high metastatic ability to the lymph node and lung. (11). The cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and 1X antibiotic-antimycotic liquid (Life Technologies Inc., Rockville, MD) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

***In vitro* invasion and migration assays.** Cell invasiveness was determined using Transwell chambers (Corning Costar Corp., Cambridge, MA). Transwell inserts (8.0 μm pore) were coated with 100 μl of 0.3 mg/ml of Matrigel (Becton-Dickinson, Bedford, MA) (12). Cell suspension (2×10^5 cells) in serum-free medium containing PD98059 (Cell Signaling Technology, Inc., MA) was added to the upper compartment of the Transwell chamber, and culture medium containing 10% FBS was added to the lower compartment. Control cells were treated with the same vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO). After incubation for 6 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, non-invaded cells on the upper surface of the membrane filter were removed using a cotton swab. Cells that traversed the Matrigel and membrane layer were fixed and stained with 0.5% crystal violet. The number of invaded cells in five random ($\times 10$) microscopic fields was counted and expressed as the average number of invaded cells/field. Migration assays were also performed using Transwell chambers in a similar fashion to the invasion assay, but with no Matrigel coating on the upper Transwell compartment.

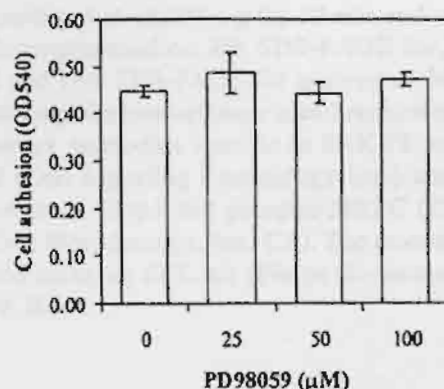


Figure 2. Effect of MEK1 inhibitor on adhesion of MLL cells to Matrigel. MLL cells were resuspended in media containing PD98059 and plated on a Matrigel-coated 96-well microplate. After 1-h incubation, the adherent cells were analyzed by MTT assay, and OD was measured at 540 nm. The results represent mean $\pm$ SEM obtained from three separate experiments, each performed in triplicate.

Cell survival assay. Cells were plated onto 96-well plates for 48 h to allow attachment and then treated with medium containing PD98059 for 6 h in the same conditions as those of the invasion assay. After incubation, viable cells were analyzed by MTT assay (13). In brief, 50 μg of MTT (USB Corp., Cleveland, OH) was added to the cell culture. After 3-h incubation, the solution was aspirated. MTT was converted into water-insoluble formazan in live cells and then dissolved by the addition of 200 μl of DMSO. The absorbance was measured at 540 nm.

Adhesion assay. Adhesion was determined as previously described (14). In brief, a 96-well plate was coated with 0.3 mg/ml of Matrigel followed by incubation with 3% BSA for 2 h. Prior to the addition of cells, wells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Cells (5×10^3) in medium containing 10% FBS with various concentrations of PD98059 were added. After 1-h incubation at 37°C, non-adhering cells were removed and the wells were gently washed twice with PBS. Living cells adhering to Matrigel were quantitated by MTT assay as described above.

The reported values of invasion, migration survival and adhesion assay are the means $\pm$ SEM of results obtained from three independent experiments, each conducted in duplicate. Statistical significance, as determined using the t-test, was set at P -value < 0.05 .

Gelatinase and plasminogen activator assay by zymography. Gelatinase activity of MMP-2 and MMP-9 secreted in the conditioned medium was analyzed in SDS-gelatin gel under non-reducing conditions as described previously (14). Briefly, 20% of total concentrated conditioned medium was mixed with non-reducing SDS sample buffer and electrophoresed in a 7.5% SDS-PAGE containing 1 mg/ml of gelatin (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). After electrophoresis, the gel was washed twice with 2.5% Triton X-100 and incubated in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer containing 10 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl₂ and 1% Triton X-100 for 16-18 h at 37°C, before staining with 0.5% Coomassie blue. After destaining, the gelatinolytic activity, appearing as a clear band on a blue

