Thesis Title Urinary Markers of Cancer Patients by Proteomics

Author Mr. Payungsak Tantipaiboonwong

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairperson
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Member
Lect. Dr. Dararat Tongkao	Member
Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Member

ABSTRACT

Many components in urine are useful in clinical diagnosis and urinary proteins are known as the important components to define many diseases such as proteinuria, kidney, bladder and urinary tract diseases. Urine is well known that it has low abundant proteins and contains high concentration of urea, uric acid and many salts. These components can affect on the preparative separation of urinary proteins to be further analyzed by proteomic approach. Thus, the sample preparation of urine samples is very important as the prior step of protein separation by using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Firstly, we focused on the comparison of different sample preparation methods for isolating urinary protein prior to protein analysis. The pooled healthy and pooled lung cancer patient samples which prepared by selective methods were used for preliminary investigation of some putative urinary protein markers. Urine samples were passed through a gel filtration column (PD-10 desalting column) for removing the high salts and subsequently

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

concentrated and removed remaining interferences by ultrafiltration or four precipitation methods. The analysis of urinary proteins by HPLC and SDS-PAGE showed quite similarity in each profile among preparation methods and few different profiles between normal and lung cancer patients. Contrastingly, the results of two-dimensional electrophoresis (2-DE) showed more distinctly different protein patterns. Our finding showed that the sequential preparation of urinary proteins by gel filtration and ultrafiltration could retain almost of urinary proteins which demonstrated the highest number of protein spots on 2-DE gels. Protein spots of interest were preliminarily identified as urinary protein markers such as CD59 glycoprotein, transthyretin, GM2 activator protein (GM2AP) and Ig-free light chain, which have been reported to be functionally related to tumor and cancer diseases. Although the sequential preparation of urine samples by gel filtration and protein precipitation methods retained the lower amount of proteins on 2-DE gels, they yielded most high molecular weight proteins. Therefore, there were alternative choices of urine sample preparation for studying the urinary proteome.

Secondly, the 2-DE gels of individual single sample were separately run and showed the obviously high expression of biomarker in lung cancer urine samples. The data represented the high expression of urinary GM2AP in lung cancer patients compared to normal samples. The quantities of GM2AP spots in lung cancer patient groups were 2.5-4 times higher than normal groups. This demonstrated its higher amounts than normal donors especially in non-small cell lung cancer (NSCLC) which was the most common of lung cancer. In the term of application, antigenic peptides of GM2AP were generated for producing GM2AP antibody which was useful for preliminary cancer detection with urine samples.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

The sample preparation of urine samples, protein patterns, protein identifications and major different proteins were very important and useful for further studying the proteome of lung cancer urines. These preliminary urinary biomarkers might become the lung cancer markers which would be very useful for further preclinical diagnostic and therapeutic applications. In addition, we could use proteomic results of lung cancer urine coordinated with results from lung cancer serum, tissue and cell line for studying the biological function in whole system of lung cancer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ตัวบ่งชี้โรคจากปัสสาวะผู้ป่วยมะเร็งโดยโปรติโอมิคส์

ผู้เขียน นายพยุงศักดิ์ ตันติไพบูลย์วงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ศ. ดร. สุ่ยเทียน เฉิน	กรรมการ
อ. ดร. ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ
ผศ.ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	กรรมการ

