

Thesis Title Expression of GM2 Activator Protein as a Potential Biomarker for Lung Cancer

Author Ms. Laddawan Potprommanee

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Lalida Shank	Advisor
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Co-advisor
Dr. Padchane Sangthong	Co-advisor
Asst. Prof. Busyamas Chewaskulyong, M.D.	Co-advisor

ABSTRACT

Lung cancer is a leading cause of cancer-related deaths worldwide. Finding effective biomarkers for early diagnosis would be useful for potential cure of this deadly disease. In previous report, the protein expression pattern of urine samples from lung cancer patients and healthy controls were compared using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Intensity of GM2 activator protein (GM2AP) in lung cancer patients was found with 2.5-4.0 fold higher than that found in healthy controls. Hence, GM2AP became the protein of interest. This protein was focused because it was related to tumor-associated gangliosides found in cancer progression. The aim of this study was to investigate and validate the potential of GM2AP as a biomarker for diagnosis of lung cancer. First, proteomic approach was employed to confirm the increased levels of GM2AP in urine samples from lung cancer patients and healthy controls. The result revealed that GM2AP levels in subtypes of lung cancer patients were greatly over-expressed when compared with the mean of healthy controls, consistent with the increase in protein spot intensity observed in the 2-DE gels. The expression levels of GM2AP in urine were subsequently detected by Western blot analysis and quantified

using ELISA. The present study also showed significantly higher urinary GM2AP level in patients (n= 48) compared to healthy controls (n = 44). However, the results remained unclear because the urine samples were from lung cancer patients, who had received anticancer treatments, and the amounts of urine samples from lung cancer patients were limited. Therefore, we have further confirmed the expression of GM2AP level in a large group of lung cancer patients using urine (n =133) and serum (n = 133) specimens, who have not received anticancer treatments. Levels of GM2AP were 8.11 ± 1.36 fold increases in urine and 5.41 ± 0.73 fold increases in serum of lung cancer patients when compared to those in healthy controls ($P < 0.0001$). The urinary GM2AP possessed an area under curve (AUC) value at 0.89 with sensitivity of 88.46% and a specificity of 85.71%. The serum GM2AP showed an AUC value at 0.90 with sensitivity of 100% and a specificity of 82.7%. Therefore, the expression of GM2AP in urine or serum has high accuracy as a diagnostic marker for lung cancer. Levels of GM2AP in urine and serum of lung cancer patients were significantly correlated with pathology stage (urine, $P = 0.009$; serum, $P < 0.001$). Using immunohistochemistry, the expression of GM2AP was found at 83.9% (122/143) of non- small cell lung cancer (NSCLC) patients and absence in normal tissue. The GM2AP expression was significantly correlated with pathology stage ($P = 0.0001$). Patients with higher GM2AP expression had shorter overall survival ($P = 0.045$) and disease-free survival ($P = 0.049$) than those with lower GM2AP expression, as assessed by the Kaplan-Meier method. Moreover, the multivariate analysis revealed that the stage (hazard ratio 0.335 [95% CI, 0.163-0.689]; $P = 0.003$) and the GM2AP score (hazard ratio 0.475 [95% CI, 0.250-0.906]; $P = 0.024$) were significant independent predictors of the disease free-survival. Stage (hazard ratio 0.364 [95% CI, 0.216-0.612]; $P < 0.001$) and the score (hazard ratio 0.563 [95% CI, 0.349-0.910]; $P = 0.019$) were also significant independent predictors for overall survival. In addition, NanoLC-MS/MS provided evidence of an increase of GM2AP with the glycan structure identification from doublely charged ion at m/z 1202.1025 corresponding to the structure of $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_2(\text{Fuc})_1$ linked with peptide (PIIVPGNVTL SVVG). All data supported that GM2AP level in urine and serum can be useful diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer.

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของจีเอ็มทูแอกติเวเตอร์โปรตีนเพื่อเป็นตัวบ่งชี้สำหรับ
โรคมะเร็งปอด

