

รายงานการวิจัย

การศึกษาหาพยาธิกำเนิด และตัวชี้วัดชีวภาพใหม่ของมะเร็งตับโดยใช้
เซลล์ต้นกำเนิดชนิดพหุศักยภาพ

(The study of pathogenesis and identification of new
biomarker for liver cancer using pluripotent stem cell model)

ผศ.นพ.ดร. นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ ออยุธยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง “การศึกษาหาพยาธิกำเนิด และตัวชี้วัดชีวภาพใหม่ของมะเร็งตับโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดพหุศักยภาพ” เป็นโครงการซึ่งได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อต่อยอดงานวิจัยทางด้านเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และการนำไปใช้เพื่อการรักษา

งานวิจัยนี้จะสำเร็จ ลุล่วงไปไม่ได้ ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนจาก
ศาสตราจารย์ บัณฑิต เอื้ออาภรณ์ อธิการบดี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์ นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม รองอธิการบดี กำกับดูแลด้านการวิจัย พัฒนา และนวัตกรรม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ รองคณบดีฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ขอขอบคุณบุคลากรหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด และเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุน ทางด้านงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นหนึ่งในมะเร็งตับชนิดที่พบบ่อยเป็นอันดับสอง ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดี อย่างไรก็ตามการพยากรณ์โรคของมะเร็งท่อน้ำดีทำได้ไม่ดีนัก เนื่องจากจะตรวจพบเมื่อมะเร็งมีการพัฒนาไปในระยะรุนแรง แม้ว่าคนไข้จะได้รับการรักษาด้วยการฉายแสงหรือเคมีบำบัด ผู้ป่วยส่วนมากจะมีการกลับมาเป็นซ้ำของโรค การพัฒนาการรักษาใหม่ที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพ จำเป็นจะต้องมีการเข้าใจกลไกและการเกิดกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี แต่ในปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าอะไรเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดการพัฒนามะเร็งท่อน้ำดี

ในการศึกษานี้ เราจึงทำการสร้างเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดีจากเซลล์ต้นกำเนิดพหุศักยภาพที่ได้จากการเหนี่ยวนำ ซึ่งจะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดี เช่น SMAD4 และ TP53 โดยใช้เทคนิค CRIPR-Cas9 เพื่อสร้าง model สำหรับใช้ในการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาที่ได้จะช่วยทำให้สามารถเข้าใจกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้มากขึ้น และนำไปสู่การหาและพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is the second most common primary liver cancer that arise from bile duct epithelial cells. However, the prognosis of CCA is poor due to detection at advanced stage. Moreover, the disease relapse was usually found after treatment. The understanding of molecular biology provides crucial pathway mutation required for develop the targeted therapeutic strategy. But the mechanism of crucial mutation drive cholangiocarcinoma remains largely unknown.

In this study, we derived cholangiocyte organoid from human induced pluripotent stem cells and engineered them by introduced mutation of related gene, such as *SMAD4* and *TP53* using CRISPR-CAS9 in order to obtain unique tools for cholangiocarcinoma development. It will be given the understanding mechanism of cholangiocarcinogenesis and useful for drug development and advance therapy in future.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	1
บทคัดย่อ.....	2
Abstract	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญภาพ	5
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	6
บทนำ.....	7
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	11
การสร้าง Cholangiocyte progenitors จาก human induced pluripotent stem cells (human iPSCs)	11
การสร้าง inducible SMAD4-Knockout iPSCs	15
อภิปรายผลการทดลอง.....	17
บรรณานุกรม	18
ประวัตินักวิจัย และคณะ.....	20

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	Endoderm and foregut differentiation	12
ภาพที่ 2	Hepatoblast และ Cholangiocyte differentiation.....	14
ภาพที่ 3	Cholangiocyte like cells (CLCs)	14
ภาพที่ 4	Gene Expression analysis	14
ภาพที่ 5	inducible SMAD4-Knockout iPSCs.....	15
ภาพที่ 6	Inducible SMAD4-knockout iPSCs Genomic analysis	16
ภาพที่ 7	Inducible Cas9 mRNA expression analysis.....	17

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

iPSCs induced pluripotent stem cells

CLCs Cholangiocyte like cells

บทนำ

มะเร็งตับ และมะเร็งท่อน้ำดีเป็นสาเหตุการเสียชีวิตจากมะเร็งอันดับหนึ่งของประชากรไทย เนื่องจากใช้วิธีคัดกรองปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ทำให้ผู้ป่วยมักได้รับการวินิจฉัยในระยะท้ายของโรค ประกอบกับเคมีบำบัดที่มียังไม่มียาที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับทั้งสองชนิด ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่สามารถรักษาให้หายขาด และเสียชีวิตในที่สุด การศึกษาพยาธิกำเนิดของมะเร็งตับมีความสำคัญยิ่งต่อการนำสู่การคัดกรอง และวิธีการรักษาที่ได้ผล ทฤษฎีกลไกการเกิดมะเร็งตับระยะหลังเปลี่ยนแปลงไปจากอดีตไม่น้อย จากการค้นพบว่าเซลล์ตับ และเซลล์ท่อน้ำดีมีการปรับสภาพเข้าสู่เซลล์ต้นกำเนิดได้เมื่อเกิดการบาดเจ็บ นำไปสู่ งานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงความซับซ้อน และความสำคัญของความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ต่างชนิดในตับ และปัจจัยภายนอกในการเกิดมะเร็ง และลุกลาม ซึ่งวิธีการศึกษาด้วยเซลล์มะเร็ง (Cancer cell line) ที่มีอยู่ก่อน ไม่สามารถใช้ตอบปัญหาได้

ด้วยเทคโนโลยีสเต็มเซลล์ชนิดพหุศักยภาพ (pluripotent stem cells) ทั้ง embryonic stem cells และ induced pluripotent stem cells ประกอบกับเทคนิคที่ก้าวหน้าด้านการแก้ไขพันธุกรรม และโปรตีนโอเมก้า ทำให้เกิดโอกาสใหม่ในการทำการศึกษากลไกของโรค และหาตัวชี้วัดชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ตรวจผู้ป่วยในระยะเริ่มต้น โดยโครงการนี้มุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการนำ pluripotent stem cells มาใช้สร้างเซลล์ตับ เซลล์ท่อน้ำดี รวมทั้งเซลล์ต้นกำเนิดตับ และท่อน้ำดี ที่ดัดแปลงพันธุกรรมเลียนแบบขั้นตอนการเกิดมะเร็งระยะแรกจำนวนมากในหลอดทดลอง ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ต่างชนิดในขั้นตอนการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะเซลล์ตับ เซลล์ท่อน้ำดี และเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (stromal cells) วิเคราะห์หาสารใน exosome จากเซลล์ชนิดต่างๆ ที่สามารถใช้ติดตามพยากรณ์โรค โปรตีนที่ผิวเซลล์ เพื่อนำไปพัฒนาสร้างเป็นแอนติบอดีสำหรับวินิจฉัย และรักษา ไปจนถึงใช้เป็นโมเดลในการพัฒนายาใหม่ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

Differentiation of hiPSCs into Cholangiocyte progenitors

1. ทำการเพาะเลี้ยง hiPSCs ให้มีความหนาแน่นประมาณ 80% confluent
2. Day 0: ทำการล้างเซลล์ด้วย 1XPBS แล้วทำการย้าย hiPSC colony ให้เป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กโดยใช้ CTK solution ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. ทำการล้างเซลล์ด้วย 1XPBS จำนวน 2 ครั้ง และทำการพ่น hiPSC colony ด้วย mTeSR1 media ให้ได้เป็น colony ขนาดเล็ก แล้วทำการเพาะเลี้ยงใน mTeSR1 media ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂
4. Day 1: ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเพาะเลี้ยงต่อใน mTeSR1 media ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂
5. Day 2: เหนี่ยวนำให้ hiPSC เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Endoderm โดยทำการเพาะเลี้ยง CDM-PVA ที่ประกอบด้วย Activin-A (100ng/mL), bFGF (100ng/mL), BMP-4 (10ng/mL), LY294002 (10 μ M), CHIR99021 (3 μ M) ทำการเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂
6. Day 3: เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น CDM-PVA ที่ประกอบด้วย Activin-A (100ng/mL), bFGF (100ng/mL), BMP-4 (10ng/mL), LY294002 (10 μ M) ทำการเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂
7. Day 4: เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น RPMI-B27 medium ที่ประกอบด้วย Activin-A (100ng/mL), bFGF (100ng/mL) ทำการเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂
8. Day 5-7: เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Anterior Definitive Endoderm (ADE) โดยทำการเพาะเลี้ยงใน RPMI-B27 differentiation medium with ที่ประกอบด้วย Activin-A (50 ng/ml) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 24 ชั่วโมง
9. Day 8: ทำการเพาะเลี้ยง DE cells ใน RPMI+B27 medium ที่ประกอบด้วย activin-A (50 ng/ml) เป็นเวลา 3-4 days เพื่อสร้าง foregut cells.
10. Day 12: ทำการเพาะเลี้ยง foregut progenitor ใน RPMI+B27 medium ที่ประกอบด้วย SB-431542 (10 μ M) และ BMP4 (50 ng/ml) เป็นเวลา 4 วัน เพื่อสร้าง Bipotent hepatoblast
11. Day 16: เหนี่ยวนำให้ hepatoblast เกิด biliary specification โดยทำการเพาะเลี้ยง hepatoblast ใน RPMI+B27 medium ที่ประกอบด้วย FGF10 (50ng/ml), Activin A (50ng/ml) และ retinoic acid (3 μ M) เป็นเวลา 4 วัน

Maturation of Cholangiocyte progenitor cells to CLCs

1. ทำการย่อย Cholangiocyte progenitor ให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้ Cell dissociation buffer
2. suspended ที่ความเข้มข้น 8×10^4 cells/ml ใน 40% Matrigel + 60% William's E medium ที่ประกอบด้วย 10 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich), 17 mM sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich), 0.2 mM 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma-Aldrich), 6.3 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 14 mM glucose (Sigma-Aldrich), 20 mM HEPES (Invitrogen), ITS+ premix (BD Biosciences), 0.1 μ M dexamethasone (R&D Systems), 2 mM Glutamax (Invitrogen), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin และ 20 ng/ml EGF (R&D Systems)
3. ทำการ drop 50- μ L droplet ของ cell suspension ลงใน center ของ well ใน 24-well plate
4. ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็ง และทำการปิดทับหน้าเจลด้วย William's E medium
5. ทำการเปลี่ยน media ทุกๆ 48 ชั่วโมง และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

Stromal cells overexpressing specific gene

1. ทำการสร้าง overexpression vector ที่มี coding sequence ของ specific gene ที่สนใจใน inducible PiggyBac vector (PBQM812A-1) แล้วทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ DNA ด้วย DNA sequencing
2. Day 0: ทำการเพาะเลี้ยง 1×10^6 Stromal cells ลงใน 6 well plate
3. Day 1: เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการ transfect cells โดย ใส่ transfection complex และทำการเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. Day 2: เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์
5. Day 3: ทำการย่อยเซลล์โดยใช้ 0.25% Trypsin-EDTA เป็นเวลา 2 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์
6. ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

7. ทำการ resuspend cells ที่ได้ และทำการเพาะเลี้ยงใน 100 mm dish ที่ความหนาแน่น 20% confluence ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติม puromycin สำหรับคัดเลือกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ gene ที่ต้องการ ทำการเพาะเลี้ยงจนได้โคโลนีขนาดใหญ่เพียงพอ
8. ทำการแยก single colony เพิ่มจำนวน และทดสอบการแสดงออกของ gene ในแต่ละโคลน โดยการใช้ cumate เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการ

Immunohistochemistry, Immunofluorescence, and Image Analysis

1. ทำการ fix Liver organoids ข้ามคืนด้วย 4% PFA จากนั้นทำการล้าง และย้ายลงใน tissue cassata และ paprafilm blocks และทำการตัด Tissue sections ขนาด 4 μ M สำหรับ cell culture ทำการ fix ด้วย 4% PFA เป็นเวลา 15 นาที permeabilize ด้วย 0.3% Triton X-100 15 นาที
2. จากนั้นทำการ Block ด้วย 10% goat serum เป็นเวลา 45 นาที และ immunofluorescence ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อ hepatoblasts, cholangiocytes hepatocytes
3. ทำการย้อม Nuclei ด้วย DAPI และทำการถ่ายภาพด้วยกล้อง Fluorescence microscope

RT-PCR and qPCR Analysis

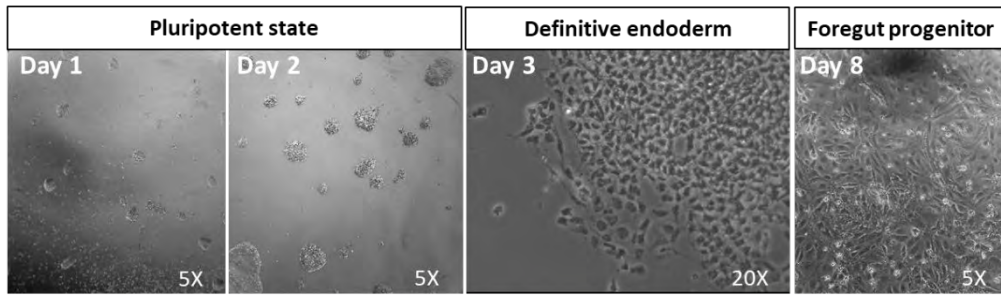
1. ทำการสกัด RNA โดยใช้ Tri reagent
2. ทำ Reverse transcription ด้วย Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase เพื่อสร้าง cDNA
3. และทำการ amplified gene ที่สนใจโดยใช้ gene specific primers และ SYBR Green ด้วยเครื่อง ABI 7500 และวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

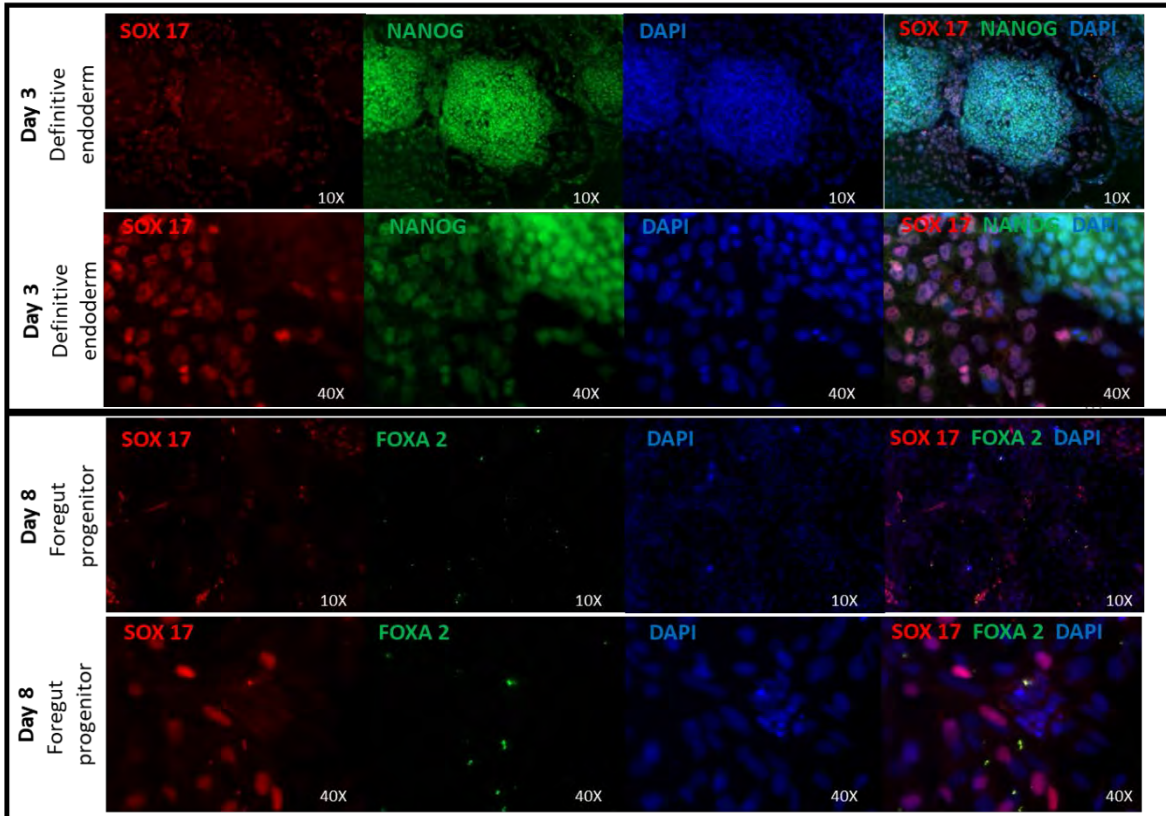
การสร้าง Cholangiocyte progenitors จาก human induced pluripotent stem cells (human iPSCs)

เพื่อทำการสร้าง iPSC derived Cholangiocytes ทางผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยง iPSC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CDM- PVA ที่ประกอบด้วย Activin-A, bFGF, BMP-4, LY294002, CHIR99021 เพื่อเหนี่ยวนำให้ iPSC เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Definitive endoderm หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ SOX17 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกใน Endodermal cells และเมื่อทำการดูการแสดงออกของ FOXA2 ในวันที่ 8 ของการ differentiation พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น foregut progenitor (ภาพที่ 1A และ 1B) เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Bipotent hepatoblast โดยการกระตุ้นด้วย BMP4 พบว่าเซลล์ในวันที่ 12 ของการ differentiation จะมีการแสดงออกของ HNF4a และเมื่อเหนี่ยวนำให้ hepatoblast เกิด biliary specification โดยทำการเพาะเลี้ยง hepatoblast ใน RPMI+B27 medium ที่ประกอบด้วย FGF10, Activin A และ retinoic acid ในวันที่ 17 เซลล์จะมีการแสดงออกของ CK19 และ SOX9 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกใน Cholangiocyte progenitors และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง cholangiocyte progenitors ใน 3D culture เพื่อสร้าง Cholangiocyte like cells พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงใน 3D culture condition เซลล์จะมีการสร้างโครงสร้างเป็นลักษณะถุง เช่นเดียวกับ Cholangiocyte organoids ที่เพาะเลี้ยงได้จากชิ้นเนื้อของคนปกติ (ภาพที่ 2A, 2B และ ภาพที่ 3) ซึ่ง Cholangiocyte like cells ที่สร้างได้จะมีการแสดงออกของ somatostatin receptor (SSTR) subtype 2 (SSTR2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Bile duct secretion (ภาพที่ 4)

A.



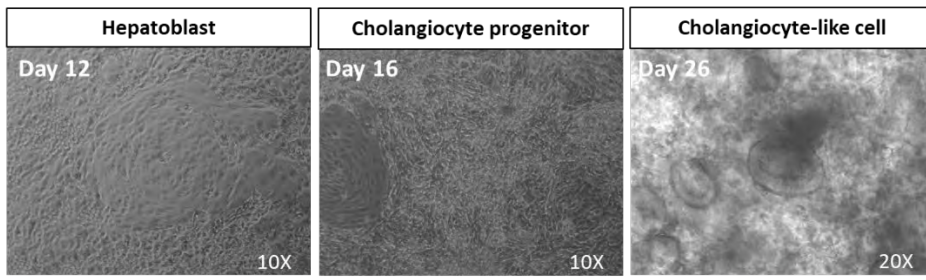
B.