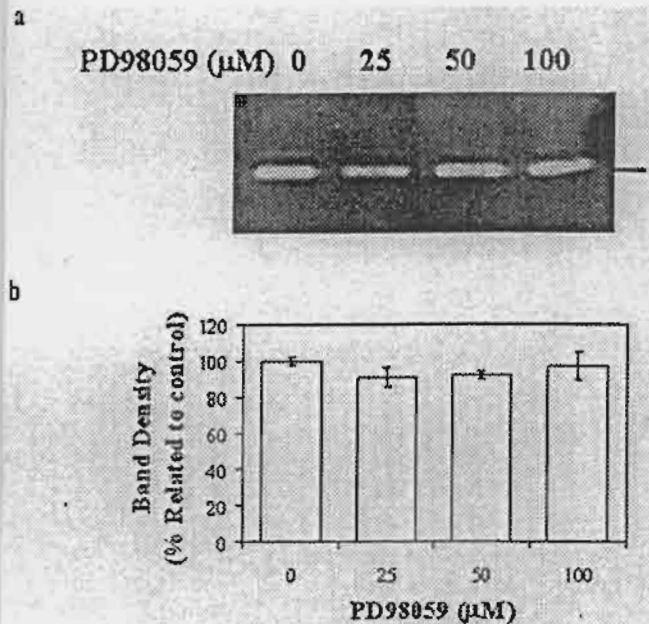


Figure 3. Gelatin zymography showing the effect of MEK1 inhibitor on the amount of MMP-2 secreted in conditioned medium of MLL cells. Cells were treated with PD98059 in serum-free media for 6 h and then 20% of the total concentrated conditioned medium was analyzed by gelatin zymography (a). The clear band at approximately 72 kDa represents the gelatinase activity of MMP-2. The relative band densities (b) were quantitated using a gel densitometer, and the data represent the mean $\pm$ SEM of band density as a percentage related to the control from three separate experiments.

background, was quantitated using a Bio-Rad GS700 gel scanner.

uPA activity in conditioned medium and bound uPA eluted from the cell surface were analyzed using SDS-plasminogen-gelatin gel under non-reducing conditions as described by Evans *et al* (15). The conditioned medium was concentrated 100 times, and the total amounts were used for analysis. The concentrated conditioned media and bound uPA were electrophoresed in a 10% SDS-PAGE containing 1 mg/ml gelatin and 10 μ g/ml plasminogen (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). After electrophoresis, the gel was washed twice with 2.5% Triton X-100 and incubated in reaction buffer containing 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.15 M NaCl, and 1% Triton X-100 for 16-18 h at 37°C, and then stained with Coomassie blue dye followed by a destaining step. The clear band at the molecular weight of approximately 40 kDa represented urokinase plasminogen activator. Plasminogen-free gel was used as a negative control to confirm that the activity in plasminogen gelatin gel required the presence of plasminogen.

Quantification of total and phosphorylated forms of ERK1/2 and myosin regulatory light chain (MRLC). The levels of total and phosphorylated forms of ERK1/2 and MRLC were analyzed by immunoblotting using antibodies specific to total and phosphorylated forms of ERK1/2 and MRLC, respectively. Cells treated with various conditions were lysed with lysis buffer containing 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 1X protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH), 2 mM sodium orthovanadate, 40 mM β -glycerophosphate and 50 mM sodium fluoride. The lysates

were centrifuged at 12,000 $\times$ g for 10 min and then proteins were electrophoresed on 8% SDS-PAGE for analysis of ERK1/2 and 15% SDS-PAGE for analysis of MRLC. After electroblotting, the nitrocellulose membranes were incubated with primary antibodies specific to ERK1/2 and phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology Inc.) and to MRLC (Sigma-Aldrich Corp.) and phospho-MRLC (Thr18/Ser19) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA). The protein bands were visualized using an ECL kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL).

Results

Effects of PD98059 on *in vitro* invasion, migration and survival of MLL cell lines. We have previously shown that ERK1/2 is essential for the invasiveness of Dunning cells (10). Here, we further investigated how ERK1/2 regulates cell invasion by studying the effects of a MEK1 inhibitor, PD98059, on cell migration and adhesion, which are crucial events that occur during cell invasion. MLL cell invasiveness and migration were assayed using the *in vitro* Transwell method. Fig. 1 shows that treatment with PD98059 resulted in a dose-dependent reduction of cell migration with an inhibition profile similar to that of cell invasiveness. Moreover, the IC_{50} values of cell migration (8.9 ± 1.3 μ M) and invasiveness (7.7 ± 1.0 μ M) were not significantly different. Both cell invasiveness and motility were almost completely inhibited by 100 μ M PD98059.