ผู้เขียน นางสาวลัดดาวัลย์ พจน์พรหมมณี

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ.ดร. ลลิตา	แซงค์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ.ดร. ดุษฎีเทียน	เงิน	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. พัทธณี	แสงทอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.พญ. นุชยามาส	ชีวิตกุลยง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งปอดเป็นสาเหตุหนึ่งของการตายของโรคมะเร็งทั่วโลก การค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับการวินิจฉัยในระยะแรกจึงเป็นประโยชน์สำหรับการรักษาโรคร้ายนี้ ในรายงานก่อนหน้านี้นี้รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดและคนสุขภาพดีถูกนำมาเปรียบเทียบโดยใช้การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ด้วยเจลสองมิติ พบว่าจีเอ็มทูแอกติเวเตอร์โปรตีน (GM2AP) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีระดับสูงกว่าในคนสุขภาพดี 2.5-4.0 เท่า ดังนั้น GM2AP จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับเนื้องอกที่เกี่ยวข้องกับแองกลิโอไซต์ที่พบในการดำเนินของโรคมะเร็ง จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือการตรวจสอบและยืนยันศักยภาพของ GM2AP เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็งปอด การศึกษาเริ่มจากการประยุกต์ใช้วิธีการทางโปรตีโอมิกส์ในการตรวจสอบระดับการเพิ่มขึ้นของ GM2AP ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี จากผลการศึกษาพบว่าระดับ GM2AP ในซัพไทป์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีการแสดงออกสูงมากเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยของคนที่มีสุขภาพดีซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของจุดโปรตีนที่สังเกตนบนแผ่นเจลอิเล็กโตรโฟเร-

ซีสแบบสองมิติ จากนั้นระดับการแสดงออกของระดับ GM2AP ในปัสสาวะได้ถูกตรวจวัดด้วยเทคนิค Western blot analysis และหาปริมาณ GM2AP ด้วยเทคนิค ELISA การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นระดับ GM2AP ในปัสสาวะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยมะเร็งปอด ($n = 48$) เมื่อเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี ($n = 44$) อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยังคงไม่มีความชัดเจนเนื่องจากตัวอย่างปัสสาวะมาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดที่ได้รับการรักษามะเร็ง และปริมาณตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดมีจำกัด ดังนั้นจึงยืนยันการแสดงออกของระดับ GM2AP ในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดโดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะ ($n = 133$) และซีรัม ($n = 133$) ของผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา ระดับการแสดงออกของ GM2AP เพิ่มขึ้นในปัสสาวะ 8.11 ± 1.36 เท่าและเพิ่มขึ้น 5.41 ± 0.73 เท่าในซีรัมในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดเมื่อเทียบกับคนสุขภาพดี ($P < 0.0001$) GM2AP ในปัสสาวะมีค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง 0.89 โดยมีความไว 88.46% และความจำเพาะ 85.71% GM2AP ในซีรัมแสดงค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง 0.90 ซึ่งมีความไว 100% และความจำเพาะ 82.71% ดังนั้นการแสดงออกของ GM2AP ในปัสสาวะหรือซีรัมที่มีความถูกต้องสูงถือเป็นตัวบ่งชี้การวินิจฉัยสำหรับโรคมะเร็งปอด ระดับ GM2AP ในปัสสาวะและซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งปอดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับระยะพยาธิวิทยา (ปัสสาวะ, $P = 0.009$; ซีรัม, $P < 0.0001$) จากการใช้ภูมิโนพยาธิวิทยา การแสดงออกของ GM2AP พบที่ 83.9% ($122/143$) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) และไม่พบในเนื้อเยื่อปกติ การแสดงออกของ GM2AP มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับระยะพยาธิวิทยา ($P = 0.0001$) ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ GM2AP ที่สูงมีอัตราการรอดชีวิต ($P = 0.045$) และระยะปลอดโรค ($P = 0.049$) ที่สั้นมากกว่าผู้ที่มีการแสดงออกของ GM2AP ที่ต่ำซึ่งได้ใช้การประเมินโดยวิธี Kaplan - Meier นอกจากนี้การวิเคราะห์ตัวแปรเชิงพหุพบว่าระยะ (hazard ratio 0.335 [95% CI, $0.163-0.689$]; $P = 0.003$) และคะแนนของ GM2AP (hazard ratio 0.475 [95% CI, $0.250-0.906$]; $P = 0.024$) มีนัยสำคัญของการพยากรณ์ที่เป็นอิสระจากระยะปลอดโรค ระยะ (hazard ratio 0.364 [95% CI, $0.216-0.612$]; $P < 0.001$) และคะแนน (hazard ratio 0.563 [95% CI, $0.349-0.910$]; $P = 0.019$) มีการพยากรณ์ที่เป็นอิสระอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการอยู่รอดด้วย นอกจากนี้ NanoLC-MS/MS บ่งบอกการเพิ่มขึ้นของ GM2AP ซึ่งมีการระบุโครงสร้างไกลแคนจากไอออนประจุคู่ที่ m/z 1202.1025 สอดคล้องกับโครงสร้างของ $(Hex)_3(HexNAc)_2(Fuc)_1$ เชื่อมโยงกับเปปไทด์ PIIVPGNVTLSSVVG ดังนั้นระดับ GM2AP ในปัสสาวะและซีรัมอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการวินิจฉัยและตัวบ่งชี้การพยากรณ์ที่มีประโยชน์สำหรับโรคมะเร็งปอด