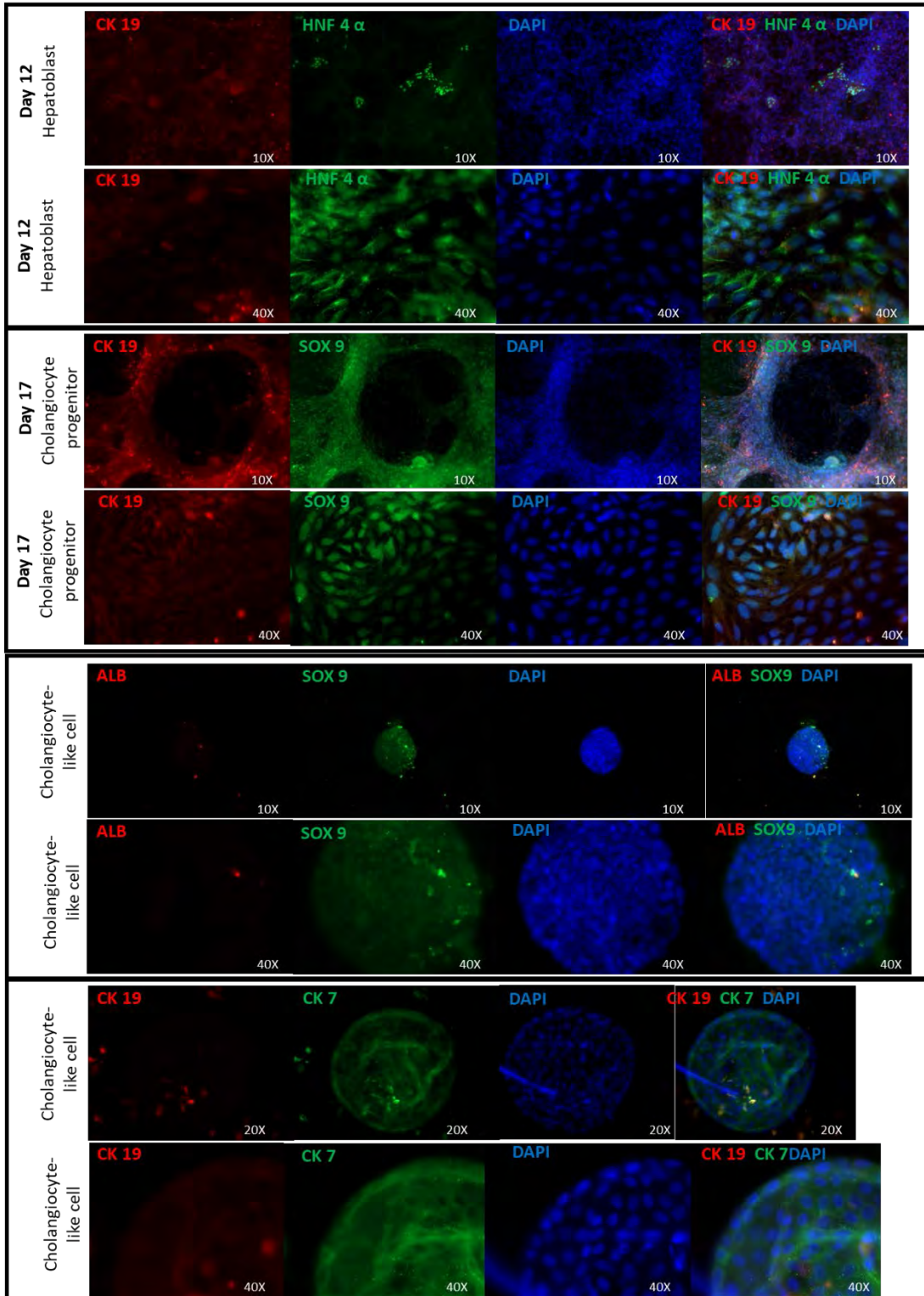
ภาพที่ 1 Endoderm and foregut differentiation

A. แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ iPSCs ไปเป็น Endoderm cells และ foregut cells ที่วันที่ 3 และ วันที่ 8 ของ Cholangiocyte differentiation เมื่อทำการศึกษาด้วยกล้อง inverted microscope B. แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนใน Endoderm cells และ foregut cells ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining

A.

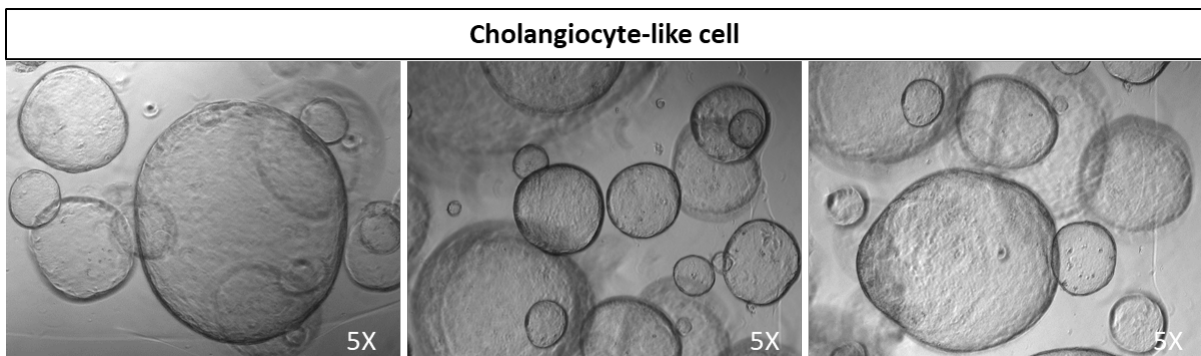


B.



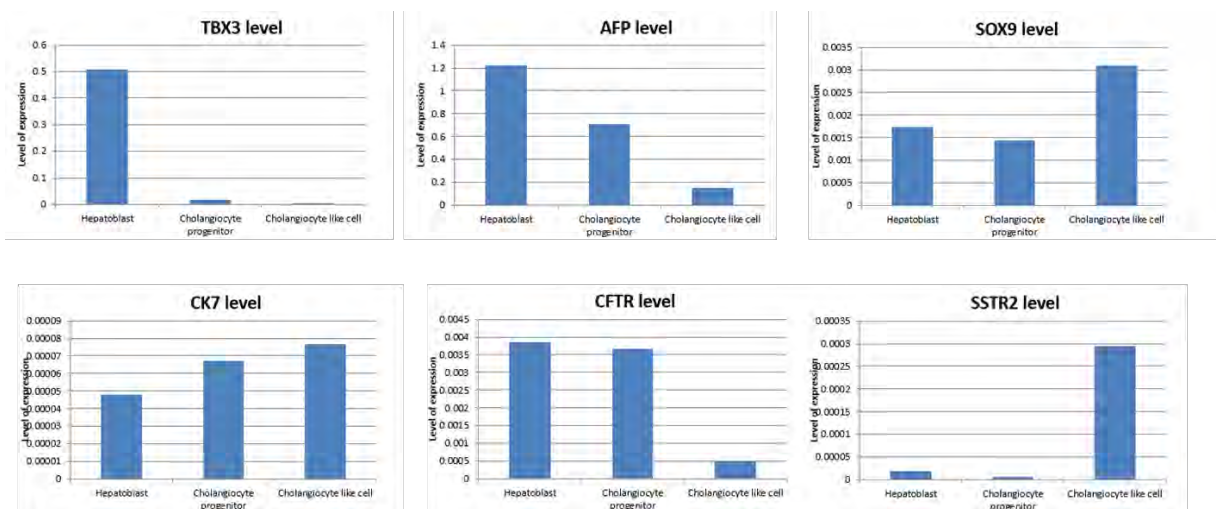
ภาพที่ 2 Hepatoblast และ Cholangiocyte differentiation

A. แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ iPSCs ไปเป็น Hepatoblast, Cholangiocyte progenitors และ Cholangiocyte like cells ที่วันที่ 12, 16 และวันที่ 26 ของ Cholangiocyte differentiation เมื่อทำการศึกษาด้วยกล้อง inverted microscope B. แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนใน Hepatoblast, Cholangiocyte progenitors และ Cholangiocyte like cells ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining



ภาพที่ 3 Cholangiocyte like cells (CLCs)

แสดงลักษณะของ Cholangiocyte like cells เมื่อทำการศึกษาด้วยกล้อง inverted microscope

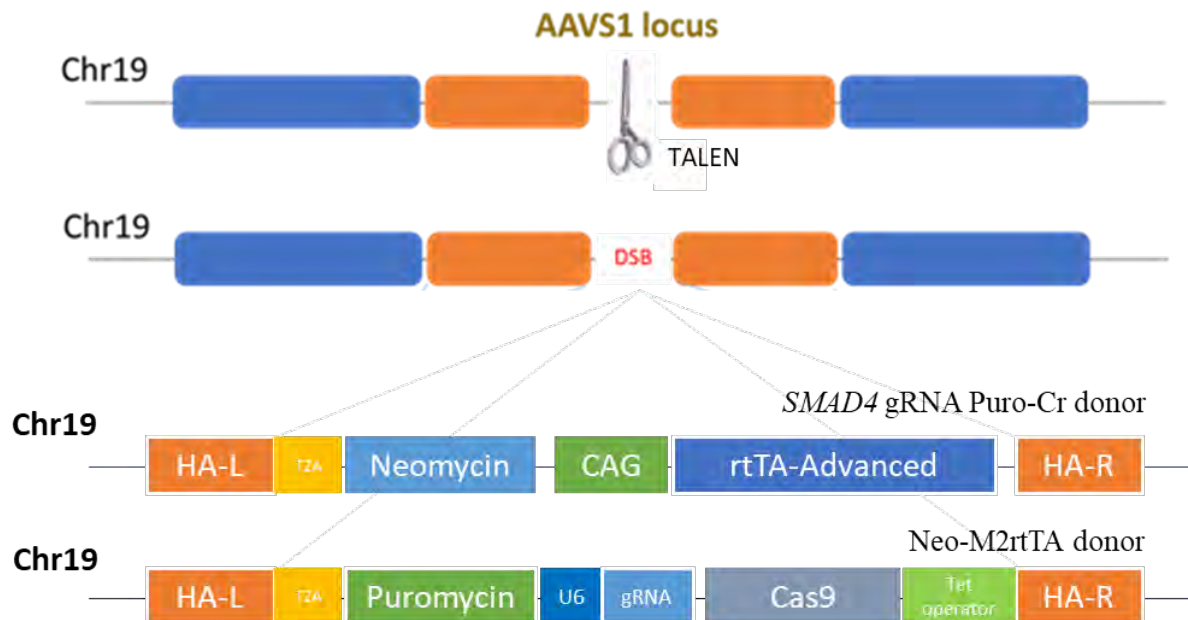


ภาพที่ 4 Gene Expression analysis

แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Cholangiocyte differentiation เมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค Real-time PCR

การสร้าง inducible SMAD4-Knockout iPSCs

เพื่อศึกษาถึงผลของการเกิด SMAD4 mutation ต่อการเกิด Cholangiocarcinoma ทางผู้วิจัยได้ทำการสร้าง inducible SMAD4-Knockout iPSCs โดยใช้เทคนิค Genome editing ด้วย Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) (ภาพที่ 5)