To ensure that the migration inhibitory effect was not the result of PD98059 toxicity, the effect of the drug on cell survival was determined using the same conditions for the migration assay. Fig. 1 shows that 0-50 μ M PD98059 did not have a significant effect on cell survival. At 100 μ M where migration and invasion were almost completely blocked, cell survival was inhibited by <10%.

Effect of PD98059 on adhesion of MLL cells to extracellular matrix. Given that MLL cells acquire great ability to adhere to the ECM component compared to their parental, low metastatic cells, and adhesion to ECM is a critical requirement for cell migration, we determined whether ERK activation was important for cell adhesion. Cells were treated with various concentrations of PD98059 and then allowed to adhere to Matrigel for 1 h. Surprisingly, PD98059 treatment had no effect on MLL cell adhesion to the artificial extracellular matrix, Matrigel, at doses where migration and invasion of MLL cells were drastically inhibited (Fig. 2).

Effects of PD98059 on levels of secreted MMP and uPA. Besides migration and adhesion, extracellular matrix degradation is another key factor required for cell invasiveness. Many types of cancer cells secrete a large amount of matrix-degrading enzymes. The MLL cells overexpress MMP-2 and uPA, correlating with its enhanced metastatic ability (9). We determined the levels of MMP-2 and uPA secreted in the conditioned medium and uPA bound on the cell surface using gelatin (for MMP-2) and plasminogen-gelatin zymography (for uPA). Although PD98059 slightly reduced secreted MMP-2 levels in some experiments (Fig. 3), this inhibitory effect was neither dose-dependent nor statistically significant.

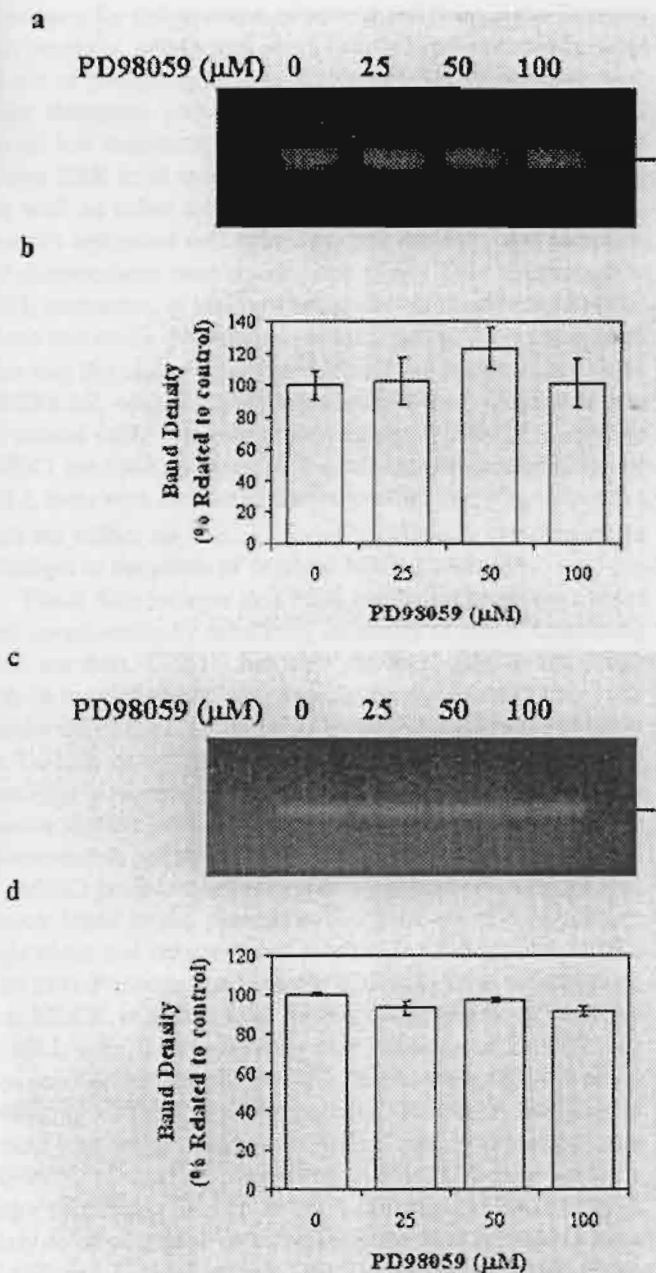


Figure 4 Plasminogen-gelatin zymography showing the effects of MEK1 inhibitor on the amount of soluble uPA secreted in the conditioned medium (a and b) and cell surface-bound uPA (c and d). Cells were treated with PD98059 in serum-free media for 6 h. Then, the total concentrated conditioned media containing soluble uPA (a) and glycine-eluted cell surface-bound uPA (c) were analyzed by plasminogen-gelatin zymography. The clear band represents the plasminogen activator activity of uPA. The relative band densities of the soluble (b) and bound uPA (d) were quantitated using a gel densitometer. The data represent the mean $\pm$ SEM of band density as a percentage related to the control from three independent experiments.

Fig. 4 shows that both soluble and bound uPA were marginally, if at all, affected by PD98059.

To show that the lack of change in MMP-2 and uPA activities was not due to the inability of PD98059 to execute inhibitory effects, we showed that phospho-ERK1/2 was drastically reduced in a dose-dependent manner (Fig. 5A). Furthermore, ERK1/2 phosphorylation was suppressed after the first 15 min of treatment with PD98059 and continued to be suppressed throughout the assay period (6 h) (Fig. 5B).

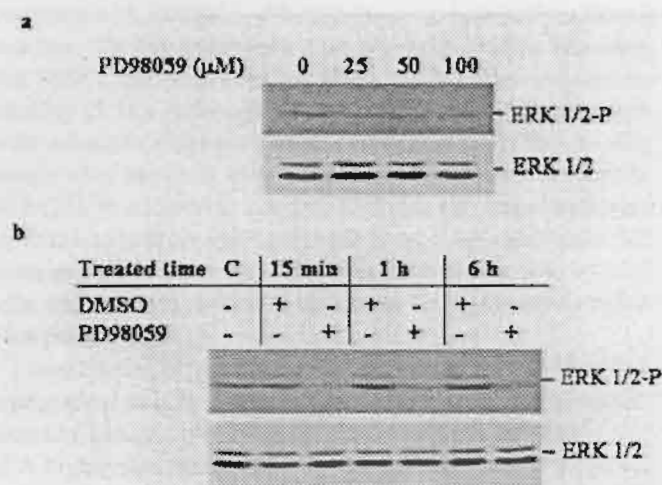


Figure 5. Effect of PD98059 on ERK phosphorylation. (a) Cells were treated with PD98059 in serum-free medium for 6 h and then cell lysates were analyzed for total and phospho-ERK1/2 by immunoblotting with anti-ERK1/2 and phospho-ERK1/2. (b). Cells were treated under the same conditions and harvested and lysed at various time points before assaying for total and phospho-ERK1/2. The results are representative of three independent experiments.

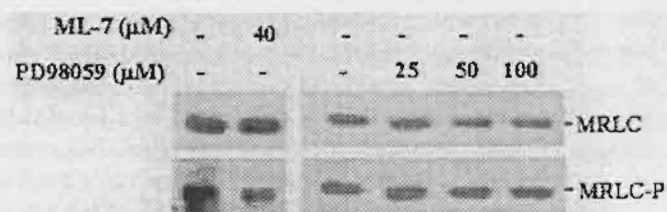


Figure 6. Effects of MEK1 inhibitor on levels of total and phospho-MRLC. Cells were treated with PD98059 or ML-7 for 6 h and then cell lysates were analyzed for total and phospho-MRLC by immunoblotting with antibodies specific to MRLC and phospho-MRLC. The results are representative of three independent experiments.

These results suggest that downstream effectors of phospho-ERK1/2 should have been affected under this assay condition.

Effect of PD98059 on myosin regulatory light chain phosphorylation. The data shown above indicated that ERK1/2 activation is critical for cell migration. To investigate if the regulation of cell migration by ERK1/2 occurs through phosphorylation of MRLC, we determined the levels of MRLC phosphorylation upon treatment with PD98059 by immunoblotting. Treatment with up to 100 μ M PD98059 had no significant effect on the levels of phospho-MRLC, although this concentration had earlier been shown to suppress *in vitro* invasion of MLL cells by >95% (Fig. 1). On the contrary, cells treated with ML-7, a MLCK inhibitor, showed an approximate 25% reduction of MRLC phosphorylation after normalizing with total MRLC (Fig. 6).

