การศึกษาดีเอ็นเอเมททิลเลชั่นของไลน์วันในมะเร็งชนิดต่างๆ

นางสาว กฤษณี ชลิตชากร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN: 974-17-4060-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A STUDY OF LINE-1 METHYLATION IN DIFFERENT TYPES OF CANCER

Miss Krisanee Chalitchagorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN: 974-17-4060-3

Thesis Title	A STUDY OF LINE-1 METHYLATION IN DIFFERENT TYPES OF CANCER
By	Miss Krisanee Chalitchagorn
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Associate Professor Apiwat Mutirangura

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree

.....Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Assistant Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)

.....Thesis Coadvisor

(Assistant Professor Shanop Shuangshoti, M.D.)

.....Member

(Associate Professor Surang Triratanachart, M.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กฤษณี ชลิตชากร :การศึกษาดีเอ็นเอเมททิลเลชั่นของไลน์วันในมะเร็งชนิดต่างๆ(A STUDY OF LINE-1 METHYLATION IN DIFFERENT TYPES OF CANCER) อ. ที่ปรึกษา : รศ.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ.นพ. ชนพ ช่วงโชติ , 69 หน้า. ISBN 974-17-4060-3

การเปลี่ยนแปลงที่มักพบในการเกิดมะเร็งหลายชนิดคือพบการลดลงของเมททิลเลชั่น (Hypomethylation) ในจีโนม โดยส่วนมากดีเอ็นเอเมททิลเลชั่นมักเกิดขึ้นบนเบสไซโตซีนและจะพบบ่อยในพวกดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ Long interspersed nuclear elements, LINE-1 เป็น ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (interspersed repeated DNA) พบได้หลายชุด มีอยู่ในจีโนมมนุษย์มากถึง 520,000 คิดเป็น 17% ของจีโนม การศึกษาในครั้งนี้จะประเมินการเมททิลเลชั่น ของ LINE-1 (long interspersed nuclear elements-1) ในเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดต่างๆจากพาราฟินโดยเทคนิคใหม่เป็นเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่จำเพาะกับเมททิลเลชั่น ที่ชื่อว่า CORBA LINE-1 จากการทดลองไม่พบความแตกต่างของระดับเมททิลเลชั่นในดีเอ็นเอของเม็ดเลือดขาวที่มีความแตกต่างของเพศและอายุ แต่จากการศึกษาในเนื้อเยื่อปกติจากอวัยวะต่างๆพบว่าเนื้อเยื่อหลายชนิดมีระดับของเมททิลเลชั่นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากการเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อมะเร็งกับเนื้อเยื่อปกติชนิดนั้นๆผลการทดลองพบความแตกต่างของระดับการลดลงของเมททิลเลชั่นอย่างมีนัยสำคัญ ในมะเร็งลำไส้, มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ, มะเร็งศีรษะและคอ, มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งเต้านม มะเร็งกระเพาะอาหาร และ ในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยจะมีค่าการลดลงของเมททิลเลชั่นมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างของค่าการลดลงของเมททิลเลชั่นในมะเร็งไต มะเร็งต่อมไทรอยด์ และ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาในแต่ละขั้นตอนของมะเร็งลำไส้พบว่า ในเนื้อเยื่อมะเร็งมีระดับการลดลงของเมททิลเลชั่น แตกต่างกับเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เมททิลเลชั่นจะมีลักษณะที่จำเพาะกับชนิดของเนื้อเยื่อและการลดลงของเมททิลเลชั่นมักจะพบได้ในมะเร็งหลายชนิด

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....กฤษณี.....ชลิตชากร.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

447 52023 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: LINE-1 /GLOBAL HYPOMETHYLATION / COBRA LINE-1 /MICRODISSECTION / CELLULAR DIFFERENTIATION

KRISANEE CHALITCHAGORN: A STUDY OF LINE-1 METHYLATION IN DIFFERENT TYPES OF CANCER.THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D. Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSIT. PROF.SHANOP SHUANGSHOTI, M.D., 69 pp.

ISBN 974-17-4060-3

Genome-wide losses of DNA methylation ,global genomic hypomethylation, is a common epigenetic change in malignancies. In mammalian genome, the bulk of cytosine methylation occurs on repetitive element. Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1), a highly repeated, interspersed human retrotransposon, constitutes about 17% of the human genome. This study evaluates the methylation status of LINE-1 by newly established methylation specific PCR method, combined bisulfite restriction analysis (COBRA), in the microdissected paraffin materials from various normal and neoplastic human tissues.