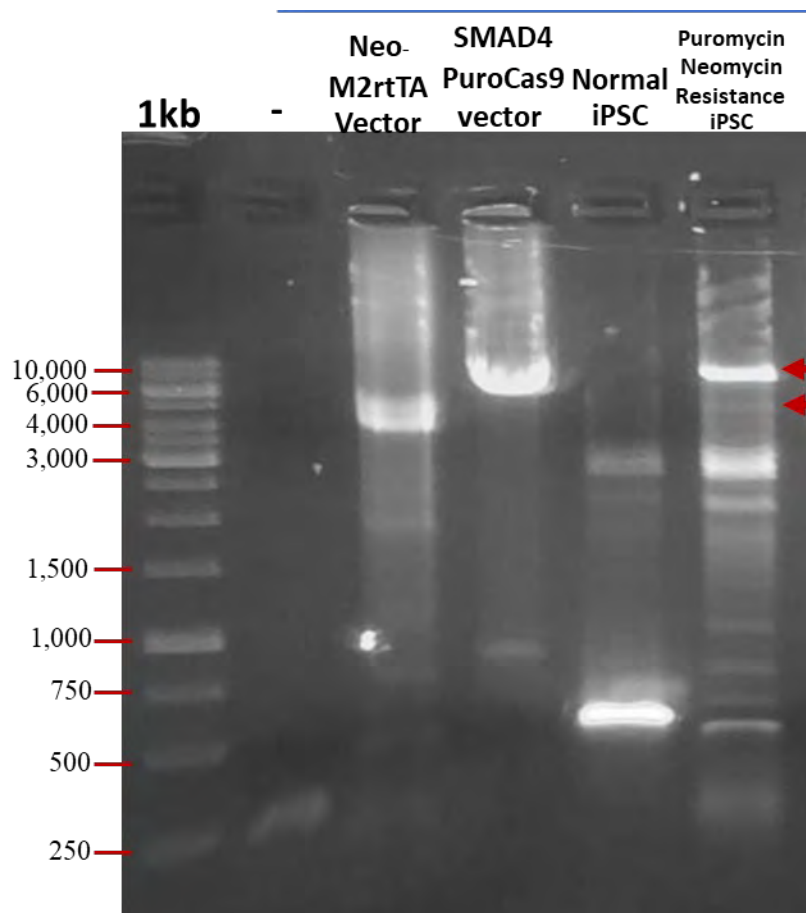


ภาพที่ 5 inducible SMAD4-Knockout iPSCs

แสดงขั้นตอนการสร้าง inducible SMAD4-Knockout iPSCs โดยใช้เทคนิค Genome editing ด้วย Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)

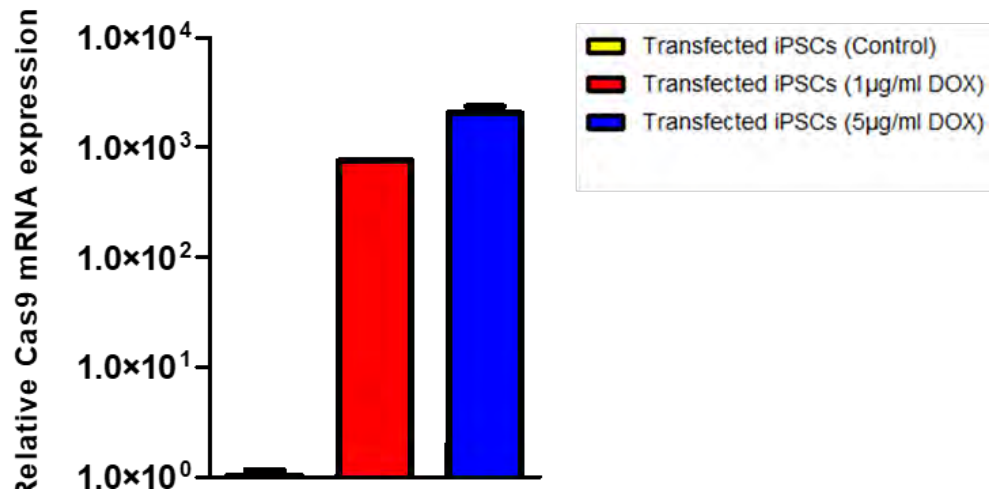
โดยหลังจากทำการนำส่ง TALEN vector, SMAD4 gRNA Puro-Cr donor vector และ Neo-M2rtTA donor vector เข้าสู่ iPSCs ด้วยเทคนิค nucleofector ได้ทำการคัดเลือก inducible SMAD4-Knockout iPSCs โดยใช้ Puromycin และ Neomycin เพื่อคัดเลือก Puromycin-Neomycin resistance iPSCs clone ซึ่งจะเป็นการคัดเลือก iPSC clone ที่มีการแทรกตัวของ SMAD4 gRNA Puro-Cr donor vector และ Neo-M2rtTA donor vector ซึ่งจากผลการทดลองสามารถทำการคัดเลือก Puromycin-Neomycin resistance iPSCs clone ได้ทั้งหมด 5 Clones และเมื่อทดสอบการแทรกตัวของ SMAD4 gRNA Puro-Cr donor vector และ Neo-M2rtTA donor vector ที่ตำแหน่ง AAVS1 site ด้วยเทคนิค PCR พบว่า inducible SMAD4-Knockout iPSCs ที่คัดเลือกมา มีการแทรกตัวของ SMAD4 gRNA Puro-Cr donor vector ขนาด 6861 bp และ Neo-M2rtTA donor vector ขนาด 4941 bp อยู่ในตำแหน่ง AAVS1 site ทั้งสองข้างของ Chromosome 19 (ภาพที่ 6)

เพื่อทดสอบว่า inducible SMAD4-Knockout iPSCs สามารถควบคุมการแสดงออกของ Cas9 protein ในลักษณะ inducible ด้วย Doxycycline ได้หรือไม่ ทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ โดยการใช้ Doxycycline เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วทำการทดสอบการแสดงออกของ Cas9 mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ในสถานะที่มีการเติม 1 ug/ml และ 5 ug/ml Doxycycline จะเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Cas9 มากขึ้นเป็น 756 เท่า และ 2050 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีการเติม Doxycycline (ภาพที่ 7) แสดงให้เห็นว่า inducible SMAD4-Knockout iPSCs ที่สร้างได้สามารถควบคุมให้เกิด Genome editing ได้ในสถานะที่ต้องการได้โดยการเติม Doxycycline เพื่อให้เกิดการสร้าง Cas9 protein และ gRNA ที่จำเพาะต่อ SMAD4 gene ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนแปลง inducible SMAD4-Knockout iPSCs ไปเป็น Hepatoblast, Cholangiocyte progenitors และ Choangiocyte like cells และทำการศึกษาถึงผลของ SMAD4 mutation ในเซลล์แต่ละชนิดว่าส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงต่อคุณสมบัติของเซลล์อย่างไร



ภาพที่ 6 Inducible SMAD4-knockout iPSCs Genomic analysis

แสดงผลการวิเคราะห์การแทรกตัวของ SMAD4 gRNA Puro-Cr donor vector และ Neo-M2rtTA donor vector ที่ตำแหน่ง AAVS1 site ด้วยเทคนิค PCR



ภาพที่ 7 Inducible Cas9 mRNA expression analysis

แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ Cas9 mRNA ใน inducible SMAD4-Knockout iPSCs ในสถานะที่มีการเติม 1ug/ml, 5 ug/ml Doxycycline เปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีการเติม Doxycycline เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการสร้าง Cholangiocytes จาก human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) ทางผู้วิจัยสามารถสร้าง Cholangiocyte like cells (CLCs) ได้สำเร็จ ซึ่งการเกิดการเปลี่ยนของ hiPSCs ไปเป็น CLCs ในหลอดทดลอง เกิดขึ้นเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นใน development คือมีการเปลี่ยนแปลงจาก pluripotent state ไปสู่ definitive endoderm ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นของการสร้าง gastrointestinal tract แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงไป foregut progenitor ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างอวัยวะของทางเดินอาหารส่วนต้นซึ่งรวมไปถึง Liver (hepatocytes และ cholangiocytes) ก่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Hepatoblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง hepatocytes และ Cholangiocytes และเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Cholangiocytes progenitor และ Cholangiocyte like cells ซึ่ง Cholangiocyte like cells ที่สร้างได้สามารถทำงานได้เหมือน Cholangiocytes คือ มีการแสดงออกของ SSTR2 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Bile duct secretion

ในส่วนของการศึกษาผลของการเกิด mutation ของยีน SMAD4 ต่อการเกิด Cholangiocarcinoma ทางผู้วิจัยได้สร้าง inducible SMAD4-Knockout iPSCs อยู่ระหว่างการศึกษาถึงผลของการเกิด SMAD4 mutation ในเซลล์แต่ละชนิด คือ Hepatoblast, Cholangiocyte progenitors และ Cholangiocyte like cells ที่สร้างจาก inducible SMAD4-Knockout iPSCs ว่าส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงต่อคุณสมบัติของเซลล์อย่างไร

บรรณานุกรม

1. Andersen, J. B., B. Spee, et al. (2012). "Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors." Gastroenterology 142(4): 1021-1031 e1015.
2. Boulter, L., O. Govaere, et al. (2012). "Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease." Nat Med 18(4): 572-579.
3. Chan-On, W., M. L. Nairismagi, et al. (2013). "Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers." Nat Genet 45(12): 1474-1478.
4. Fattovich, G., T. Stroffolini, et al. (2004). "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors." Gastroenterology 127(5 Suppl 1): S35-50.
5. Fontana, S., L. Saieva, et al. (2013). "Contribution of proteomics to understanding the role of tumor-derived exosomes in cancer progression: state of the art and new perspectives." Proteomics 13(10-11): 1581-1594.
6. Forner, A., J. M. Llovet, et al. (2012). "Hepatocellular carcinoma." Lancet 379(9822): 1245-1255.
7. Giannelli, G., B. Rani, et al. (2014). "Moving towards personalised therapy in patients with hepatocellular carcinoma: the role of the microenvironment." Gut 63(10): 1668-1676.
8. Hernandez-Gea, V., S. Toffanin, et al. (2013). "Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma." Gastroenterology 144(3): 512-527.
9. Huch, M., H. Gehart, et al. (2015). "Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver." Cell 160(1-2): 299-312.
10. Kamiya, A. and H. Chikada (2015). "Human pluripotent stem cell-derived cholangiocytes: current status and future applications." Curr Opin Gastroenterol 31(3): 233-238.
11. Llovet, J. M., A. Villanueva, et al. (2015). "Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era." Nat Rev Clin Oncol 12(8): 436.
12. Melo, S. A., L. B. Luecke, et al. (2015). "Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer." Nature 523(7559): 177-182.

13. Ng, S., R. E. Schwartz, et al. (2015). "Human iPSC-derived hepatocyte-like cells support Plasmodium liver-stage infection in vitro." Stem Cell Reports 4(3): 348-359.
14. O'Driscoll, L. (2015). "Expanding on exosomes and ectosomes in cancer." N Engl J Med 372(24): 2359-2362.
15. Ong, C. K., C. Subimerb, et al. (2012). "Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma." Nat Genet 44(6): 690-693.
16. Razumilava, N. and G. J. Gores (2014). "Cholangiocarcinoma." Lancet 383(9935): 2168-2179.
17. Sampaziotis, F., M. Cardoso de Brito, et al. (2015). "Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation." Nat Biotechnol 33(8): 845-852.
18. Sampaziotis, F., C. P. Segeritz, et al. (2015). "Potential of human induced pluripotent stem cells in studies of liver disease." Hepatology 62(1): 303-311.
19. Sia, D., V. Tovar, et al. (2013). "Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies." Oncogene 32(41): 4861-4870.
20. Siller, R., S. Greenhough, et al. (2015). "Small-molecule-driven hepatocyte differentiation of human pluripotent stem cells." Stem Cell Reports 4(5): 939-952.
21. Sithithaworn, P., P. Yongvanit, et al. (2014). "Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma." J Hepatobiliary Pancreat Sci 21(5): 301-308.
22. Takebe, T., K. Sekine, et al. (2013). "Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant." Nature 499(7459): 481-484.
23. Tarlow, B. D., C. Pelz, et al. (2014). "Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes." Cell Stem Cell 15(5): 605-618.
24. Thompson, A. I., K. P. Conroy, et al. (2015). "Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis." BMC Gastroenterol 15: 63.
25. Villanueva, A. and J. M. Llovet (2011). "Targeted therapies for hepatocellular carcinoma." Gastroenterology 140(5): 1410-1426.
26. Webber, J., V. Yeung, et al. (2015). "Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment." Semin Cell Dev Biol 40: 27-34.
27. Yanagida, A., H. Nakauchi, et al. (2015). "Generation and In Vitro Expansion of Hepatic Progenitor Cells from Human iPS Cells." Methods Mol Biol.

ประวัตินักวิจัย และคณะ

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ.นพ.ดร. นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Nipan Israsena MD., Ph.D.

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1008 00589 93 2

3. ตำแหน่งปัจจุบันผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคาร อ.ป.ร. ชั้น 9

ถนน ราชดำริ ลุมพินี ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 80838

โทรสาร 02-251-1965

Email nipan.i@chula.ac.th, inipan@gmail.com

3. ประวัติการศึกษา

1989- 1995 MD ChulalongkornUniversityHospital, Bangkok, Thailand

1995- 1996 Neurology Fellow ChulalongkornUniversityHospital, Bangkok, Thailand

1997- 2003 PhD Neuroscience, AlbertEinsteinCollege of Medicine New York, USA
Northwestern University, Chicago, USA (research fellow)

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Neuroscience – Neural and embryonic stem cell biology

5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ
ทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

a. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

b. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1: Israsena N, Mahavihakanont A, Hemachudha T. Rabies virus infection and microRNAs. *Adv Virus Res.* 2011;79:329-44. Review. PubMed PMID: 21601053.

2: Jalali A, Bassuk AG, Kan L, Israsena N, Mukhopadhyay A, McGuire T, Kessler JA. HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2011 Mar;89(3):299-309. doi: 10.1002/jnr.22562. Epub 2011 Jan 5. PubMed PMID: 21259317; PubMed Central PMCID: PMC3079914.

3: Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. *Antiviral Res.* 2009 Oct;84(1):76-83. Epub 2009 Jul 29. PubMed PMID: 19646485.

4: Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlerdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Woraprukjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol.* 2008 Apr;14(2):119-29. PubMed PMID: 18444083.

5: Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, Kessler JA. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *Dev Biol.* 2004 May 15;269(2):580-94. PubMed PMID: 15110721.

6: Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol.* 2004 Apr 1;268(1):220-31. PubMed

PMID: 15031118.

7: Israsena N, Kessler JA. Msx2 and p21(CIP1/WAF1) mediate the proapoptotic effects of bone morphogenetic protein-4 on ventricular zone progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2002 Sep 15;69(6):803-9. PubMed PMID: 12205674.

8: Israsena N, Phanthumchinda K, Sinsawaiwong S, Lerdlum S. Spontaneous carotid dissection. *J Med Assoc Thai.* 1997 Jun;80(6):406-10. PubMed PMID: 9240017.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

TRAIRAK PISITKUN, M.D.

Chulalongkorn University Systems Biology (CUSB) Center

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Phone: +6692 537 0549

Email: trairak@gmail.com and Trairak.P@chula.ac.th

Web Address: www.facebook.com/CUSBcenter and <http://sysbio.chula.ac.th/>

PERSONAL INFORMATION

Date of birth: September 21, 1971 Nationality: Thai

EDUCATION

2002 Board of Clinical Nephrology, Thailand

2002 Master of Science, Chulalongkorn University, Thailand

1998 Board of Internal Medicine, Thailand

1994 M.D. (First Class Honors), Mahidol University, Thailand

1992 Bachelor of Science, Mahidol University, Thailand

PROFESSIONAL / ACADEMIC APPOINTMENTS

2013-Present **Principal Investigator, Chulalongkorn University Systems Biology (CUSB)**

Center Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Special Volunteer, Epithelial Systems Biology Laboratory (ESBL)

National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), National Institutes of Health, Maryland, USA (https://intramural.nhlbi.nih.gov/labs/LKEM_G/LKEM/Pages/default.aspx)

Adjunct Senior Scientist, InterPrET Research Center

Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark (<http://interpret.au.dk/>)

2012-2013 **Senior Scientist, InterPrET Research Center**

Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark

2008-2012 **Staff Scientist, ESBL**

NHLBI, National Institutes of Health, Maryland, USA

2003-2008 **Postdoctoral Fellow, Laboratory of Kidney and Electrolyte Metabolism**

NHLBI, National Institutes of Health, Maryland, USA

2002-2003 **Assistant Instructor, Division of Nephrology**

Department of Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand

2002 **Visiting Fellow, Department of Nephrology**

Dialysis, and Transplantation, St. Bortolo Hospital, Vicenza, Italy

2000-2002 **Nephrology Fellow, Division of Nephrology**

Department of Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand

1998-1999 **Staff Clinician, Department of Medicine**

Bhumibol Adulyadej Hospital, Bangkok, Thailand

1997-1998 **Chief Resident in Internal Medicine**

Bhumibol Adulyadej Hospital, Bangkok, Thailand

1995-1998 **Internal Medicine Resident**

Bhumibol Adulyadej Hospital, Bangkok, Thailand

1994-1995 **Medical Intern**

Chantarubeksa Hospital, Nakornpathom, Thailand

CERTIFICATES

2013 Certificate in Q Exactive Mass Spectrometer Operations, Thermo Fisher Scientific, Denmark

2008 Certificate in LTQ Orbitrap Mass Spectrometer Operations, Thermo Fisher Scientific, USA

1998 USMLE/ECFMG Certificate, Number: 0-572-107-1

1996 Certificate in Clinical Sciences, Mahidol University, Thailand

AWARDS

2010 Outstanding Mentorship Award, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health: *This is a prestigious award for supervisor-level scientists in the institute, only two recipients are selected per year*

2008 Experimental Biology 2008 Epithelial Transport Group Postdoctoral Award

2003 International Society of Nephrology Fellowship Training Award

1998 Best Internal Medicine Resident, Bhumibol Adulyadej Hospital

1994 Excellence in Orthopedics Award, Ramathibodi Hospital

1994 Excellence in Anesthesiology Award, Ramathibodi Hospital

PUBLICATIONS (2001-PRESENT)

100 peer-reviewed articles and 13 book chapters

All citations > 5059, h-index = 33, i10-index = 61

<http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=M9AxLU8AAAAJ>

WWW-BASED TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC DATABASE DEVELOPMENT

<http://helixweb.nih.gov/ESBL/Database/>

COMPUTER SOFTWARE AND WEB APPLICATION DEVELOPMENT

- AbDesigner: a tool that help identify optimal immunizing peptides for production of antibodies, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/AbDesigner/>
- Automated Bioinformatics Extractor, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/ESBL/ABE/>
- CPhos: a program to calculate and visualize evolutionarily conserved functional phosphorylation sites, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/CPhos/>
- PtmPPIR: A machine learning strategy for predicting localization of post-translational modification sites in protein-protein interacting regions, <http://sysbio.chula.ac.th/PtmPPIR>
- PhosSA: Phosphorylation Site Assignment Algorithm for Mass Spectrometry Data, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/ESBL/PhosSA/>
- ProMatch: a tool that identifies and eliminates ambiguous MS-based protein identifications, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/ESBL/ProMatch/>
- PhosphoScore: an open-source phosphorylation site assignment tool for MSn data
- PhosphoLogo and PTM Centralizer: an information-theoretic algorithm to visualize kinase substrate preferences as a single sequence logo, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/PhosphoLogo/>
- QUIL: automated quantitative analyses of stable-isotope labeling and LC-MSn
- Temporal Pattern Mining (TPM) algorithm: a tool that clusters any time-series data set, specifically iTRAQ LC-MS/MS data sets, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/TPM/>
- Conditional Allele Mouse Planner (CAMP), <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/CAMP/>
- Renal Inner Medulla Free-Energy Calculator, <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/ESBL/FreeEnergy/>
- Urea Kinetic Modeling (UKM) Calculator
- Continuous Urea Clearance Equivalent Calculator
- Adequacy Calculator for Different Extracorporeal Therapies in Acute Renal Failure

SELECTED INTERNATIONAL ORAL PRESENTATIONS

- Exploring the molecular mechanisms of a disease using systems biology approaches. The 8th Asia Oceania Human Proteome Organization, Taiwan, 2016.
- Integrated Tool for Antibody Design. APAC session at BioJapan, Yokohama, Japan, 2015.
- Identification and proteomic profiling of extracellular vesicles in peritoneal dialysis fluid. Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis (APCM-ISPD 2015), Daegu, Korea, 2015.
- Integrated design of antibodies for systems biology using AbDesigner. International Conference and Exhibition on Antibodies, Birmingham, UK, 2015.
- Proteomic analysis of urinary exosomes: Use of systems biology approaches. Section of Nephrology, Department of Internal Medicine, Second University of Naples, Naples, Italy, 2012.
- Systems-level investigation of epithelial cells using proteomics and bioinformatics. Department of Biomedicine, Aarhus University, Denmark, 2011.
- Vasopressin Activates Akt1 Through PI-3K in Rat Inner Medullary Collecting Duct (IMCD). Experimental Biology Meeting, San Diego, USA, 2008.
- Urinary Exosomes: Promise and Practicality. 1st Workshop of Human Kidney and Urine Proteome Project, San Diego, USA, 2006.
- Proteomic analysis of long-term vasopressin action in the inner medullary collecting duct using isotope-coded affinity tag technique. Experimental Biology Meeting, San Diego, USA, 2005.
- Large-scale LC-MS/MS identification of proteins in aquaporin-2 (AQP2) vesicles immunisolated from renal inner medullary collecting duct. Experimental Biology Meeting, San Diego, USA, 2005.
- Proteomics in Nephrology. ProtIG Post-doctoral Seminar Series, NIH, USA, 2004.
- Aquaporin-2 and Other Integral Membrane Proteins Are Delivered to the Urine by Apical Exosome Secretion: Evidence from Immuno-EM and Proteomic Studies. ASN Renal Week, St. Louis, USA, 2004.
- LC-MS/MS Identification of Disease Biomarkers in Exosomes Isolated from Urine. Monthly NIH Proteomics Forum, NIH, USA, 2004.

OTHER PROFESSIONAL SCIENTIFIC ACTIVITIES

- Urine Proteomic (UroProt) website committee,
<http://intramural.niddk.nih.gov/research/uroprot/>
- *Ad Hoc* reviewer for several journals such as Molecular and Cellular Proteomics, Journal of Proteome Research, Journal of the American Society of Nephrology, American Journal of Physiology, Kidney International, Proteomics, Physiological Genomics, and Science Translational Medicine
- Review editor: Frontiers in Renal and Epithelial Physiology

SCIENTIFIC COLLABORATORS

Extensive national and international collaborations such as Mark A. Knepper, NIH, USA; Robert A. Fenton, Aarhus University, DK; Søren Riis Paludan, Aarhus University, DK; Norman P. Curthoys, Colorado State University, USA; Robert Kleta, University College London, UK; Feng Qian, Johns Hopkins University, USA; Robert Zietse, Erasmus University Medical Center, NL; Robert A. Star, NIH, USA; Jeppe Praetorius, Aarhus University, DK; Sylvie Breton, Harvard Medical School, USA; Jeffrey B. Kopp, NIH, USA; and Serena M. Bagnasco, Johns Hopkins University, USA; Albert B. Reynolds, Vanderbilt University School of Medicine

INTERNATIONAL FUNDING

2012 Lundbeck Foundation: total award 500,000 Danish krone for a project entitled “Systems biology of aberrant targeting and polarization of membrane proteins in disease”

NATIONAL FUNDING

2013-2015 Ratchadapiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RES560530124-HR): total award 1.3 million THB for a project entitled “Regulatory mechanisms of nanovesicle secretion”

2014-2015 National Research University Project, Office of Higher Education Commission (WCU-006-HR-57): total award 1.2 million THB for a project entitled “Proteomic analysis of immune cell signaling in SLE mouse model”

2014-2015 Ratchapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University: total award 400,000 THB for a project entitled “Development of electrochemical biosensor for early diagnosis of acute kidney injury”

2014-2015 National Research Council of Thailand: total award 700,000 THB for a project entitled “Systems-investigation of aberrant signaling in immune cells of SLE mouse model”

2014-2015 Ratchadapiseksompoch Endowment Fund, Chulalongkorn University (CU-57-091-IC): total award 2,500,000 THB for a project entitled “Development of electrochemical biosensor kit for early diagnosis of acute kidney injury”

2014-2018 Chulalongkorn Academic Advancement into Its 2nd Century Project: total award 102,044,000 THB for setting up Chulalongkorn University Systems Biology (CUSB) Center and carrying out the center’s projects

2015-2019 Crown Property Bureau Foundation: total award 2,500,000 THB for a project entitled “Development of peptide-directed antibodies using integrated software to help design a peptide immunogen”

2016-2019 National Research Council of Thailand: total award 42,814,200 THB for a project entitled “Development of cancer cell line bank and accompanying omics databases for precision oncology”

PUBLICATIONS TRAIRAK PISITKUN, M.D.

Total number of published original articles = 84

Total number of published review articles = 16

Total number of book chapters = 13

PUBLISHED ORIGINAL ARTICLES

84. Corcoran CC, Grady CR, **Pisitkun T**, Parulekar J, Knepper MA. From 20th Century Metabolic Wall Charts to 21st Century Systems Biology: Database of Mammalian Metabolic Enzymes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Dec 14:ajprenal.00601.2016. doi: 10.1152/ajprenal.00601.2016. [Epub ahead of print]

83. Khositseth S, Charnkhaew K, Boonkrai C, Somparn P, Uawithya P, Chomanee N, Payne DM, Fenton RA, **Pisitkun T**. Hypercalcemia induces targeted autophagic degradation of aquaporin-2 at the onset of nephrogenic diabetes insipidus. *Kidney Int*. 2016 Accepted

82. Cannizzaro L, Rossoni G, Savi F, Altomare A, Marinello C, Saethang T, Carini M, Payne DM, **Pisitkun T**, Aldini G, Leelahavanichkul A. Regulatory landscape of AGE-RAGE-oxidative stress axis and its modulation by PPAR γ activation in high fructose diet-induced metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2017 Jan 13;14:5.

81. Ondee T, Surawut S, Taratummarat S, Hirankan N, Palaga T, Pisitkun P, **Pisitkun T**, Leelahavanichkul A. FC Gamma Receptor IIB Deficient Mice: A Lupus Model with Increased Endotoxin Tolerance-Related Sepsis Susceptibility. *Shock*. 2016 Nov 15. [Epub ahead of print]

80. Rattanasingchan P, Sopitthummakhun K, Doi K, Hu X, Payne DM, **Pisitkun T**, Leelahavanichkul A. Folic acid-induced rat kidney fibrosis: preliminary evaluation as a potential model for identification of fibrosis biomarkers from urinary exosomes. *Asian Biomed*. 2016;10(5):447-454.

79. Yukird J, Wongtangprasert T, Rangkupan R, Chailapakul O, Rodthongkum N, **Pisitkun T**. Label-free immunosensor based on graphene/polyaniline nanocomposite for neutrophil gelatinase-associated lipocalin detection. *Biosens Bioelectron*. 2016 Aug 20;87:249-255.

78. Saethang T, Payne DM, Avihingsanon Y, **Pisitkun T**. A machine learning strategy for predicting localization of post-translational modification sites in protein-protein interacting regions. *BMC Bioinformatics*. 2016 Aug 17;17(1):307. <http://sysbio.chula.ac.th/PtmPPIR>
77. Sakunrangsit N, Kalpongkul N, **Pisitkun T**, Ketchart W. Plumbagin enhances tamoxifen sensitivity and inhibits tumor invasion in endocrine resistant breast cancer through EMT regulation. *Phytother Res*. 2016 Dec;30(12):1968-1977.
76. Medvar B, Raghuram V, **Pisitkun T**, Sarkar A, Knepper MA. Comprehensive Database of Human E3 Ubiquitin Ligases: Application to Aquaporin-2 Regulation. *Physiol Genomics*. 2016 Jul 1;48(7):502-12.
75. Huebner AR, Cheng L, Somparn P, Knepper MA, Fenton RA, **Pisitkun T**. Deubiquitylation of protein cargo is not an essential step in exosome formation. *Mol Cell Proteomics*. 2016 May;15(5):1556-71.
74. Poyomtip T, Hodge K, Matangkasombut P, Sakuntabhai A, **Pisitkun T**, Jirawatnotai S, Chimnarong S. Development of viable TAP-tagged dengue virus for investigation of host-virus interaction in viral replication. *J Gen Virol*. 2016 Mar;97(3):646-58.
73. Khositseth S, Uawithya P, Somparn P, Charngkaew K, Thippamom N, Hoffert JD, Saeed F, Payne DM, Chen SH, Fenton RA, **Pisitkun T**. Autophagic degradation of aquaporin-2 is an early event in hypokalemia-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Sci Rep*. 2015 Dec 17;5:18311.
72. Tantivitayakul P, Benjachat T, Somparn P, Leelahavanichkul A, Kittikovit V, Hirankarn N, **Pisitkun T**, Avihingsanon Y. Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis. *Lupus*. 2016 Jan;25(1):38-45.
71. Cheng L, Wu Q, Kortenoeven ML, **Pisitkun T**, Fenton RA. A systems level analysis of vasopressin-mediated signaling networks in kidney distal convoluted tubule cells. *Sci Rep*. 2015 Aug 4;5:12829.

70. Leelahavanichkul A, Somparn P, Panich T, Chanchaoenthana W, Wongphom J, **Pisitkun T**, Hirankarn N, Eiam-Ong S. Serum miRNA-122 in acute liver injury induced by kidney injury and sepsis in CD-1 mouse models. *Hepatol Res*. 2015 Dec;45(13):1341-52.

69. Rinschen MM, Pahmeyer C, **Pisitkun T**, Schnell N, Wu X, Maaß M, Bartram MP, Lamkemeyer T, Schermer B, Benzing T, Brinkkoetter PT. Comparative phosphoproteomic analysis of mammalian glomeruli reveals conserved podocin C-terminal phosphorylation as a determinant of slit diaphragm complex architecture. *Proteomics*. 2015 Apr;15(7):1326-31.

68. Sanghi A, Zaringhalam M, Corcoran CC, Saeed F, Hoffert JD, Sandoval PC, **Pisitkun T**, Knepper MA. A Knowledge Base of Vasopressin Actions in Kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Sep 15;307(6):F747-55.

67. Sykaras AG, Demenis C, Cheng L, **Pisitkun T**, McLaughlin JT, Fenton RA, Smith CP. Duodenal CCK cells from male mice express multiple hormones including ghrelin. *Endocrinology*. 2014 Sep;155(9):3339-51.

66. Knepper MA, Raghuram V, Bradford D, Chou CL, Hoffert JD, **Pisitkun T**. Letter to the editor: "Systems biology versus reductionism in cell physiology". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Aug 1;307(3):C308-9.

65. Moeller HB, Aroankins TS, Slengerik-Hansen J, **Pisitkun T**, Fenton RA. Phosphorylation and ubiquitylation are opposing players in regulating endocytosis of the water channel Aquaporin-2. *J Cell Sci*. 2014 Jul 15;127(Pt 14):3174-83.

64. Bradford D, Raghuram V, Wilson JL, Chou CL, Hoffert JD, Knepper MA, **Pisitkun T**. Use of LC-MS/MS and Bayes' Theorem to Identify Protein Kinases That Phosphorylate Aquaporin-2 at Ser256. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Jul 15;307(2):C123-39.

63. Trepiccione F, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Poulsen SB, Capasso G, Nielsen S, Knepper MA, Fenton RA, Christensen BM. Early targets of lithium in rat kidney inner medullary collecting duct include p38 and ERK1/2. *Kidney Int*. 2014 Oct;86(4):757-67.

62. Saeed F, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. Exploiting Thread-Level and Instruction-Level Parallelism to Cluster Mass Spectrometry Data using Multicore Architectures. *Netw Model Anal Health Inform Bioinform*. 2014 Apr;3:54.
61. Rinschen MM, Wu X, König T, **Pisitkun T**, Hagmann H, Pahmeyer C, Lamkemeyer T, Kohli P, Schnell N, Schermer B, Dryer S, Brooks BR, Beltrao P, Krueger M, Brinkkoetter PT, Benzing T. Phosphoproteomic Analysis Reveals Regulatory Mechanisms at the Kidney Filtration Barrier. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Jul;25(7):1509-22.
60. Hoffert JD, **Pisitkun T**, Saeed F, Wilson JL, Knepper MA. Global analysis of the effects of the V2 receptor antagonist satavaptan on protein phosphorylation in collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Feb 15;306(4):410-21.
59. Saeed F, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Rashidian S, Wang G, Gucek M, Knepper MA. PhosSA: Fast and accurate phosphorylation site assignment algorithm for mass spectrometry data. *Proteome Sci*. 2013 Nov 7;11(Suppl 1):S14. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/ESBL/PhosSA/>
58. Sandoval PC, Slentz DH, **Pisitkun T**, Saeed F, Hoffert JD, Knepper MA. Proteome-wide measurement of protein half-lives and translation rates in vasopressin-sensitive collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Nov;24(11):1793-805.
57. Yu P, **Pisitkun T**, Wang G, Wang R, Katagiri Y, Gucek M, Knepper MA, Geller HM. Global analysis of neuronal phosphoproteome regulation by chondroitin sulfate proteoglycans. *PLoS One*. 2013;8(3):e59285.
56. Jensen TB, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Jensen UB, Fenton RA, Praetorius HA, Knepper MA, Praetorius J. Assessment of the Effect of 24-Hour Aldosterone Administration on Protein Abundance in Fluorescence-Sorted Mouse Distal Renal Tubules by Mass Spectrometry. *Nephron Physiol*. 2012;121(3-4):p9-15.
55. Saeed F, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. High performance phosphorylation site assignment algorithm for mass spectrometry data using multicore systems. *ACM-BCB*. 2012;667-672. DOI=10.1145/2382936.2383056 <http://doi.acm.org/10.1145/2382936.2383056>

54. Saeed F, **Pisitkun T**, Knepper MA, Hoffert JD. An Efficient Algorithm for Clustering of Large-Scale Mass Spectrometry Data. *Proceedings (IEEE Int Conf Bioinformatics Biomed)*. 2012 Oct 4:1-4.
53. Miller RL, Sandoval PC, **Pisitkun T**, Knepper MA, Hoffert JD. Vasopressin inhibits apoptosis in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Jan 15;304(2):F177-88.
52. Zhao B, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Knepper MA, Saeed F. CPhos: a program to calculate and visualize evolutionarily conserved functional phosphorylation sites. *Proteomics*. 2012 Nov;12(22):3299-303. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/CPhos/>
51. Saeed F, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Wang G, Gucek M, Knepper MA. An Efficient Dynamic Programming Algorithm for Phosphorylation Site Assignment of Large-Scale Mass Spectrometry Data. *Proceedings (IEEE Int Conf Bioinformatics Biomed)*. 2012 Oct 4:618-625.
50. Bolger SJ, Gonzales Hurtado PA, Hoffert JD, Saeed F, **Pisitkun T**, Knepper MA. Quantitative Phosphoproteomics in Nuclei of Vasopressin-Sensitive Renal Collecting Duct Cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Nov 15;303(10):C1006-20.
49. Douglass J, Gunaratne R, Bradford D, Saeed F, Hoffert JD, Steinbach PJ, Knepper MA, **Pisitkun T**. Identifying Protein Kinase Target Preferences Using Mass Spectrometry. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Oct;303(7):C715-27. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/PhosphoLogo/>

48. Vilbig RL, Sarkar A, Zischkau J, Knepper MA, **Pisitkun T**. An online tool for calculation of free-energy balance for the renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Aug;303(3):F366-72. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/ESBL/FreeEnergy/>
47. **Pisitkun T**, Gandolfo MT, Das S, Knepper MA, Bagnasco SM. Application of systems biology principles to protein biomarker discovery: Urinary exosomal proteome in renal transplantation. *Proteomics Clin Appl*. 2012 Jun;6(5-6):268-78.
46. Schenk LK, Bolger SJ, Luginbuhl K, Gonzales PA, Rinschen MM, Yu MJ, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. Quantitative proteomics identifies vasopressin-responsive nuclear proteins in collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Jun;23(6):1008-18.
45. Hoffert JD, **Pisitkun T**, Song JH, Saeed F, Knepper MA. Dynamics of the G protein-coupled vasopressin V2 receptor signaling network revealed by quantitative phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Feb;11(2):M111.014613.
44. **Pisitkun T**, Hoffert JD, Saeed F, Knepper MA. NHLBI-AbDesigner: an online tool for design of peptide-directed antibodies. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Jan;302(1):C154-64. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/AbDesigner/>
43. Zhao B, Knepper MA, Chou CL, **Pisitkun T**. Large-scale phosphotyrosine proteomic profiling of rat renal collecting duct epithelium reveals predominance of proteins involved in cell polarity determination. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Jan;302(1):C27-45.
42. Hoffert JD, **Pisitkun T**, Miller RL. Conditional Allele Mouse Planner (CAMP): software to facilitate the planning and design of breeding strategies involving mice with conditional alleles. *Transgenic Res*. 2012 Jun;21(3):665-9. <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/CAMP/>
41. Saeed F, **Pisitkun T**, Knepper MA, Hoffert JD. Mining temporal patterns from iTRAQ mass spectrometry (LC-MS/MS) data. *The Proceedings of the ISCA 3rd International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (BiCoB)*. 2011 March:1:152-9. (ISBN: 978-1-880843-81-9) <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/TPM/>

40. Feric M, Zhao B, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. Large-scale phosphoproteomic analysis of membrane proteins in renal proximal and distal tubule. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Apr;300(4):C755-70.
39. Khositseth S, **Pisitkun T**, Slentz DH, Wang G, Hoffert JD, Knepper MA, Yu MJ. Quantitative protein and mRNA profiling shows selective post-transcriptional control of protein expression by vasopressin in kidney cells. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jan;10(1):M110.004036.
38. Gunaratne R, Braucht DW, Rinschen MM, Chou CL, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals cAMP/vasopressin-dependent signaling pathways in native renal thick ascending limb cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 31;107(35):15653-8.
37. Hwang S, Chou CL, Yu MJ, Rinschen MM, Gunaratne R, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Knepper MA. Vasopressin increases phosphorylation of Ser84 and Ser486 in Slc14a2 collecting duct urea transporters. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Sep;299(3):F559-67.
36. **Pisitkun T**, Da Silva N, Belleannée C, Miller LR, Nelson R, Knepper MA, Brown D, Breton S. Proteomic analysis of V-ATPase-rich cells harvested from the kidney and epididymis by fluorescence activated cell sorting. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Jun;298(6):C1326-42.
35. Rinschen MM, Yu MJ, Wang G, Boja ES, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor-dependent signaling pathways in renal collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 23;107(8):3882-7.
34. Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, **Pisitkun T**, Knepper MA. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int*. 2010 Apr;77(8):736-42.
33. Xie L, Hoffert JD, Chou CL, Yu MJ, **Pisitkun T**, Knepper MA, Fenton RA. Quantitative analysis of aquaporin-2 phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Apr;298(4):F1018-23.

32. Bansal AD, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Hwang S, Chou CL, Boja ES, Wang G, Knepper MA. Phosphoproteomic profiling reveals vasopressin-regulated phosphorylation sites in collecting duct. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Feb;21(2):303-15.
31. Tchapyjnikov D, Li Y, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Yu MJ, Knepper MA. Proteomic profiling of nuclei from native renal inner medullary collecting duct cells using LC-MS/MS. *Physiol Genomics*. 2010 Feb 4;40(3):167-83.
30. Zwang NA, Hoffert JD, **Pisitkun T**, Moeller HB, Fenton RA, Knepper MA. Identification of phosphorylation-dependent binding partners of aquaporin-2 using protein mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2009 Mar;8(3):1540-54.
29. Yu MJ, Miller RL, Uawithya P, Rinschen MM, Khositseth S, Braucht DW, Chou CL, **Pisitkun T**, Nelson RD, Knepper MA. Systems-level analysis of cell-specific AQP2 gene expression in renal collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 17;106(7):2441-6.
28. Gonzales PA, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, Wang NS, Knepper MA. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;20(2):363-79.
27. Sachs AN, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Yu MJ, Knepper MA. LC-MS/MS analysis of differential centrifugation fractions from native inner medullary collecting duct of rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Dec;295(6):F1799-806.
26. Hoffert JD, Fenton RA, Moeller HB, Simons B, Tchapyjnikov D, McDill BW, Yu MJ, **Pisitkun T**, Chen F, Knepper MA. Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at ser-269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):24617-27.
25. **Pisitkun T**, Jacob V, Schleicher SM, Chou CL, Yu MJ, Knepper MA. Akt and ERK1/2 pathways are components of the vasopressin signaling network in rat native IMCD. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Oct;295(4):F1030-43.

24. Yu MJ, **Pisitkun T**, Wang G, Aranda JF, Gonzales PA, Tchapyjnikov D, Shen RF, Alonso MA, Knepper MA. Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Sep;295(3):C661-78.
23. Ruttenberg BE, **Pisitkun T**, Knepper MA, Hoffert JD. PhosphoScore: an open-source phosphorylation site assignment tool for MSn data. *J Proteome Res*. 2008 Jul;7(7):3054-9.
22. Hao JJ, Wang G, **Pisitkun T**, Patino-Lopez G, Knepper MA, Shen RF, Shaw S. Enrichment of distinct microfilament-associated and GTP-binding-proteins in membrane/microvilli fractions from lymphoid cells. *J Proteome Res*. 2008 Jul 3;7(7):2911-2927.
21. Uawithya P, **Pisitkun T**, Ruttenberg BE, Knepper MA. Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney. *Physiol Genomics*. 2008 Jan 17;32(2):229-253.
20. Hoffert JD, Wang G, **Pisitkun T**, Shen RF, Knepper MA. An automated platform for analysis of phosphoproteomic datasets: application to kidney collecting duct phosphoproteins. *J Proteome Res*. 2007 Sep;6(9):3501-8.
19. Dvorak MM, De Jossineau C, Carter DH, **Pisitkun T**, Knepper MA, Gamba G, Kemp PJ, Riccardi D. Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by interacting with a sodium chloride co-transporter in bone. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Sep;18(9):2509-16.
18. Cheruvanky A, Zhou H, **Pisitkun T**, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, Star RA. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 May;292(5):F1657-61.
17. Hoffert JD, Nielsen J, Yu MJ, **Pisitkun T**, Schleicher SM, Nielsen S, Knepper MA. Dynamics of aquaporin-2 serine-261 phosphorylation in response to short-term vasopressin treatment in collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Feb;292(2):F691-700.

