

บทคัดย่อ

เอนไซม์ glucosidase II (GluII) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนในกลุ่ม N-linked glycoproteins ซึ่งโปรตีนที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ Receptors Tyrosine Kinases (RTKs) จากรายงานก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่า beta subunit ของ glucosidase II (GluII β) มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในเนื้อเยื่อมะเร็งปอด แต่กลับมีระดับต่ำมากในเนื้อเยื่อปกติ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนนี้อาจมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง การศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของ GluII β ในการควบคุมการเจริญ การตาย ศักยภาพในการแพร่กระจาย และความไวต่อยาเคมีบำบัด รวมถึงการส่งสัญญาณของโปรตีนกลุ่ม RTKs ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดคาร์ซิโนมาที่มีสถานะของ p53 ที่แตกต่างกัน ได้แก่เซลล์ A549 ซึ่งมี wild-type p53 และ H1299 ซึ่งไม่มี p53

ทำการศึกษาบทบาทของ GluII β ต่อการตายของเซลล์โดยใช้ bromoconduritol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ glucosidase II อย่างจำเพาะ จากนั้นทำการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ autophagy และแบบ apoptosis โดยอาศัยเทคนิค Western blot และการย้อมด้วย annexin V-FITC/propidium iodide ตามลำดับ การศึกษานี้ยังใช้เทคโนโลยี CRISPR-CAS9 เพื่อตัดยีน PRKCSH ซึ่งใช้สร้าง GluII β ออก จากนั้นทำการศึกษาคูณสมบัติของเซลล์ที่ได้เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมในแง่ของ พฤติกรรมการเจริญภายใต้สภาวะที่มีปัจจัยการเจริญจำกัด ศักยภาพในการแพร่กระจายซึ่งได้แก่ความสามารถในการเจริญโดยไม่ต้องอาศัยพื้นผิวสัมผัสของเซลล์และความสามารถในการเคลื่อนย้ายของเซลล์ และตรวจสอบความไวต่อยาเคมีบำบัด cisplatin และ gefitinib เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม นอกจากนี้ยังทำการตรวจวัดการส่งสัญญาณของ RTKs ด้วย human RTK phosphorylation antibody array

ผลการทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ GluII β จะกระตุ้นให้เซลล์เกิด autophagy ได้ในเซลล์ที่ศึกษาทั้งสองชนิด แต่จะกระตุ้นให้เกิด apoptosis ในเฉพาะเซลล์ A549 ซึ่งยังมีการทำงานของ p53 อยู่ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกตัดยีนที่ใช้สร้าง GluII β ออก มีอัตราการเจริญช้ากว่าเซลล์ควบคุมโดยในภาวะที่มีปัจจัยการเจริญระดับปกติ (FBS 10%) เซลล์ A549 และ H1299 มี doubling time เพิ่มขึ้นจาก 18.9 เป็น 38.5 ชม. และจาก 26 เป็น 30 ชั่วโมงตามลำดับ และอัตราการเจริญที่ลดลงนี้จะเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีปัจจัยการเจริญจำกัด คือในภาวะที่ไม่มี FBS เซลล์จะมี doubling time เพิ่มขึ้นจาก 29.3 เป็น 405 ชม. และจาก 86 เป็น 136 ชั่วโมงตามลำดับ เซลล์ที่ถูกกวดการแสดงออกยังมีความสามารถในการเจริญโดยไม่ต้องอาศัยผิวสัมผัสและความสามารถในการเคลื่อนย้ายลดน้อยลง การกวดการแสดงออกของ GluII β ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยา cisplatin เพิ่มขึ้น แต่กลับทำให้เซลล์มะเร็งมีความไวต่อยา gefitinib ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม สิ่งที่น่าสนใจก็คือเซลล์ที่ถูกตัดยีนที่ใช้สร้าง GluII β ออก มีระดับการทำงานส่งสัญญาณ RTKs ลดน้อยลงกว่าครึ่งหนึ่งของเซลล์ควบคุม

โดยสรุปผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของ GluII β มีผลกระตุ้นให้เซลล์จากมะเร็งปอดเกิด autophagy และ apoptosis ได้ ซึ่งสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าโปรตีนนี้น่าจะมีบทบาทอันสำคัญต่อการควบคุมโปรแกรมการตายของเซลล์ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งที่ถูกตัดยีนที่ใช้สร้าง GluII β ออกไป จะมีความบกพร่องในการเจริญ มีศักยภาพในการแพร่กระจายและการส่งสัญญาณของกลุ่มโปรตีน RTKs ภายในเซลล์ลดน้อยลงเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง GluII β อาจเป็นแนวทางใหม่ในการยับยั้งการส่งสัญญาณ RTKs หลากๆ เส้นทางสัญญาณในเวลาเดียวกัน เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งหรือเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อยาที่จะใช้รักษาได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Abstract

Glucosidase II (GlulI) plays a major role in regulating post-translation modification of N-linked glycoproteins, which includes a group of receptor tyrosine kinase (RTKs) proteins. We have previously reported that expression of beta subunit of glucosidase II (GlulI β) was significantly increased in lung tumor tissues, but barely detectable in normal tissues thus indicates its critical role in tumorigenesis. This study aimed to investigate the role of GlulI β in the regulation of cell growth, cell death, metastatic potential, chemotherapeutic response and RTKs signaling activities in lung carcinoma cell lines with different p53 status, (A549 with wild-type p53 and p53 null cells, H1299).

A role of GlulI β towards programmed cell deaths was investigated utilizing a selective inhibitor, bromoconduritol, to inhibit GlulI enzyme activity, after which autophagy and apoptosis was assessed by Western analysis and annexin V-FITC/ propidium iodide double labeling method, respectively. A CRISPR-CAS9 technology was also used to knockout GlulI β encoding gene (PRKCSH) in lung carcinoma cells and the knockout cells were subjected to investigation of growth behaviors under nutritional deprivation conditions, metastatic potential including anchorage-independent growth, and transwell migration, and testing of chemotherapeutic sensitivity to cisplatin and gefitinib in comparison to non-target transfected cells. Signaling activities of RTKs were also investigated using human RTK phosphorylation antibody array membrane.

We discovered that inhibition of GlulI β induced autophagy in all cell lines tested, but induced apoptosis only in cells with wild-type p53. The results also demonstrated that GlulI β knockout cells exhibited drastically slower growth rates in comparison to control cells. Knocking out of GlulI β increased the doubling time of A549 and H1299 cells, (cultured in 10% FBS containing media,) from 18.9 to 38.5 hours and 26 to 30 hours respectively. This impact was more prominent when cells were cultured in limited concentrations of fetal bovine serum. Cells cultured in the absence of FBS exhibited an increase of doubling time from 29.3 to 405 hours and from 86 to 136 hours in A549 and H1299, respectively, thus indicates a significant impairment of surviving ability of the GlulI β knockout cells under nutritional deprivation. Cell migration and anchorage-independent growth, the fundamental components of cancer cell metastasis, was also decreased in GlulI β knockout cells compared to controls. The sensitivity of knockout cells to cisplatin was increased in comparison to non-target transfected cells. However, the sensitivity of knock out cells to gefitinib was decreased and the results from clonogenicity assay also demonstrated the same pattern of finding as MTT assay. Interestingly, knockout of GlulI β resulted in lower RTK signaling activities to less than 50% of those in control cells.

In conclusion, our results show that inhibition of GlulI β induced autophagy and apoptosis in lung carcinoma-derived cells, supporting the hypothesis that GlulI β may play a role in regulating these two cell death programs. Our results have also demonstrated that GlulI β knockout cells exhibited impaired growth behaviors, and reduced metastatic potential and overall RTKs signaling activities in comparison to non-target transfected cells suggested that blocking GlulI β activity may represent a novel strategy to disrupt signaling through multiple RTKs in an effort to treat or sensitize tumors to concomitant therapy. Nevertheless, more investigations are needed.