Discussion

There is a large amount of evidence demonstrating the role of ERK in invasiveness in many cancers, including prostate cancer (2). Our previous study showed that ERK1/2 is

necessary for cell invasion of several cell lines in the Dunning rat prostatic adenocarcinoma family, and the steady-state levels of phosphorylated or activated ERK1/2 correlate with their metastatic and invasive abilities (10). When compared to the low metastatic progenitor cells, MLL cells with a high active ERK level exhibit enhancement of metastatic potential as well as other key characteristics of metastatic cells, namely enhanced cell adhesion, cell motility, and secretion of extracellular matrix enzymes (8,9). This suggests that ERK activation, at least in part, underlies the development of these metastatic phenotypes in MLL cells. To investigate if this was the case, we inhibited MEK1, an upstream regulator of ERK1/2, with PD98059 and observed the biological effects of treated cells. The results showed that PD98059, a specific MEK1 inhibitor, suppressed the cell motility and invasion of MLL cells with similar inhibition profiles and IC_{50} values but had no effect on MRLC phosphorylation, attachment to Matrigel or the levels of secreted MMP-2 and uPA.

These data indicate that ERK activation promotes cancer cell invasiveness by enhancing its ability to move. Consistent with our data, ERK1/2 has been shown to play an important role in regulating cell migration in numerous cell types (16). Inhibition of the ERK pathway by MEK1 inhibitor, PD98059 or U0126, or by dominant negative ERK suppresses cell motility in diverse cell types in response to extracellular matrix components, growth factors and uPA (6,17), while constitutively active MEK1 promotes cell migration (5).

MEK1 promotes cell migration by phosphorylating MLCK, which leads to the phosphorylation of myosin regulatory light chain and enhanced cell motility in COS (5) and MCF-7 cells (18). Previous data from our laboratory have demonstrated that MLCK is also critical for the invasiveness and motility of MLL cells (14), suggesting that inhibition of ERK1/2 may also result in the reduction of MLCK phosphorylation, thereby inhibiting cell motility and invasion. However, our present results showed no change in MRLC phosphorylation after PD98059 treatment, suggesting that MLCK may not be a major substrate of ERK1/2 in MLL cells. Other ERK substrates likely to participate in cell migration are focal adhesion kinase (FAK), paxillin, and calpain (16). Phosphorylation of paxillin by ERK promotes paxillin-FAK association and FAK phosphorylation and activation, which regulates focal adhesion turnover and PI3K-Rac mediated lamellipodia protrusion (19-21). M-calpain is also phosphorylated and activated by ERK. This active M-calpain then degrades FAK and cytoskeletal proteins to promote focal adhesion disassembly (22). These proteins may also play roles in the ERK-induced motility of MLL cells.

Motile cells need to attach to the extracellular matrix in order to migrate. Thus, cell adhesion constitutes one of the critical properties required for cell migration. The fact that the highly metastatic motile MLL cell shows greater ability than its parental cell to attach to the extracellular matrix protein, fibronectin (8), and that the chemotherapeutic drug, pentosan, which alters cell-extracellular matrix interaction, inhibits cell motility and prolongs the survival of rats injected with MLL cells (23), confirm the association between the adhesion of cells to the extracellular matrix and motility of this cell line. However, our results showed that the number of cells attached to Matrigel within 1 h was not altered after

treatment with PD98059, although the drug drastically inhibited motility. This is consistent with previous studies reporting that MEK1 inhibition does not affect cell adhesion but inhibits motility (5,18). Although ERK has been shown to associate with adhesion molecules such as integrin (24), this usually occurs after the cells have been treated with an inhibitor for 48 h (25). In addition to integrin, ERK has also been implicated in focal adhesion molecules such as FAK and paxillin; however, these molecules are believed to play a role in focal adhesion turnover, which is important for cell motility rather than cell adhesion.

Breakdown of the extracellular matrix barrier is also a fundamental step for cancer invasion. To overcome this barrier, invasive cancer cells produce proteases such as MMPs and uPA to degrade this barrier. Up-regulation of these proteases is associated with tumor progression and metastasis in many cancers including prostate cancer (26,27). In MLL cells, two matrix-degrading enzymes, MMP-2 and uPA, have been shown to be overexpressed and important for extracellular matrix degradation (9), invasion and metastasis (15,28,29). The role of ERK1/2 in regulating MMP-2 expression varies. ERK1/2 induces MMP-2 expression in pancreatic (30) and prostate cancer cell lines (31) but plays no role in induction of MMP-2 in MCF10A (32) and MeWo melanoma cells (33) and even negatively regulates MMP-2 expression in the Lewis lung carcinoma cell line (34). ERK1/2 has also been shown to induce uPA expression in diverse cancer cells such as squamous cell carcinoma (35), ovarian cancer (7), and pancreatic cancer cell lines (30). However, ERK1/2 appears to have a minimal role in inducing MMP-2 and uPA activity in the MLL cells under our assay conditions. The lack of change in MMP-2 and uPA activities was not likely caused by the incapability of PD98059 to suppress ERK1/2 phosphorylation and subsequent expression of these genes, as we have shown that phospho-ERK1/2 was drastically reduced under this assay condition. Therefore, it may be extrapolated that the downstream effectors of ERK1/2 were suppressed. It is thus likely that the MMP-2 and uPA regulation of MLL cells is independent of the MEK1/ERK pathway. Supporting this argument is a report by Li *et al*, demonstrating that LPS-induced uPA expression involves the Ras/Raf1/NF- κ B pathway, independent of MEK1/ERK (36).

In summary, we have shown that the impairment of invasion of the MLL cell line by PD98059, an inhibitor of MEK1, was mainly attributed to the inhibition of cell motility rather than the suppression of cell adhesion or extracellular matrix degradation. These findings suggest that the up-regulation of active ERK acquired in the highly metastatic MLL cell line results in the enhancement of cell motility and invasion but not other phenomena associated with metastasis. Although ERK regulates MLL cell invasion and migration, this process is unlikely to involve MLCK. The mechanisms of ERK-induced migration in the MLL cell line remain to be elucidated and would help provide a better molecular understanding of the role of ERK1/2 in the development of metastasis.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Mahidol University, Thailand and the Thailand Research Fund. We thank Dr. K

Pienta for providing the MLL cell line and Professor P. Wilairat for the critical reading of this manuscript.

References

- Liotta LA and Stetler-Stevenson WG: Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51: 5054s-5059s, 1991.
- Reddy KB, Nabha SM and Atanaskova N: Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22: 395-403, 2003.
- Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF Jr and Weber MJ: Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 59: 279-284, 1999.
- Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH and Murphy LC: Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 8: 1747-1753, 2002.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P and Cheresch DA: Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137: 481-492, 1997.
- Nguyen DH, Hussaini IM and Gonias SL: Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility. *J Biol Chem* 273: 8502-8507, 1998.
- Ahmed N, Pansino F, Baker M, Rice G and Quinn M: Association between alphavbeta6 integrin expression, elevated p42/44 kDa MAPK, and plasminogen-dependent matrix degradation in ovarian cancer. *J Cell Biochem* 84: 675-686, 2002.
- Cooper CR, Donald C, Emmett N, Harris-Hooker S and Cooke DB III: Adhesion and invasion potential of rat prostatic cancer cells: correlation with metastatic potential. *Invasion Metastasis* 13: 178-184, 1993.
- Quax PH, de Bart AC, Schalken JA and Verheijen JH: Plasminogen activator and matrix metalloproteinase production and extracellular matrix degradation by rat prostate cancer cells *in vitro*: correlation with metastatic behavior *in vivo*. *Prostate* 32: 196-204, 1997.
- Suthiphongchai T, Promyart P, Virochut S, Tohtong R and Wilairat P: Involvement of ERK1/2 in invasiveness and metastatic development of rat prostatic adenocarcinoma. *Oncol Res* 13: 253-259, 2003.
- Isaacs JT, Isaacs WB, Feitz WF and Scheres J: Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. *Prostate* 9: 261-281, 1986.
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, *et al*: A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47: 3239-3245, 1987.
- Denizot F and Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277, 1986.
- Tohtong R, Phattarasakul K, Jiraviriyakul A and Suthiphongchai T: Dependence of metastatic cancer cell invasion on MLCK-catalyzed phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6: 212-216, 2003.
- Evans CP, Elfman F, Parangi S, Conn M, Cunha G and Shuman MA: Inhibition of prostate cancer neovascularization and growth by urokinase-plasminogen activator receptor blockade. *Cancer Res* 57: 3594-3599, 1997.
- Huang C, Jacobson K and Schaller MD: MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628, 2004.
- Cheresch DA, Leng J and Klemke RL: Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J Cell Biol* 146: 1107-1116, 1999.
- Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, *et al*: Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 146: 149-164, 1999.
- Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S and Cantley LG: Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* 277: 10452-10458, 2002.
- Ishibe S, Joly D, Liu ZX and Cantley LG: Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 16: 257-267, 2004.
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, *et al*: FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6: 154-161, 2004.
- Cuevas BD, Abell AN, Witowsky JA, *et al*: MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J* 22: 3346-3355, 2003.
- Pienta KJ, Murphy BC, Isaacs WB, Isaacs JT and Coffey DS: Effect of pentosan, a novel cancer chemotherapeutic agent, on prostate cancer cell growth and motility. *Prostate* 20: 233-241, 1992.
- Sawhney RS, Sharma B, Humphrey LE and Brattain MG: Integrin alpha2 and extracellular signal-regulated kinase are functionally linked in highly malignant autocrine transforming growth factor-alpha-driven colon cancer cells. *J Biol Chem* 278: 19861-19869, 2003.
- Woods D, Cherwinski H, Venetsanakos E, *et al*: Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21: 3192-3205, 2001.
- Bjorklund M and Koivunen E: Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1755: 37-69, 2005.
- Sidenius N and Blasi F: The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 22: 205-222, 2003.
- Lokeshwar BL: MMP inhibition in prostate cancer. *Ann NY Acad Sci* 878: 271-289, 1999.
- Rabbani SA and Gladu J: Urokinase receptor antibody can reduce tumor volume and detect the presence of occult tumor metastases *in vivo*. *Cancer Res* 62: 2390-2397, 2002.
- Lee KH, Hyun MS and Kim JR: Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction in uPA synthesis. *Clin Exp Metastasis* 20: 499-505, 2003.
- Vayalil PK and Katiyar SK: Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate* 59: 33-42, 2004.
- Kim ES, Kim MS and Moon A: TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol* 25: 1375-1382, 2004.
- Denkert C, Siegfert A, Leclerc A, Turzynski A and Hauptmann S: An inhibitor of stress-activated MAP-kinases reduces invasion and MMP-2 expression of malignant melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 19: 79-85, 2002.
- Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S and Brodt P: Dual regulation of MMP-2 expression by the type I insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem* 279: 19683-19690, 2004.
- Simon C, Juarez J, Nicolson GL and Boyd D: Effect of PD 098059, a specific inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, on urokinase expression and *in vitro* invasion. *Cancer Res* 56: 5369-5374, 1996.
- Li H, Ye X, Mahanivong C, Bian D, Chun J and Huang S: Signaling mechanisms responsible for lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator expression in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 280: 10564-10571, 2005.