บทคัดย่อ

องค์ประกอบหลายอย่างในปัสสาวะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เพื่อใช้ในการตรวจและรักษาโรคต่างๆ เช่น โปรตีนูเรีย โรคไต รวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับกระเพาะปัสสาวะและทางเดินปัสสาวะ ปัสสาวะของคนทั่วไปนั้นมีปริมาณโปรตีนน้อยมาก องค์ประกอบส่วนใหญ่ในปัสสาวะคือ ยูเรีย กรดยูริค และเกลือต่างๆ ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่นี้มีผลต่อขั้นตอนการเตรียมและการแยกโปรตีนในปัสสาวะออกมาเพื่อใช้วิเคราะห์ด้วยวิธีทางโปรติโอมิคส์ ดังนั้นวิธีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะจึงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างแรกก่อนที่จะนำโปรตีนในปัสสาวะไปแยก และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบสองมิติ (Two-dimensional electrophoresis) ร่วมกับเครื่องวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร (mass spectrometry) การศึกษาช่วงแรกได้ให้ความสำคัญต่อการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเพื่อแยกเอาโปรตีนในปัสสาวะออกมาก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ ปัสสาวะของคนปกติถูกนำมารวมกันแยกกับปัสสาวะของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดที่นำมารวมกัน ถูกนำมาใช้หาวิธีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เบื้องต้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งจากโปรตีนในปัสสาวะ คอลัมน์เจลฟิลเตรชัน (PD-10 desalting column) ถูกนำมาใช้กับตัวอย่างปัสสาวะเพื่อกำจัดส่วนประกอบของเกลือและองค์ประกอบอื่นที่เล็กกว่าโปรตีนออกในขั้นตอนแรก ก่อนที่จะแยกเอาโปรตีนในปัสสาวะด้วยวิธีอุลตร้าฟิลเตรชัน หรือวิธีการตกตะกอนทั้งสี่แบบ ผลการวิเคราะห์โปรตีนในปัสสาวะด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบหนึ่งมิติ (SDS-PAGE) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบโปรตีนในปัสสาวะที่ได้มีความคล้ายคลึงกันในแต่ละวิธีการเตรียมตัวอย่าง แต่พบความแตกต่างเล็กน้อยระหว่างรูปแบบโปรตีนในปัสสาวะของคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบสองมิติพบความแตกต่างมากกว่า ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีคอลัมน์เจลฟิลเตรชันและอุลตราฟิลเตรชันสามารถแยกโปรตีนในปัสสาวะออกมาได้มากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากจำนวนจุดโปรตีนบนแผ่นเจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบสองมิติ รวมถึงพบโปรตีนในปัสสาวะที่เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งเบื้องต้น ได้แก่ CD59 ไกลโคโปรตีน, ทรานส์ไทรีทีน (transthyretin), GM2 แอคติเวเตอร์โปรตีน (GM2AP) และ อิมมิวโนโกลบูลินฟรีไลท์เชน (Ig-free light chain) ซึ่งมีรายงานถึงบทบาทหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับเนื้องอกและมะเร็ง ถึงแม้ว่าการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน และการตกตะกอนให้ผลการแยกโปรตีนในปัสสาวะในจำนวนที่น้อยกว่าบนแผ่นเจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบสองมิติ แต่ให้ผลการแยกที่ชัดเจนในช่วงโปรตีนโมเลกุลใหญ่ๆ เพราะฉะนั้นจึงมีทางเลือกสำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างโปรตีนในปัสสาวะเพื่อศึกษาโปรติโอมิคส์ในปัสสาวะ

การศึกษาในช่วงที่สองได้นำตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยแต่ละคนมาแยกวิเคราะห์บนแผ่นเจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบสองมิติ และพบตัวบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งปอด ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นปริมาณ GM2AP ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็งที่มีมากกว่าคนปกติ ซึ่งปริมาณของจุด GM2AP ในตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งปอดสูงกว่าคนปกติ 2.5-4 เท่า โดยเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) ซึ่งเป็นชนิดที่มีมากที่สุดของโรคมะเร็งปอด ในส่วนของการประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ทำการสร้างแอนติเจนิคเปปไทด์ของ GM2AP เพื่อใช้ผลิตแอนติบอดีของ GM2AP เพื่อประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นในตัวอย่างปัสสาวะ

การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ รูปแบบโปรตีน การพิสูจน์เอกลักษณ์โปรตีน และโปรตีนที่มีความแตกต่างทั้งหลายมีความสำคัญ และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านโปรติโอมิคส์ในปัสสาวะของผู้ป่วยมะเร็ง ผลของตัวบ่งชี้มะเร็งเบื้องต้นเหล่านี้อาจกลายเป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งปอดต่อไปซึ่งมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นทางคลินิก และการประยุกต์ทางด้านยารักษาโรค นอกจากนั้นยังสามารถนำผลการวิจัยโปรติโอมิคส์ในปัสสาวะ รวมเข้ากับผลการวิจัยจากน้ำเลือด ชิ้นเนื้อ และเซลล์เพาะเลี้ยง ของผู้ป่วยมะเร็งปอดในการศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพในระบบโรคมะเร็งปอดทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved