

## Abstract

---

**Project Code:** TRG5580006  
**Project Title:** Alteration of O-GlcNAcylation in cancer cell lines: A proteomic approaches to identify novel protein biomarkers in cancer  
**Investigator:** **Mr.Voraratt Champattanachai, Chulabhorn Research Institute**  
**E-mail Address:** voraratt@cri.or.th  
**Project Period:** 3 years (extension for 1 year)

Several lines of scientific research report that increasing O-GlcNAcylation, a single *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) attachment of cytoplasmic and nuclear proteins, is associated with malignant development in many types of cancer. The main goal of this study was to seek O-GlcNAc-modified proteins which may play roles in cancer cell growth and development using cancer cell lines as study models. Human cancer cell lines explored in the study were breast adenocarcinoma (MDA231 and MCF-7), colorectal adenocarcinoma (SW480 and HT29), and hepatocarcinoma (HepG2 and SK-Hep-1). The levels of O-GlcNAcylation and its controlling enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) were determined using immunoblotted analysis. We found that all cancer cell lines displayed the similar pattern of O-GlcNAc-modified proteins but they were differed in the level of O-GlcNAcylation. In addition, cancer cell lines tested had higher O-GlcNAcylation level than those in their normal cells. Transient knockdown of O-GlcNAylation by RNA interference (RNAi) against *OGT* gene was performed to study the effect of O-GlcNAylation reduction on cancer cells. siOGT treated cells of all six cancer cell lines showed an obvious reduction of both OGT and O-GlcNAcylation levels in comparison with those with si-scramble control cells. Time course of 5 days of cancer cells treated with either OGT knockdown or siScramble on adherent monolayer conditions reveled unclear whether it causes any effect on cell viability. However, when cultured in soft agar cultures (anchorage independent growth), treatment of siOGT reduces the colony formation and colony sizes of all cancer cells tested. In addition, cultured on poly-hema coated plates (anoikis resistant growth), siOGT treated cells of MCF-7, SW480, and SW620 revealed a decrease in viability. Proteomic and mass spectrometric analysis revealed that si-OGT treated MCF-7 under non-adherent conditions caused up-expression levels of proteins involved in cell signaling, antioxidant and stress responses, transportation of macromolecule within intercellular, and lipid, energy, and nucleic acid metabolism. Among of them, heat shock protein 27 (Hsp27) showed the highest expression level when OGT silencing under non-adherent condition. Taken together, our results indicate that O-GlcNAcylation is strongly required for malignant transformation and development. Moreover, these identified proteins may involve in controlling of cancer cell formation.

**Keywords:** Anchorage independent growth, anoikis resistant growth, cancer, heat shock protein 27, O-GlcNAcylation

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5580006

ชื่อโครงการ : การเปลี่ยนแปลงของ O-GlcNAcylation ในเซลล์มะเร็ง: การใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อค้นหาโปรตีนบ่งชี้ชนิดใหม่ของโรคมะเร็ง

ชื่อนักวิจัย : นายวรรัตน์ แซ่มพัฒน์ชัย สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

E-mail Address : voraratt@cri.or.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (ขยายเวลาสัญญา 1 ปี)

การวิจัยทางวิทยาศาสตร์จากแหล่งต่างๆได้รายงานว่าการเพิ่มระดับปริมาณ โอ-กลูโคสไคเลชั่น ซึ่งเป็นการดัดแปลงเติมน้ำตาลกลูโคสจำนวนหนึ่งโมเลกุลที่โปรตีนต่างๆในไซโทพลาซึมและนิวเคลียส มีความเกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับการพัฒนาการของเนื้อร้ายในโรคมะเร็งหลายชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อค้นหาโปรตีนที่ถูกดัดแปลงด้วยน้ำตาลกลูโคส (O-GlcNAc-modified proteins) ซึ่งน่าจะมีบทบาท สำคัญในการพัฒนาการและการเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเป็นโมเดลใน การศึกษานี้ เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ มะเร็งเต้านม (MDA231 และ MCF-7) มะเร็งลำไส้ (SW480 และ HT29) และมะเร็งตับ (HepG2 และ SK-Hep-1) ระดับของ โอ-กลูโคสไคเลชั่น และเอนไซม์ที่ควบคุมการดัดแปลงโปรตีน คือ โอ-กลูโคสทรานสเฟอเรส (OGT) และ โอ-กลูโคสเคส (OGA) ถูกตรวจวัดโดยใช้การวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยา ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทั้ง หกชนิดมีการแสดงออกที่คล้ายคลึงกันแต่แตกต่างกันที่ระดับปริมาณของ O-GlcNAc-modified proteins นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงทุกชนิดมีระดับของโอ-กลูโคสไคเลชั่นที่สูงกว่าเซลล์ร่างกาย ปกติ การยับยั้งกระบวนการโอ-กลูโคสไคเลชั่นแบบชั่วคราวโดยใช้อาร์เอ็นเออินเตอร์เฟอเรนซ์ (RNAi) กับยีน OGT ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาผลของการลดลงของโอ-กลูโคสไคเลชั่นต่อเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งทั้ง หกชนิดที่ได้รับ RNAi (siOGT) มีการลดลงของระดับ OGT และ โอ-กลูโคสไคเลชั่น อย่างชัดเจนเมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งทั้งหกชนิดที่ได้รับ RNAi ชุดควบคุม (siScramble) เมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งบน เพลทอาหารปกติ (adherent monolayer) เป็นเวลา 5 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างชุดที่ได้รับ siOGT หรือ siScramble พบว่าไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจนว่ามีผลการการเติบโตของเซลล์มะเร็งหรือไม่ อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารวุ้นอ่อน (soft agar) ซึ่งเป็นลักษณะการเติบโตแบบไม่มีที่เกาะ (anchorage independent growth) การลดลงของ OGT มีผลทำให้จำนวนโคโลนีและขนาดของ เซลล์มะเร็งทุกชนิดลดลง นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงเซลล์บนเพลทที่เซลล์ไม่สามารถเกาะได้ (poly-hema coated pates) ซึ่งเป็นลักษณะการเติบโตที่สามารถต่อต้านการตายแบบอนอยคิส (anoikis resistant growth) การลดลงของ OGT มีผลทำให้การเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 SW480 และ SW620 ลดลง การวิเคราะห์ผลทางโปรตีโอมิกส์และแมสสเปกโตรเมตรี แสดงให้เห็นว่า การลดลงของ OGT ของ เซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 ภายใต้สภาวะการเติบโตแบบไม่มีที่เกาะนี้ ทำให้มีการเพิ่มระดับการแสดงออก ของโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณในเซลล์ แอนติออกซิแดนท์และสภาวะเครียด การขนส่ง โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน พลังงาน และกรดนิวคลีอิก จากโปรตีนกลุ่มนี้ ฮีตช็อกโปรตีน 27 (Hsp27) มีระดับการแสดงออกที่สูงที่สุด เมื่อมี การลดลงของ OGT ภายใต้สภาวะการเติบโตแบบไม่มีที่เกาะนี้ ผลการทดลองทั้งหมดนี้ ชี้ให้เห็นว่า โอ- กลูโคสไคเลชั่น เป็นกระบวนการที่สำคัญสำหรับการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้โปรตีนที่วิเคราะห์ได้นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเติบโตของเซลล์มะเร็ง

คำหลัก : Anchorage independent growth, anoikis resistant growth, cancer, heat shock protein 27, O-GlcNAcylation