26.19

Role of Integrin-linked Kinase in Angiogenesis Through the Regulation of HIF-1 α and VEGF Expression

C. Tan¹, S. Cruet-Hennequart², A. A. Troussard², P. Costello⁴, K. Sutton⁴, J. Sanghera⁴, and S. Dedhar^{1,2,3,4}

¹University of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada; ²B.C. Cancer Agency, Vancouver, B.C. Canada; ³Vancouver General Hospital, Vancouver, B.C. Canada; and ⁴Kinetek Pharmaceuticals, Vancouver, B.C. Canada.

Integrin-linked kinase (ILK), a cytoplasmic beta1 and beta3 integrin binding protein, regulates the phosphorylation of Protein Kinase B (PKB/Akt) on serine-473, and thereby, positively regulates the expression of genes critical for cell proliferation, survival, migration and invasion. Western blot of epithelial cells overexpressing ILK revealed an increase in PKB/Akt phosphorylation with a subsequent increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. This mitotic and chemotactic factor stimulates angiogenesis, an important hallmark of metastatic cancer. In order to determine whether ILK activity is required for VEGF expression by tumour cells, we examined the effects of ILK inhibitors in PC3 and DU145 prostate carcinoma cells. These cell lines have high ILK activity and constitutively express VEGF. Inhibition of ILK activity by transient expression of dominant negative ILK, or exposure to a small molecule ILK inhibitor, resulted in a profound downregulation of HIF-1 α expression. To investigate the effect of ILK activity in angiogenesis, we employed the sprouting assay and the Boyden Chamber migration assay. These experiments show that ILK activity is necessary in endothelial cell invasion and migration, as well as capillary sprouting. From these results, we propose a model whereby ILK activation upregulates the expression of HIF-1 α , and in turn, promote the expression of VEGF. The proximal endothelial cells are stimulated by VEGF, which then initiates the ILK-dependent processes involved in angiogenesis.