Results hypomethylation of LINE-1 consistent in leukocytes from different age and gender. However, in normal tissues from different organs showed tissue specific levels of methylated LINE-1 sequences. A significantly increased percentage of hypomethylation has been observed in several carcinomas including breast, colon, lung, head and neck, bladder, esophagus, liver, prostate, and stomach. Similarly, DNA derived from sera of gastric cancer patients displayed more hypomethylated LINE-1 than those of control sera. In a colorectal carcinogenesis model of multistep process detected significantly greater hypomethylation in carcinoma than those of dysplastic polyp and histological normal colonic epithelium. In conclusion these results suggested that normal tissue-specific difference in DNA methylation pattern and cancer associated global hypomethylation of LINE-1 may progressively evolve during multistage carcinogenesis.

Field of study Medical Science

Academic year 2003

Student's signature. Krisanee Chalitchagorn

Advisor's signature. .....

Coadvisor's signature. .....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to take this opportunity to express my heartfelt gratitude to certain people who gave me the possibility to start and accomplish this thesis. First of all, I would like to thank the committee of Medical Science Program for their kind permission and support from the very beginning, allowing me to complete necessary research work for this project.

I am deeply indebted to my advisor, Associated Professor Dr. Apiwat Mutirangura, for his stimulating guidance and patient support. His expertise in human genetics crucially helped me improve my research and inspired me for the future challenges. Thank to my co-advisor, Assistant Professor Shanop Shuangshoti, for the sample used in this study along with helpful histological knowledge. My committee members, Assistant Professor Wilai Anomasiri and Associate Professor Surang Triratanachart also helped me with insightful suggestions during the course of my study.

I am also grateful to my colleagues, Mr. Chalurmporn Srichomthong, Mr. Chupong Ittiwut, Ms.Narisorn Kongrattanachock, Mr. Wichai Pornthanakasem and Ms. Nusara Hourpai for their assistance. My appreciation to my friends for their help and encouragement, with out them, this work would not have been accomplished.

Last but not least, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their unconditional love and understanding.

This work was supported by The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENES

PAGE

Abstract (Thai)..... iv

Abstract (English).....v

Acknowledgment vi

Table of contents vii

List of Tables ix

List of Figures x

List of Abbreviation xi

Chapter

I. Introduction 1

II. Review of Related Literatures 5

III. Materials and Methods 23

IV. Results 34

V. Discussion and Conclusion 54

References 57

Appendices

Appendix A: Buffers and Reagents.....64

Appendix B: Nucleotide sequence and Primer.....68

Biography 69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

4-1 Result of quantitated LINE-1 methylation status.....36-42

4-2 Independent samples T-Test for compared difference sex and age.....43

4-3 Paired sample T-test for compared hypomethylation of difference colon tissues.....44

4-4 Percentage of hypomethylation in normal tissues.....45

4-5 Percentage of hypomethylation in cancer tissues.....45

4-6 2 tailed - Significant value of independent sample T-test for compared between normal tissues.....46

4-7 T-test for compared hypomethylation between normal and cancer tissues.....48

4-8 T-test for compared multistep in colonic carcinoma.....49

4-9 Independent samples T- Test for compared sera gastric cancer.....50

4-10 Summary of LINE-1 hypomethylation level in several tissue types.....53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

2-1 Cytosine methylation.....6

2-2 Mechanisms of transcriptional repression 8

2-3 Chromatin inactivation by DNA methylation.....9

2-4 Changes in DNA methylation during mammalian development.....12

2-5 A summary of the most frequent types of sequences affected by cancer specific DNA hypomethylation.....14

2-6 Non-LTR elements.....17

2-7 Outline of the COBRA procedure.....21

2-8 Combined bisulfite restriction analysis (COBRA LINE-1).....21

3-1 Pair sample T-test in SPSS program.....33

3-2 Independent sample T-test in SPSS program.....33

4-1 The description of %hypomethylation in COBRA LINE-1.....35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4-2 Example of COBRA LINE-1 in normal epithelium and esophageal cancer.....35

4-3 LINE-1 hypomethylation level of several tissue types.....51

4-4 Differential level of LINE-1 hypomethylation in cancers from their adjacent normal tissues.....52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

CpG	=	Dinucleotide containing cytosine and guanine respectively, P represent phosphate group
d^mC	=	Deoxymethylcytosine
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DNTPs	=	Deoxyribonucleotide containing the base adenine, thymine, cytosine and guanine respectively
dATP	=	Deoxyadenine triphosphate
dGTP	=	Deoxyguanine triphosphate
dTTP	=	Deoxythymine triphosphate
dCTP	=	Deoxycytocine triphosphate
nt	=	Nucleotide
Bp	=	Base pair
COBRA	=	Combined bisulfite restriction analysis
LINE	=	Long interspersed nuclear element
^oC	=	Degree Celsius
Kb	=	Kilobase
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
µl	=	Microlitre
µM	=	Micromolar
rpm	=	Round per minute

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย