



**DEVELOPMENT OF STABLE CELL LINE EXPRESSING
ACTIVE MEK AND EFFECT OF ITS INHIBITOR ON
CYTOSKELETAL ORGANIZATION**

SARAWUT KUMPHUNE

~

With compliments
of

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIRMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2002

ISBN 974-04-2136-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERISTY

TH
S243d
2002

4236787 SCBC/M: MAJOR: BIOCHEMISTRY; M. Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : CANCER / MEK EE / PD098059 / CYTOSKELETAL

SARAWUT KUMPHUNE : DEVELOPMENT OF STABLE CELL LINE EXPRESSING ACTIVE MEK AND EFFECT OF ITS INHIBITOR ON CYTOSKELETAL ORGANIZATION. THESIS ADVISORS: TUANGPORN SUTTIPHONGCHAI, Ph.D., RUTAIWAN TOHTONG, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D. 99P. ISBN 974-560-XXX-XXX

Mitogen activated protein (MAP) kinase is one of the key mediators that transduce signals from variety of extracellular mitogens. It has been shown to play a crucial role in cell proliferation, differentiation and/or cell motility (one of the requirements for metastasis). Preliminary work from our laboratory showed that inhibition of MAP kinase activation resulted in a decrease in invasiveness of rat prostatic cancer cell lines indicating that MAP kinase-mediated signal transduction is necessary for cell invasion. In this project we used a reciprocal approach to confirm the requirement of MAP kinase in cancer cell invasion by creating a cell line containing a high level of activated MAP kinase. Since the inhibition of invasion is suggested to be partly due to the inhibition of cell motility, we also elucidated the possible mechanism by which MEK inhibitor inhibits cell motility through its effect on actin organization, which is the fundamental mechanism of cell motility.

To create a cell line containing a high level of activated MAP kinase, constitutively active MEK (MEK EE), an upstream regulator of MAP kinase, a gene was introduced into AT-01 cell. Stable MEK EE transfected cells were selected by neomycin and analyzed for the existence of the MEK EE gene by PCR. Although MEK EE gene was successfully introduced into AT-01 cell, the gene failed to express functionally active MEK EE protein as the results showed that the level of phosphorylated MAP kinase in MEK EE transfected cell was not significantly different from that in non-transfected and vector-transfected AT-01 cells.

Actin organization has been implicated to play a major role in cell motility and to be related to metastatic ability in many cancer cells. We hypothesized that MEK inhibitor inhibits cell motility and invasion of Dunning cell lines by affecting actin organization. The effect of MEK inhibitor, PD098059, on actin organization was studied using fluorescence staining. We found that treatment 100 μ M PD098059 resulted in induction of cell spreading and stress fiber formation and reduction of membrane ruffle and actin accumulation at the leading edge. This change in actin organization was consistent with the reduction in cell motility. These data suggested that inhibition of cell motility by MEK inhibitor was due to its modulating of actin organization.

4236787 SCBC/M: สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

สราวุธ คำปวน: การพัฒนาสายพันธุ์ของเซลล์ที่มีความสามารถในการผลิต active MEK และผลของ MEK inhibitor ต่อการจัดเรียงตัวของ cytoskeleton (DEVELOPMENT OF STABLE CELL LINE EXPRESSING ACTIVE MEK AND EFFECT OF ITS INHIBITOR ON CYTOSKELETAL ORGANIZATION) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ดวงพร สุทธิพงษ์ชัย Ph.D., ฤทัยวรรณ โต้ะทอง Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D., 99 หน้า ISBN 974-04-2136-9

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดเนื่องจากการสูญเสียความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโต และการแบ่งขยายเซลล์ การสูญเสียกลไกในการควบคุมนี้อาจจะทำให้เกิดการลุกลามและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อของอวัยวะอื่นๆ ที่รอบๆ ก้อนมะเร็งและ อวัยวะที่อยู่ห่างไกลออกไป ขบวนการนี้เรียกว่า Metastasis กลไกหนึ่งซึ่งมีความสำคัญในการส่งสัญญาณของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ras/Raf/MAP kinase pathway ซึ่งมีผลต่อการแบ่งเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการแพร่กระจายของเซลล์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า MAP kinase มีส่วนสำคัญและจำเป็นในการบุกรุกของ เซลล์โดยผ่านขบวนการการเคลื่อนที่ และเมื่อทำการยับยั้ง active MAP kinase โดย MEK inhibitor (PD098059) แล้วพบว่าสามารถยับยั้งการบุกรุก และการเคลื่อนที่ของเซลล์

โครงการวิจัยนี้ เราต้องการทดสอบว่าเซลล์มะเร็งที่มีความสามารถในการบุกรุกต่ำ ต้องการ MAP kinase ในการเพิ่มความสามารถในการบุกรุก ดังนั้นเราจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาสายพันธุ์ของเซลล์ AT-01 ซึ่งเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากหนูที่มีความสามารถในการแพร่กระจาย และมีระดับของ active MAP kinase ต่ำ ให้มีการผลิต active MAP kinase ตลอดเวลา โดยการนำ active mutant MEK (MEK EE) gene ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการกระตุ้นการทำงานของ MAP kinase เข้าสู่เซลล์ AT-01 และเนื่องจากการยับยั้ง การบุกรุกของเซลล์เป็นผลจากการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ ดังนั้นเราจึงต้องการพิสูจน์ว่า การที่ MEK inhibitor สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์นั้น เป็นผลจากการที่ MEK inhibitor มีผลต่อการจัดเรียงตัวของ actin ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในกลไกพื้นฐานในการเคลื่อนที่ของเซลล์

ผลการทดลองพบว่า การพัฒนาสายพันธุ์ที่ผลิต Active MEK ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากระดับของ active MAP kinase ในเซลล์ที่นำ MEK EE เข้าไปนั้น มีระดับเซลล์ที่ไม่ได้มีการนำ MEK EE เข้าไป ถึงแม้ว่าสามารถพิสูจน์โดยวิธี PCR ได้ว่า MEK EE gene สามารถเข้าไปอยู่ในเซลล์ได้จริง

ผลการทดลองจากการศึกษาผลกระทบของ MEK inhibitor ต่อการจัดเรียงตัวของ actin โดยวิธี Fluorescence staining พบว่า การ treat ด้วย 100µM MEK inhibitor สามารถชักนำให้เกิดการแผ่ขยายของเซลล์และเกิด stress fiber อีกทั้งยังพบว่ามีการลดลงของ membrane ruffle และปริมาณ actin ที่สะสมที่ปลายเซลล์ อาจกล่าวได้ว่า การยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ด้วย MEK inhibitor เป็นผลเนื่องจากการจัดเรียงตัวของ actin