26.20

Effects of MEK1 Inhibitor on Suppression of Invasiveness of High Metastatic Rat Prostatic Adenocarcinoma Cell Line, MLL

T. Suthiphongchai, P. Promyart, R. Tohtong, and P. Wilairat

Mahidol University, Bangkok, Thailand

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) is one of the most important mediators in signal pathways in response to mitogenic factors. Besides proliferation, ERK1/2 has also been implicated in diverse biological activities including cell invasion. In this report, we investigated the role of ERK1 and 2 in invasiveness of metastatic cell using high metastatic Dunning rat prostatic adenocarcinoma cell line, MLL. Inhibition of MEK1, an upstream regulator of ERK1/2, with PD098059 resulted in a dose-dependent reduction in the in vitro invasiveness that related to the decrease in the level of phosphorylated or activated ERK1/2. This specific MEK1 inhibitor also suppressed the cell motility whereas the reduction in cell proliferation and MMP secretion were minimal. However, the IC50 value for motility was about two times higher than that for invasiveness. In conclusion, these results suggested that ERK1/2 is necessary for cell invasiveness. Suppression of invasiveness upon treatment with MEK1 inhibitor may partly be due to the impairment of cell motility. However, the differences in IC50 for invasiveness and motility suggested that some other invasive factors (besides MMP) must also be interfered by this inhibitor.

26.21

Requirement of Phospholipase CD4 for Ca²⁺ Mobilization Essential for Acrosome Reaction in Sperm

K. Fukami¹, M. Yoshida², T. Inoue², K. Mikoshiba², and T. Takenawa³

¹Genome and Biosignal, Tokyo University of Pharmacy and Science, Hachioji, Tokyo, Japan; ²Div. Molecular Neurobiology, IMS, Tokyo University, Tokyo, Japan; and ³Div. Biochemistry, IMS, Tokyo University, Tokyo, Japan

Zona-pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in sperm is a required step for mammalian fertilization. However, the precise mechanism of the acrosome reaction remains unclear. We previously reported that Phospholipase C delta 4 (PLC δ 4) is involved in ZP-induced acrosome reaction in mouse sperm. Here we have monitored Ca²⁺ responses in single sperm, and we report that the [Ca²⁺]_i increase in response to ZP, which is essential for driving the acrosome reaction in vivo, is absent in PLC δ 4^{-/-} sperm. Progesterone, another physiological inducer of the acrosome reaction, failed to induce sustained [Ca²⁺]_i increases in PLC δ 4^{-/-} sperm and consequently the acrosome reaction was partially inhibited. In addition, we observed oscillative [Ca²⁺]_i increases in wild-type sperm in response to these acrosome inducers. Calcium imaging studies revealed that the [Ca²⁺]_i increases induced by exposure to ZP and progesterone started at different sites within the sperm head, indicating that these inducers drive acrosome reaction through a different mechanism. Furthermore, store-operated channel (SOC) activity was severely impaired in PLC δ 4^{-/-} sperm. These results indicate that PLC δ 4 is an important enzyme for intracellular [Ca²⁺]_i mobilization in ZP-induced acrosome reaction and for sustained [Ca²⁺]_i increase through SOC induced by ZP and progesterone in sperm.

26.22

Effect of Schistosomal Antibodies on Cell Proliferation of *S. mansoni* Schistosomula

M. M. Abdel Fattah¹, Y. M. Shaker², E. Ashour², H. M. Draz², G. Y. Wu³, and C. H. Wu³

¹Ain Shams University, Cairo, Egypt; ²National Research Centre, Cairo, Egypt; and ³University of Connecticut Health Centre, Connecticut, USA

Schistosomula of *Schistosoma mansoni* (20 days old) were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% foetal calf serum, 10% hamster portal venous or 10% hamster peripheral venous serum in presence of bromodeoxyuridine (BrdU) in order to measure differences in cell proliferation. The rates of cell proliferation as expressed by BrdU labelling indices (BLIs) were determined as a function of time of incubation by immunohistochemistry using monoclonal antibody to BrdU. Compared to schistosomula cultured in presence of RPMI plus 10% fetal calf serum, BLIs were increased by 41% in the presence of hamster portal, but not in peripheral serum. The experiment was repeated using hamster portal and peripheral sera containing different schistosomal IgG antibody titres. The results showed decreased values of BLIs compared to sera which did not contain the schistosomal antibody(ies). The results indicated that portal venous serum could have stimulating factor(s) for schistosomula cell proliferation, and the presence of the antibody(ies) greatly inhibit the cell proliferation. This could be due to the blocking of some portal serum factors, which stimulate the cell proliferation by the antibody(ies).