

Thesis Title Molecular Mechanisms of RCL of Maspin on Anti-invasion of Human Breast Carcinoma Cell

Author Mr. Chakkrit Khanaree

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisor
Asst. Prof. Dr. Ariyaphong Wongnoppavich

ABSTRACT

Maspin, a tumor suppressor SERPIN, inhibits both *in vitro* and *in vivo* cancer migration, invasion and metastasis. It also induces cancer cell adhesion to extracellular matrix. However, molecular mechanism of maspin's action is still unclear. Earlier studies showed its functional region is located on the Reactive Center Loop (RCL). Here, we characterized the role of the maspin RCL on adhesion, migration and invasion in highly invasive human breast carcinoma cell line (MDA-MB-231). Cancer cells were transfected with pcDNA3.1-His-FLAG containing maspin, ovalbumin, or maspin/ovalbumin RCL chimeric mutants. Analysis of cell-fibronectin adhesion showed that the increased adhesion of MDA-MB-231 cells significantly required the presence of maspin RCL. Moreover, expression of maspin wild-type and ovalbumin mutant containing maspin RCL markedly inhibited *in vitro* migration and Matrigel invasion of MDA-MB-231 cells. The proteome of MDA-MB-231 cells expressing maspin, ovalbumin, or the RCL chimeric mutants was analyzed using 2D-gel electrophoresis and a shotgun proteomic approach. Interestingly,

proteome analysis of maspin- or OMO-transfected MDA-MB-231 cells revealed stimulation in contents of proteins with tumor suppressing properties while those known to promote cancer metastasis and ubiquitin-proteasome pathway were decreased significantly. As confirmed by the RT-qPCR, the transcript levels of epithelial cell transforming 2 (ECT2) and proteasome subunit beta type-3 (PSMB3) were decreased in maspin and OMO transfected cells compared with mock control. Furthermore, transfection of MDA-MB-231 cells with maspin or maspin RCL-containing ovalbumin mutant significantly reduced the chymotrypsin-like activity of 20S proteasome. These results clearly demonstrate that the tumor suppressive properties of maspin reside in its RCL domain.

| | |
|-----------------------------|--|
| ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ | กลไกระดับโมเลกุลของอาร์ซีแอลของแมสปีนต่อการต้านการรุกรานของเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ |
| ผู้เขียน | นายจักรกฤษณ์ คณาวิทย์ |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อริยพงษ์ วงษ์นพวิชญ์ |

บทคัดย่อ

แมสปีนเป็นโปรตีนในกลุ่มเซอรพินที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็ง โดยยับยั้งการเคลื่อนที่ การรุกรานและการแพร่กระจายของมะเร็งทั้งในระดับเซลล์และในสิ่งมีชีวิต แมสปีนยังเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งยึดเกาะกับแมทริกซ์ภายนอกเซลล์ได้ด้วย แต่ทว่ากลไกระดับโมเลกุลของการทำงานของแมสปีนยังไม่ชัดเจน จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงบริเวณหน้าที่ของแมสปีนอยู่ที่รีแอกทีฟ เซ็นเตอร์ ลูบ (อาร์ซีแอล) การวิจัยนี้จึงศึกษาบทบาทของอาร์ซีแอลของแมสปีนต่อการยึดเกาะ การเคลื่อนที่และการรุกรานในเซลล์มะเร็งเต้านมมนุษย์ชนิด เอ็มดีเอ-เอ็มบี-231 เซลล์มะเร็งนี้ได้รับการสอดใส่พลาสติกที่บรรจุอินแมสปีน หรืออิน โอวัลบูมิน หรืออินลูกผสมระหว่างอาร์ซีแอลของแมสปีนกับ โอวัลบูมิน ผลการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์มะเร็งกับไฟโบรเนคตินพบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในยึดเกาะของเซลล์มะเร็งกับไฟโบรเนคติน โดยต้องอาศัยอาร์ซีแอลของแมสปีน นอกจากนี้การแสดงออกของแมสปีนและโอวัลบูมินมีวแดนที่มีอาร์ซีแอลของแมสปีน สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานผ่านแมทริกซ์เจลของเซลล์มะเร็งได้ การศึกษาโปรติโอมของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของแมสปีน หรือโอวัลบูมิน หรือโปรตีนลูกผสมของอาร์ซีแอลใช้วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 2 ระนาบและวิธีซ็อตกัน โปรติโอมิกส์ ผลการทดลองแสดงว่าในเซลล์ที่มีแมสปีนและโอวัลบูมินลูกผสมอาร์ซีแอลมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งมะเร็ง ในขณะที่โปรตีนที่ส่งเสริมการแพร่กระจายของมะเร็งและวิถียูบิควิติน-โปรติเอโซมกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การยืนยันผลดังกล่าวด้วยวิธีอาร์ที-คิวพีซีอาร์พีระดับทรานสคริปของอพีทีเลียล เซลล์ ทรานสเฟอร์มิง 2 (อีซีที 2) และโปรติเอโซม สับยูนิท เบต้า ชนิด 3 (พีเอสเอ็มบี3) ลดลงในเซลล์ที่มีการใส่อินแมสปีนและอิน โอวัลบูมินลูกผสมอาร์ซีแอล เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใส่พลาสติกเปล่า นอกจากนี้การใส่อินดังกล่าวทั้งสองในเซลล์มะเร็งเต้านมทำให้กัมมันตภาพแบบไคโมทริบซินของ 20 เอสโปรติเอโซมลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นกัน ผลการ

ทดลองเหล่านี้แสดงอย่างชัดเจนว่าคุณสมบัติการต้านมะเร็งของแมสปีนอยู่ที่บริเวณอาร์ซีแอลของ
โมเลกุล