ผลของการกดวิถีสัญญาณ Notch ต่อฟีโนไทป์ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV เป็นบวก

นางสาว ญาณิน กุญชรินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF SUPPRESSING NOTCH SIGNALING ON PHENOTYPES OF HPV POSITIVE CERVICAL CANCER CELL LINES

Miss Yanin Kuncharin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

532223

Thesis Title	EFFECTS OF SUPPRESSING NOTCH SIGNALING ON PHENOTYPES OF HPV POSITIVE CERVICAL CANCER CELL LINES
By	Miss Yanin Kuncharin
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Tanapat Palaga, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Tanapat Palaga, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Pokrath Hansasuta, M.D., DPhil (Oxon))

..... External Examiner
(Associate Professor Mathurose Ponglikitmongkol, Ph.D.)

ญาณิน กุญชรินทร์ : ผลของการกดวิถีสัญญาณ Notch ต่อฟีโนไทป์ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV เป็นบวก (Effects of suppressing Notch signaling on phenotypes of HPV positive cervical cancer cell lines) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, 88 หน้า.

Notch เป็นกลุ่มยีนประมวลรหัสโปรตีน Notch ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ มีบทบาทควบคุมการแปรสภาพเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ การเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ในเนื้อเยื่อหลายชนิด เมื่อ Notch มีอันตรกิริยากับลิแกนด์ จะเหนี่ยวนำให้โปรตีน Notch ถูกตัดด้วยเอนไซม์ γ-secretase ที่ขึ้นกับ presenilin ทำให้ชิ้นส่วนของโปรตีน Notch ที่อยู่ภายในเซลล์เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและประกอบเป็นสารประกอบ นำไปสู่การกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย MAMLs เป็นโปรตีนที่จำเป็นในการประกอบเป็นสารประกอบที่มีความเสถียรซึ่งมีโปรตีน Notch รวมอยู่ด้วยภายในนิวเคลียส ได้มีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของ *Notch* ในการทำหน้าที่เป็นยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง หนึ่งในรายงานนั้นพบการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน *Notch1* ซึ่งเป็นสาเหตุของการพัฒนาไปเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสในทีเซลล์และมะเร็งต่อมน้ำเหลืองในมนุษย์ มีรายงานหลายฉบับรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างวิถีสัญญาณ Notch กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก แต่บทบาทของวิถีสัญญาณ Notch กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกยังไม่เป็นที่ชัดเจน หนึ่งในรายงานนั้นพบว่ายีน *Notch1* ถูกขัดขวางการทำงานโดยการแทรกของไวรัสเอชพีวีชนิด 16 ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของเนื้อเยื่อสำหรับบทบาทของ *Notch* อีกด้านหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูก ได้มีรายงานว่าวิถีสัญญาณ Notch อาจทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งปากมดลูก ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยใช้สารยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีครีเทส (GSI) หรือ dominant Negative MAML1 (DN-MAML1) และทำการศึกษาผลของการกดวิถีสัญญาณ Notch ต่อฟีโนไทป์ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV เป็นบวก (HeLa, CaSki, SiHa) ผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ทั้งสามชนิดมีการแสดงออกของโปรตีน Notch1 แต่พบ cleaved Notch1 (Val1744) เฉพาะใน CaSki เท่านั้น หลังจากกดวิถีสัญญาณ Notch โดยใช้ GSI เป็นเวลา 4 วัน พบการแสดงออกของโปรตีน cleaved Notch1 ใน CaSki หายไป และปริมาณโปรตีน Notch1 ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ในอีกแง่หนึ่งการแสดงออกของยีน *Hes1*, *MAML* และ *TP53* เพิ่มขึ้นใน CaSki ในเซลล์ทั้งสามชนิดไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับการอยู่รอดของเซลล์และการเข้าสู่ระยะต่างๆ ในวัฏจักรของเซลล์เมื่อใช้ GSI แต่พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ CaSki เพิ่มขึ้น เมื่อนำพลาสมิดของ DN-MAML1 เข้าสู่เซลล์โดยรีโทรไวรัส การแสดงออกของยีน *Notch1* และ *Hes1* ลดลง อีกทั้งพบว่า DN-MAML1 ชักนำการเพิ่มจำนวนของ CaSki และส่งผลต่อการสร้างโคโลนีที่มีขนาดเล็กลง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการเข้าสู่ระยะต่างๆในวัฏจักรของเซลล์ ผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นบ่งบอกได้ว่าการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch โดยสารยับยั้งเอนไซม์แกมมาซีครีเทสหรือ DN-MAML1 นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มี HPV

สาขาวิชา..จุลชีววิทยาทางการแพทย์..
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนิสิต .....ญาณิน กุญชรินทร์.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5087130720: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : CERVICAL CANCER / NOTCH SIGNALING PATHWAY / γ-SECRETASE INHIBITOR / DOMINANT NEGATIVE MASTERMINDLIKE1 / HPV

YANIN KUNCHARIN : EFFECTS OF SUPPRESSING NOTCH SIGNALING ON PHENOTYPES OF HPV POSITIVE CERVICAL CANCER CELL LINES. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D., 88 pp.

Notch encodes a protein family of transmembrane receptors that regulates differentiation, proliferation and apoptosis in various cell types. Upon receptor-ligand interaction, Notch are cleaved by a presenilin-dependent γ-secretase. This active form of Notch forms a complex with other proteins in the nucleus and functions as transcription activator. MAMLs are scaffold proteins essential for forming a stable transcriptional activation complex containing Notch in the nucleus. In humans, aberrant *Notch1* expression was identified as a causative factor in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma, establishing it as protooncogene. Several reports indicated that Notch signaling is associated with transformation of HPV-positive epithelial cells but the exact roles of Notch signaling in HPV mediated cervical cancer is still controversial. Disruption of *Notch1* HPV16 integrations may contribute to malignancy of cervical cancer. In contrast, other studies suggested that Notch signaling acted as a tumor suppressor in HPV-mediated transformation. In this study, we used γ-secretase inhibitor (GSI) or dominant negative MAML1 (DN-MAML1) to suppress Notch signaling pathway and examined the effects of Notch signaling in HPV-positive cervical cancer cell lines (HeLa, CaSki, SiHa). All cell lines expressed Notch1, and only CaSki constitutively expressed cleaved Notch1 (Val1744). After GSI treatment for 4 days, complete abrogation of the cleaved Notch1 and increased level of total Notch1 were observed in CaSki. On the other hand, expression of *Hes1*, *MAML1* and *TP53* were increased. During this period, GSI treatment did not affect cell viability and cell cycle progression in all cell lines tested. Surprisingly, GSI treatment resulted in increased cell proliferation in CaSki. Upon DN-MAML1 retroviral transduction, *Notch1* and *Hes1* mRNA expression were decreased.
In addition, DN-MAML1 also induced proliferation of CaSki, resulting in formation of smaller colonies, but difference in cell cycle progression was not detected. These results indicated that suppression of Notch signaling by γ-secretase inhibitor or DN-MAML1 led to cell proliferation in HPV-positive cervical cancer cell lines.

Field of Study : Medical Microbiology Student's Signature Yanin Kuncharin

Academic Year : 2010 Advisor's Signature Tanapat Palaga

Co-Advisor's Signature Parvapan Bhattarakosol

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to the following people who gave me the opportunity to complete my thesis. First, I would like to thank Assistant Professor Dr. Tanapat Palaga, my thesis advisor at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for his kindness, suggestion, and strong encouragement during the period of this study.

I am in dept to Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, my co-advisor at the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness, advice, and strong encouragement during the period of this study.

I would like to express gratitude to the chairman of this thesis committee, Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, the examiner Assistant Professor Dr. Pokrath Hansasuta and the external examiner Associate Professor Dr. Mathurose Ponglikitmongkol for their suggestions and comments.

I would like to thank Khun Noppadol Sa-Ard-Iam for his help on FACS analysis, the staffs of the Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their helps and all of my 403 laboratory members for their help and friendship.

Finally, I am deeply thankful to my parents and my friends for their understanding and support during my study period. My thanks also given to all of those whose names have not been mentioned, for helping me to make this work complete.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiii

CHAPTER I BACKGROUND..... 1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS..... 5

2.1 *Notch* and Notch signaling..... 5

2.2 Mastermind-like..... 6

2.2.1 Dominant negative mastermind-like1 (DN-MAML1)..... 9

2.3 The role of Notch in tumorigenesis..... 10

2.3.1 Notch signaling in cervical cancer..... 10

2.3.1.1 Oncogenic Notch signaling in cervical cancer..... 11

2.3.1.2 Tumor suppressive Notch signaling in cervical cancer..... 13

2.4 MAML family members linked to cancer..... 14

2.4.1 MAML2 and mucoepidermoid carcinoma..... 14

2.4.2 Modulating Notch signaling via the MAML family suppresses growth of Notch-dependent leukemia cells..... 15

2.4.3 MAML proteins and cervical cancer..... 16

2.5 Gamma secretase inhibitor (γ-secretase inhibitor: GSI)..... 16

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS..... 19

3.1 Cell lines and media..... 19

Page

3.2 Cell culture and treatment..... 19

3.2.1 Cell culture..... 19

3.2.2 Cell preservation for storage..... 20

3.2.3 Thawing cell for use..... 20

3.3 Plasmids and transfection..... 20

3.3.1 Plasmid preparation..... 20

3.3.2 Plasmid isolation..... 21

3.3.3 Plasmid quantitation..... 21

3.3.4 Bacterial glycerol stock..... 21

3.3.5 Transient transfection using FuGene® HD transfection reagent..... 22

3.4 Retroviral vector construction and transduction..... 22

3.4.1 Preparing HPV-positive cervical cancer cell lines and 293T cells..... 22

3.4.2 Preparing retroviral supernatant..... 22

3.4.3 Retroviral infection..... 23

3.5 RNA extraction..... 24

3.5.1 Quantitation of RNA using spectrophotometer..... 24

3.5.2 Quantitation of RNA using Quanti iT Assays..... 25

3.6 cDNA synthesis by reverse transcriptase..... 25

3.7 Polymerase chain reaction (PCR)..... 26

3.8 Semi-Quantitative RT-PCR (qPCR)..... 27

3.9 Western blot..... 28

3.9.1 Protein extraction..... 28

3.9.2 Protein assay..... 28

3.9.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)..... 29

3.9.4 Protein transfer..... 29

Page

3.9.5 Antibody probing..... 30

3.9.6 Signal detection by chemiluminescence and autoradiography..... 30

3.10 MTT assay..... 31

3.11 Cell cycle analysis..... 31

3.12 Detection of GFP^+ cells upon retroviral transduction..... 32

3.13 Clonogenic proliferation assay..... 32

3.14 Statistical analysis..... 32

CHAPTER IV RESULTS..... 33

4.1 Expression of *Notch receptors*, *MAML1*, *Hes1*, Notch1 and cleaved Notch1 in HPV-positive cervical cancer cell lines..... 33

4.2 Effects of DAPT treatment on Notch1 and cleaved Notch1 expression and viability of HPV-positive cervical cancer cell lines 34

4.3 Effects of DAPT treatment on expression of *Notch1*, *Hes1*, *MAML1*, *E6*, *E7* and *TP53*..... 37

4.4 Effects of DAPT treatment on cell cycle and cell proliferation..... 40

4.5 Retroviral transduction of CaSki with DN-MAML1 or control plasmid vector..... 44

4.6 Effects of DN-MAML1 on expression of *Notch1*, *Hes-1*, *MAML1*, *E6*, *E7* and *TP53* in CaSki 44

4.7 Effects of DN-MAML1 expression on cell viability in CaSki..... 46

4.8 Effects of DN-MAML1 expression on cell cycle and cell proliferation of CaSki..... 47

CHAPTER V DISCUSSION..... 51

CHAPTER VI CONCLUSIONS..... 56

Page

REFERENCES..... 59

APPENDIX..... 63

BIOGRAPHY..... 73

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Structure of Notch receptors and Notch ligands	6
2.2	Notch signaling	7
2.3	Structure of MAML proteins	8
2.4	Inhibition of Notch-mediated transcription by expression of a dominant negative MAML1 mutant, DN-MAML1	9
2.5	Possible cross talk between Notch, NF-κB through PI3K-AKT pathways	13
2.6	A model of Notch1-mediated growth arrest in cervical cancer cells	15
2.7	Structure of γ-secretase	16
2.8	Structure of *N*-[*N*-(3,5- difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT)	17
4.1	Expressions of *hNotch receptors*, *hMAML1* and *hHes1* in HPV-positive cervical cancer cell lines, HeLa, CaSki and SiHa	33
4.2	Expressions of Notch1 and cleaved Notch1 in HeLa, SiHa and CaSki	34
4.3	Expressions of Notch1 and cleaved Notch1 in HeLa, CaSki and SiHa treated with DAPT, DMSO or left untreated for 4 days	35
4.4	The effect of DAPT treatment on viability of HPV-positive cervical cancer cell lines	37
4.5	Cellular morphology of HPV-positive cervical cancer cell lines treated with DAPT, DMSO or left untreated for 4 days	38
4.6	Expressions of *hHes1*, *hNotch1*, *hMAML1*, *hTP53*, HPV type 18 *E6* and *E7* and HPV type 16 *E6* and *E7* upon treatment with DAPT	40
4.7	Cell cycle analysis in DAPT-treated CaSki and SiHa	41
4.8	Clonogenic assay of HPV-positive cervical cancer cells in DAPT-treated	43

Figure		Page
4.9	Expression of GFP or EGFP in CaSki transduced with MSCV-Mam (12-74)-EGFP (DN-MAML1) or control plasmid vector (MSCV-IRES-GFP).....	45
4.10	Expressions of *hHes1*, *hNotch1*, *hMAML1*, *hTP53* and HPV type 16 *E6* and *E7* in CaSki transduced with control MSCV-IRES-GFP or MSCV-Mam (12-74)-EGFP.....	46
4.11	Effect of DN-MAML1 on viability of CaSki.....	47
4.12	Effect of DN-MAML1 on cell cycle in CaSki.....	48
4.13	Clonogenic assay of CaSki transduced with DN-MAML1 or control vector	50
6.1	Schematic diagram showing the effects of GSI to Notch signaling in CaSki.....	57
6.2	Schematic diagram showing the effects of DN-MAML1 to Notch signaling in CaSki	57

LIST OF ABBREVIATIONS

A	Absorbance
Ab	Antibody
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
CO_2	Carbon dioxide
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DN-MAML1	Dominant negative Mastermindlike1
dNTP	dATP, dCTP, dGTP and dTTP
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
g (centrifugation speed)	Gravity
GFP	Green fluorescent protein
GSI	Gamma secretase inhibitor
hr	Hour
HCl	Hydrochloric acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HPV	Human papillomavirus
HRP	Horse radish peroxidase
kDa	Kilo Dalton
LB	Lauria bertani
min	minute
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	Phosphate buffer saline-Tween
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidine fluoride
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	second
U	Unit
v	Volume
w	Weight
µg	Microgram
µl	Microliter
µm	Micrometer
mA	Milliampere
mg	Milligram
mm	Millimete
mM	Millimolar
nm	Nanomete
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma

°C	Degree Celsius
×	Fold
/	Per
%	Percentage
:	Ratio