16. Zhou H, **Pisitkun T**, Aponte A, Yuen PS, Hoffert JD, Yasuda H, Hu X, Chawla L, Shen RF, Knepper MA, Star RA. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.* 2006 Nov;70(10):1847-57.
15. Wang G, Wu WW, **Pisitkun T**, Hoffert JD, Knepper MA, Shen RF. Automated quantification tool for high-throughput proteomics using stable isotope labeling and LC-MSn. *Anal Chem.* 2006 Aug 15;78(16):5752-61.
14. Yu MJ, **Pisitkun T**, Wang G, Shen RF, Knepper MA. LC-MS/MS analysis of apical and basolateral plasma membranes of rat renal collecting duct cells. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Nov;5(11):2131-2145.
13. Hoffert JD, **Pisitkun T**, Wang G, Shen RF, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 2;103(18):7159-64.
12. Zhou H, Yuen PS, **Pisitkun T**, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, Gross P, Knepper MA, Star RA. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006 Apr;69(8):1471-6.
11. **Pisitkun T**, Bieniek J, Tchapyjnikov D, Wang G, Wu WW, Shen RF, Knepper MA. High-throughput identification of IMCD proteins using LC-MS/MS. *Physiol Genomics.* 2006 Apr 13;25(2):263-76.
10. Ricci Z, Salvatori G, Bonello M, **Pisitkun T**, Bolgan I, D'Amico G, Dan M, Piccinni P, Ronco C. In vivo validation of the adequacy calculator for continuous renal replacement therapies. *Crit Care.* 2005 Jun;9(3):R266-73.
9. Barile M, **Pisitkun T**, Yu MJ, Chou CL, Verbalis MJ, Shen RF, Knepper MA. Large-scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct. *Mol Cell Proteomics.* 2005 Aug;4(8):1095-1106.
8. Praditpornsilpa K, Buranasot S, Bhokaisuwan N, Avihingsanon Y, **Pisitkun T**, Kansanabuch T, Eiam-Ong S, Chusil S, Intarakumtornchai T, Tungsanga K. Recovery from anti-recombinant-

human-erythropoietin associated pure red cell aplasia in end-stage renal disease patients after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Mar;20(3):626-30.

7. Punakabutra N, Nunthapisud P, **Pisitkun T**, Tiranathanagul K, Tungsanga K, Eiam-Ong S. Comparison of different culture methods on bacterial recovery in hemodialysis fluids. *J Med Assoc Thai*. 2004 Nov;87(11):1361-7.

6. **Pisitkun T**, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13368-73.

5. Praditpornsilpa K, Avihingsanon Y, Kupatawintu P, Songpanich S, **Pisitkun T**, Kansanabuch T, Eiam-Ong S, Chusil S, O-Charoen R, Tungsanga K. Monitoring of T-cell subsets in patients treated with anti-CD 25 antibody. *Transplant Proc*. 2004 Mar;36(2 Suppl):487S-491S.

4. **Pisitkun T**, Tiranathanagul K, Poulin S, Bonello M, Salvatori G, D'Intini V, Ricci Z, Bellomo R, Ronco C. A practical tool for determining the adequacy of renal replacement therapy in acute renal failure patients. *Contrib Nephrol*. 2004;144:329-49.

3. **Pisitkun T**, Eiam-Ong S, Tiranathanagul K, Sakunsrijinda C, Manotham K, Hanvivatvong O, Suntaranuson P, Praditpornsilpa K, Chusil S, Tungsanga K. Convective-controlled double high flux hemodiafiltration: a novel blood purification modality. *Int J Artif Organs*. 2004 Mar;27(3):195-204.

2. **Pisitkun T**, Eiam-Ong S, Chusil S, Praditpornsilpa K, Pansin P, Tungsanga K. The role of C4 and AUC0-4 in monitoring of tacrolimus in stable kidney transplant patients. *Transplant Proc*. 2002;34:3173-5.

1. Booranalertpaisarn V, **Pisitkun T**, Hlorsuwanakul R, Eiam-Ong S. Clinical trials of cyclosporine, FK 506 (tacrolimus), and sirolimus in kidney transplantation patients. *J Nephrol Soc Thai*. 2001;7(3):320-37.

PUBLISHED REVIEW ARTICLES

16. Cheng L, **Pisitkun T**, Knepper MA, Hoffert JD. Peptide labeling using isobaric tagging reagents for quantitative phosphoproteomics. *Methods Mol Biol.* 2016;1355:53-70.
15. Rinschen MM, Benzing T, Limbutara K, **Pisitkun T**. Proteomic analysis of the kidney filtration barrier - problems and perspectives. *Proteomics Clin Appl.* 2015 Apr 23. doi: 10.1002/prca.201400201. [Epub ahead of print]
14. Huebner AR, Somparn P, Benjachat T, Leelahavanichkul A, Avihingsanon Y, Fenton RA, **Pisitkun T**. Exosomes in urine biomarker discovery. *Adv Exp Med Biol.* 2015;845:43-58.
13. **Pisitkun T**, Dummer P, Somparn P, Hirankarn N, Kopp JB, Knepper MA. Integrated design of antibodies for systems biology using AbDesigner. *J Proteomics Bioinform.* 2014 Mar 24;7(4):88-94.
12. Radin MJ, Yu MJ, Stodkilde L, Miller RL, Hoffert JD, Frokiaer J, **Pisitkun T**, Knepper MA. Aquaporin-2 regulation in health and disease. *Vet Clin Pathol.* 2012 Dec;41(4):455-70.
11. Huling JC, **Pisitkun T**, Song JH, Yu MJ, Hoffert JD, Knepper MA. Gene Expression Databases for Kidney Epithelial Cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Feb;302(4):F401-7.
10. van Balkom BW, **Pisitkun T**, Verhaar MC, Knepper MA. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney Int.* 2011 Dec;80(11):1138-45.
9. Hoffert JD, **Pisitkun T**, Knepper MA. Phosphoproteomics of vasopressin signaling in the kidney. *Expert Rev Proteomics.* 2011 Apr;8(2):157-63.
8. Gonzales PA, Zhou H, **Pisitkun T**, Wang NS, Star RA, Knepper MA, Yuen PS. Isolation and purification of exosomes in urine. *Methods Mol Biol.* 2010;641:89-99.
7. Hoorn EJ, **Pisitkun T**, Yu MJ, Knepper MA. Proteomic approaches for the study of cell signaling in the renal collecting duct. *Contrib Nephrol.* 2008;160:172-85.

6. Gonzales P, **Pisitkun T**, Knepper MA. Urinary exosomes: is there a future? *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Jun;23(6):1799-801.
5. **Pisitkun T**, Hoffert JD, Yu MJ, Knepper MA. Tandem mass spectrometry in physiology. *Physiology (Bethesda)*. 2007 Dec;22:390-400.
4. Knepper MA, **Pisitkun T**. Exosomes in urine: Who would have thought...? *Kidney Int*. 2007 Nov;72(9):1043-5.
3. **Pisitkun T**, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Oct;5(10):1760-1771.
2. Hoorn EJ, **Pisitkun T**, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, Gonzales PA, Star RA, Knepper MA. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Jun;10(3):283-90.
1. Ronco C, Inguaggiato P, D'Intini V, Cole L, Bellomo R, Poulin S, Bordoni V, Crepaldi C, Gastaldon F, Brendolan A, **Pisitkun T**, Tiranathanagul K. The role of extracorporeal therapies in sepsis. *J Nephrol*. 2003 Nov-Dec;16 Suppl 7:S34-41.

BOOK CHAPTERS

13. Cheng L, Fenton RA, **Pisitkun T**. Mass spectrometry in systems biology. In: Recent Advances in Systems Biology (ed A. Sarkar), Nova Science Publishers, Inc. 2013: 89-107.
12. Zhou H, Gonzales PA, **Pisitkun T**, Star RA, Knepper MA, Yuen PS. Isolation and Enrichment of Urinary Exosomes for Biomarker Discovery. In: Renal and Urinary Proteomics: Methods and Protocols (ed V. Thongboonkerd), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527628612.ch19. 2009: 243-252.
11. **Pisitkun T**. Management of hypertension in chronic kidney disease. In: Sridama V, Intarakumtornchai T, editors. Evidence-based clinical practice guideline in medicine. Bangkok: Chulalongkorn University Publication, 2003: 80-5.

10. **Pisitkun T**, Eiam-Ong S. Indications of dialysis. In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 1-11.
9. **Pisitkun T**, Tungsanga K. Water purification for hemodialysis. In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 135-88.
8. Buranaosot S, **Pisitkun T**, Chusil S. Prescription in chronic hemodialysis. In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 283-303.
7. **Pisitkun T**, Eiam-Ong S, Tungsanga K. Adequacy of hemodialysis. In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 395-401.
6. Praditpornsilpa K, **Pisitkun T**, Songpanich S. Hemodiafiltration. In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 427-35.
5. **Pisitkun T**, Julasareekul W, Eiam-Ong S, Tungsanga K. Continuous renal replacement therapy (CRRT). In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 533-66.
4. Sukhavasharin N, **Pisitkun T**, Eiam-Ong S. Sustained low-efficiency dialysis (SLED). In: Eiam-Ong S, Tungsanga K, Praditpornsilpa K, editors. Practical Dialysis. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2002: 579-89.
3. **Pisitkun T**, Tungsanga K. Overview of chronic renal failure. In: Eiam-Ong S, editor. Nephrology. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2000: 1223-64.
2. **Pisitkun T**, Eiam-Ong S. NSAIDs and kidney. In: Eiam-Ong S, editor. Nephrology. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2000: 973-86.

1. **Pisitkun T**, Eiam-Ong S. Hypouricemia and hyperuricemia. In: Eiam-Ong S, editor. Nephrology. Bangkok: Text and Journal Publication Co, 2000: 187-206.