

การใช้แผนที่ของ LINE-1 ที่ไม่มีเมทิลเลชันภายในจีโนมเป็นเครื่องหมายบ่งชี้การเป็นมะเร็ง

นางสาว จุรีรัตน์ โพธิ์แก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN: 974-17-2635-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**GENOME WIDE CHARACTERIZATION OF UNMETHYLATED LINE-1 MAP : THE
IMPLICATION AS A TUMOR MARKER**

Miss Chureerat Phokaew

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science**

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006


ISBN: 974-17-2635-6

Copyright of Chulalongkorn University

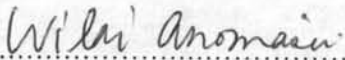
492161


Thesis Title GENOME WIDE CHARACTERIZATION OF UNMETHYLATED
LINE-1 MAP : THE IMPLICATION AS A TUMOR MARKER
By Miss Chureerat Phokaew
Field of Study Medical Science
Thesis Advisor Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.

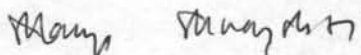
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

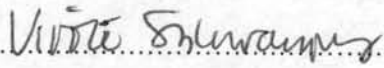
.....Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanaikul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Shanop Shuangshoti, M.D.)

.....Member
(Assistant Professor Virote Sriuranpong, M.D., Ph.D.)

จวีรัตน์ โพธิ์แก้ว:การใช้แผนที่ของ LINE-1 ที่ไม่มีเมทิลเลชันภายในจีโนมเป็นเครื่องหมายบ่งชี้การเป็นมะเร็ง(Genome wide characterization of unmethylated LINE-1 map : The implication as a tumor marker) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, 92 หน้า. ISBN 974-17-2635-6

งานนี้เป็นการวิจัยต่อเนื่องจากการผลการศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยเทคนิค Combined Bisulfite Restriction Analysis ที่ตำแหน่ง5'UTR หรือ โปรโมเตอร์ของ LINE-1s (COBRA-L1) ซึ่ง L1s เป็น active intersperse repetitive retrotransposable elements ที่สำคัญทั้งนี้เพื่อคาดการณ์ลักษณะการลดลงของเมทิลเลชันทั่วทั้งจีโนม (Genome) มะเร็ง (Global genomic hypomethylation) และจากผลการทดลองก็พบความแตกต่างของเมทิลเลชันทั้งจีโนมระหว่างเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ และพบการลดลงของเมทิลเลชันอย่างชัดเจนในมะเร็งหลายชนิด จุดมุ่งหมายของการศึกษาในงานวิจัยนี้ก็เพื่อการอธิบายลักษณะการลดลงของเมทิลเลชันในระหว่างการเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอน (multistep carcinogenesis) ของ L1 แบบ full length ที่เลือกมา 17 ตำแหน่ง โดยทั้งหมดอยู่ในบริเวณ intron ของยีน เนื่องจากเทคนิค COBRA-L1 แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ จึงเป็นที่น่าสนใจในกรณีการเปรียบเทียบลักษณะเมทิลเลชันของ L1 แต่ละตำแหน่งต่อไป เทคนิค COBRA unique sequence to L1 (CU-L1) ประยุกต์เทคนิค COBRA-L1 ด้วยการใส่ปลายด้าน 5' เป็น unique sequence ที่อยู่เหนือจาก L1 ไปทาง 5' แทนการใช้ส่วน 5'UTR ของ L1 แบบเดิม พบความสัมพันธ์อย่างสูงระหว่างค่าเมทิลเลชันของ COBRA-L1 กับ ค่าเฉลี่ยระดับเมทิลเลชันของ CU-L1 โดยได้ค่า pearson correlation คือ 0.913 (sig.2-tailed <0.01) เมื่อเปรียบเทียบ Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines และ HNSCC microdissected tissues กับกลุ่ม normal oral epithelial พบว่าผล CU-L1 15 จาก 17 ตำแหน่งสามารถแสดงการลดลงของเมทิลเลชัน (hypomethylation) ($P < 0.01$) แต่ในกลุ่ม leukaemic cell lines จะไม่พบการแสดงการลดลงของเมทิลเลชัน ($P > 0.05$) นอกเหนือจากนั้น พบว่ามี CU-L1 9 ตำแหน่ง ได้แก่ PRKG1, LOC133993, CNTNAP5, LRP2, LOC286094, FAM49A, ADAMTS20, COL24A1 และ SPOCK3 ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่าง normal oral epithelial และ normal white blood cell ($P < 0.05$) ที่น่าสนใจก็คือพบว่า CU-L1 หลายตำแหน่งสามารถใช้แสดงลักษณะ clonal expansion ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่สำคัญของมะเร็ง และสำหรับ CU-L1 บางตำแหน่งก็มีลักษณะการลดลงของเมทิลเลชันสูงเกือบ 100 % ในขณะที่บางตำแหน่งก็มีแต่การเพิ่มเมทิลเลชัน (Hypermethylation) และที่เห็นความคาดหมายก็คือการพบว่าการลดลงของเมทิลเลชันที่ 2 intronic L1 ของยีน *EPHA3* และที่ 1 intronic L1 ของ *PPP2R2B* มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ mRNA ทั้ง 2 ยีน (ค่า pearson correlation 0.703, 0.724 และ 0.630 ตามลำดับและทั้งหมดมี $P < 0.05$). โดยสรุปจากเดิมที่รู้ว่าเนื้อเยื่อและมะเร็งมีระดับเมทิลเลชันหลากหลายและจำเพาะ ในที่นี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า L1 แต่ละตำแหน่งก็มีการบทบาทในกระบวนการ epigenetics ต่างกัน บางตำแหน่งก็แสดงความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อ และที่สำคัญก็คือ L1 หลายตำแหน่งมีบทบาทสำคัญทางชีววิทยาในการพัฒนาของมะเร็ง และสำหรับกลไกการลดลงของเมทิลเลชันบน L1 ที่มีผลให้ยับยั้งการทำงานของยีน จะเป็นแนวทางสำคัญในการช่วยให้เข้าใจบทบาทของ Global hypomethylation ในการพัฒนาของมะเร็งแบบหลายขั้นตอน

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต...จวีรัตน์...โพธิ์แก้ว...
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา...ศ.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร... ๒๕๔๙/๑๐

467 47086 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: HYPOMETHYLATION / TUMOR MARKER / COBRA UNIQUE to LINE-1 /
CARCINOGENESIS

CHUREERAT PHOKAEW : GENOME WIDE CHARACTERIZATION OF
UNMETHYLATED LINE-1 MAP : THE IMPLICATION AS A TUMOR MARKER
THESIS ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D. Ph.D., 92 pp. ISBN
974-17-2635-6

This study is to follow up the previous study using Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) technique at 5'UTR of L1s (L1s), active intersperse repetitive retrotransposable elements, promoter, to evaluate genome-wide losses of DNA methylation (global genomic hypomethylation) in cancer. Genome wide DNA methylation is different among tissues and significantly decreased in majority of cancer. The aim of this study is to describe how methylation at 17 full length L1 loci, located in intron of human genes, loss during the multistep carcinogenesis. Since COBRA-L1 demonstrated variation among tissues, it is interesting to evaluate and compare the pattern of methylation among L1 loci. COBRA unique sequence to L1 (CU-L1) was developed by applying COBRA-L1 but replaced 5'repetitive sequence oligo with unique sequence 5' to L1. Significant pearson correlation 0.913 (sig.2-tailed <0.01) was discovered when compared between COBRA-L1 and average methylation level of CU-L1. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines and HNSCC microdissected tissues were hypomethylated at 15 out of the 17 L1 loci when compared with normal oral epithelial ($P < 0.01$). However, leukaemic cell lines were not hypomethylated ($P > 0.05$). Moreover, 9 CU-L1 loci, PRKG1, LOC133993, CNTNAP5, LRP2, LOC286094, FAM49A, ADAMTS20, COL24A1 and SPOCK3, were different between normal oral epithelial and normal white blood cell ($P < 0.05$). Interestingly, several CU-L1s reveal selective clonal expansion, a crucial somatic genetic characteristic of cancer. In some cases, some CU-L1 demonstrated high degrees of hypomethylation close to 100% while some were hypermethylated. Surprisingly methylation level of two intronic L1s of *EPHA3* and one of *PPP2R2B* were directly correlated with the quantity of both mRNAs (pearson correlation 0.703, 0.724 and 0.630, respectively, $P < 0.05$). In conclusion, previously, we knowed that L1 methylation levels are varied among tissues and cancers. Here, we proved the different roles of the epigenetic events among loci. Some showed distinctive methylation level among tissues. More importantly, several L1 loci play biological role in cancer development. The mechanism how loss of L1 methylation lead to gene inactivation will be important clue in understanding the role of global hypomethylation in cancer multistep process.

Field of Study : Medical Science

Academic Year : 2006

Student's Signature... Chureerat Phokaew

Advisor's Signature... Apiwat Mutirangura

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to take this opportunity to express my true appreciation 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 mightily indebted to my advisor, Professor Dr. Apiwat Mutirangura, for his stimulating guidance and patient assistance. His expertise in human molecular genetics crucially helped me improve my research and inspired me for the future challenges. Thank to Associate Professor Shanop Shuangshoti, for the sample used in this study along with helpful histological knowledge. My project chairman Associate Professor Wilai Anomasiri and Assistant Professor Virote Sriuranpong also helped me with insightful suggestions during the course of my study.

My deeply appreciation to my friends for their help and encouragement, with out them, this work would not have been accomplished. I am also thank to my colleagues for their assistance.

Last but not least, I would like to express my deepest gratitude to my family for their unconditional love and understanding. They actually are my collaborator in complete this project though many problems. I could'nt done without them.

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

CONTENTS

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgments.....	vi
Contents	vii-viii
List of Tables	ix-x
List of Figures	xi-xiii
List of Abbreviation	xiv
Chapter	
I. Introduction	1
II. Review of Related Literatures	7
III. Materials and Methods	30
IV. Results	48
V. Discussion and Conclusion	66
References	69
Appendices	
Appendix A: Buffers and Reagents.....	77
Appendix B: Sequence of COBRA LINE-1 and primer	83
Appendix C: Description of 17 LINE-1, CU-L1 PCR and RT-PCR.....	84
Appendix D: ANOVA analysis of all group.....	85

CONTENTS

	Page
Biography	92

LIST OF TABLES

Table	Page
3-1 Anatomical localization of the tumors from which cell lines were derived and their clinical staging.....	29
4-1 Hypomethylation correlation between COBRA L1 and COBRA unique to L1 of each specimen group.....	51
4-2 Hypomethylation of HNSCC cell line.....	52
4-3 COBRA unique to L1 hypomethylation of leukaemic cell line.....	53
4-4 COBRA unique to L1 hypomethylation of Epithelial cancer cell line	53
4-5 COBRA unique to L1 hypomethylation of HNSCC micordissect specimen	54
4-6 COBRA unique to L1 hypomethylation of Normal oral epithelial.....	54
4-7 COBRA unique to L1 hypomethylation of Normal white blood cell	55
4-8 Conclusion table for show COBRA unique to L1 each loci significant value from multiple group comparison with ANOVA analysis.....	55
4-9 Independent T-test for equality of means between Normal white blood cell and Normal oral epithelial cell.....	58

LIST OF TABLES

Table	Page
4-10 Ratio expression of L1 host gene per GAPDH expression	62
4-11 Pearson correlation of 13 L1 host gene expression and COBRA unique to L1 hypomethylation.....	64

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2-1	Initiation and cell proliferation in multistage carcinogenesis8
2-2	Multiple factors controlling DNA methylation.....13
2-3	Normal patterns of methylation that may facilitate tumorigenesis.....13
2-4	Maintenance of DNA methylation.....16
2-5	Changes in DNA methylation during mammalian development17
2-6	Non-LTR elements.....22
2-7	Insertion sites of LINE-1 Ta-1 elements in the human genome.....22
2-8	Schematic representation of an epigenetic change as a precursor to expression and movement of retrotransposable elements..24
2-9	Outline of the COBRA procedure.29
3-1	Web page of human blat search40
3-2	Web page of Entrez cross-database search40
3-3	Web page of L1BASE.....41
3-4	One-way ANOVA by SPSS program version 14.....45

LIST OF FIGURES

Figure	Page
3-5	Independent-sample T Test by SPSS program version 14.....46
4-1	The schematic representation and examples of CU-L1 and COBRA LINE-1.....48
4-2	Sequencing result of PPP2R2B CU-L1.....49
4-3	Sequencing result of ANTXR2 CU-L1(1) 49
4-4	Sequencing result of ANTXR2 CU-L1(2).....50
4-5	Scatter plot show correlation between COBRA L1 and Mean of COBRA unique to L1.....50
4-6	Mean of hypomethylation compare among each cell type.....56
4-7	Mean of hypomethylation compare between Normal tissue.....57
4-8	Demonstration character of HNSCC including Selection L1 loci in loss of methylation process.....60
4-9	Gel electrophoresis of RT-PCR.....62

LIST OF FIGURES

Figure	Page
4-10	Graph show linear correlation between EPHA3 expression and COBRA unique to L1 in EPHA3 intron 5 hypomethylation.....63
4.11	Graph show linear correlation between EPHA3 expression and COBRA unique to L1 in EPHA3 intron 15 hypomethylation.....63
4.12	Graph show linear correlation between PPP2R2B expression and COBRA unique to L1 in PPP2R2B intron 8 hypomethylation.....64

LIST OF ABBREVIATIONS

CpG	=	Dinucleotide containing cytosine and guanine respectively, P represent phosphate group
d ^m C	=	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
Bp	=	Base pair
COBRA	=	Combined bisulfite restriction analysis
LINE	=	Long interspersed nuclear element
°C	=	Degree Celsius
Kb	=	Kilobase
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
μl	=	Microlitre
μM	=	Micromolar
rpm	=	Round per minute