

**MICROSATELLITE ALTERATIONS AND ROLES OF  
CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENES ON THE  
CHROMOSOMAL REGION 9p21-pter IN  
CHOLANGIOCARCINOMA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MEDICAL TECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การเปลี่ยนแปลงไมโครแซทเทลไลต์และบทบาทของจีนต้านมะเร็งบริเวณโครโมโซม 9p21-pter ในโรคมะเร็งท่อน้ำดี (MICROSATELLITE ALTERATIONS AND ROLES OF CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENES ON THE CHROMOSOMAL REGION 9p21-pter IN CHOLANGIOCARCINOMA)

พัชรี ชินศรี 4536725 MTMT/D

ปร.ค. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์, Ph.D., พชรี เจียรนัยกูร, Ph.D.,  
ชวลิต ไพโรจน์กุล, M.D., ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช, Ph.D.

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีที่เกี่ยวข้องกับพยาธิใบไม้ในตับเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้เคยมีรายงานความคิดปกติของโครโมโซม 9p21-pter ในโรคมะเร็งหลายชนิดแต่ยังไม่มีการศึกษาความคิดปกติในโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ เพื่อความเข้าใจถึงกลไกของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในระดับโมเลกุล ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา loss of heterozygosity (LOH) และ microsatellite instability (MSI) บริเวณโครโมโซม 9p21-pter โดยใช้ PCR based microsatellite markers ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 94 ราย และศึกษาการเกิด methylation และการแสดงออกของโปรตีนใน  $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4b}$ , และ  $p16^{INK4a}$  โดยใช้เทคนิค methylation specific PCR และ immunohistochemistry ตามลำดับ อีกทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างความคิดปกติทั้ง genetic และ epigenetic รวมถึงการแสดงออกของโปรตีนและอาการทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาพบ LOH อย่างน้อยหนึ่งโลคัสจำนวน 58 (61.7%) ราย จาก Fine mapping บริเวณที่พบ LOH ได้บ่อยได้แก่บริเวณที่อยู่ระหว่าง D9S286 และ D9S1752 พบ methylation 40.2% ใน  $p14^{ARF}$ , 48.9% ใน  $p15^{INK4b}$ , และ 28.3% ใน  $p16^{INK4a}$  การไม่แสดงออกของโปรตีนพบเป็น 30.9%, 58%, และ 81.5% ใน  $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4b}$ , และ  $p16^{INK4a}$  ตามลำดับ methylation ของ  $p14^{ARF}$  และ LOH บริเวณ 9p21 มีความสัมพันธ์กับการไม่แสดงออกของโปรตีน  $p14^{ARF}$  พบการพยากรณ์โรคไม่ดีในผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน  $p16^{INK4a}$  การแสดงออกของโปรตีน  $p15^{INK4b}$  มีความสัมพันธ์ไปในทางตรงข้ามกับ  $p16^{INK4a}$  แสดงให้เห็นถึงการทำหน้าที่ของ  $p15^{INK4b}$  เพื่อชดเชย  $p16^{INK4a}$  กล่าวโดยสรุป กลุ่มจีน  $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4b}$ , และ  $p16^{INK4a}$  มีความชอบในกลไกที่ทำให้เกิด inactivation ในโรคมะเร็งท่อน้ำดีนี้แตกต่างกันคือ กลไกหลักที่ทำให้เกิด inactivation ใน  $p14^{ARF}$  คือ epigenetic ส่วน  $p15^{INK4b}$  คือทั้งทาง genetic และ epigenetic ในขณะที่  $p16^{INK4a}$  คือ genetic เนื่องจากการไม่แสดงออกของโปรตีน  $p16^{INK4a}$  พบได้บ่อยและสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของ  $p16^{INK4a}$  ในโรคมะเร็งท่อน้ำดีก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พยายามศึกษาบทบาทของ  $p16^{INK4a}$  ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ *Ad-p16* system จากการศึกษาพบว่า *Ad-p16* ทำให้เกิด senescence ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี M055 และ M139 และทำให้เกิด apoptosis ใน KLU-100 นอกจากนี้ยังพบว่า *Ad-p16* ทำให้เกิด apoptosis ใน M055 และ M139 ที่ถูกลดการแสดงออกของโปรตีน Rb ด้วย siRNA ซึ่งทำให้สามารถสรุปได้ว่า *Ad-p16* ทำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยผ่านทางกลไกการลดลงของโปรตีน Rb ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำ *Ad-p16* gene therapy มาประยุกต์ใช้ในรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต

MICROSATELLITE ALTERATIONS AND ROLES OF CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENES ON THE CHROMOSOMAL REGION 9p21-pter IN CHOLANGIOCARCINOMA.

PATCHAREE CHINNASRI 4536725 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: TEMDUANG LIMPAIBOON, Ph.D., PATCHAREE JEARANAIKOON, Ph.D., CHAWALIT PAIROJKUL, M.D., SRISURANG TANTIMAVANICH, Ph.D.

ABSTRACT

Cholangiocarcinoma (CCA) found in Northeast Thailand is associated with liver fluke infection. The inactivation of chromosome 9p21-pter has been reported in many human cancers but has never been studied in liver fluke-related CCA. We investigated the loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) and performed a fine mapping of the chromosomal region 9p21-pter in 94 microdissected CCA samples using PCR based microsatellite markers. Methylation and protein expression of  $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4b}$ , and  $p16^{INK4a}$  were determined using methylation specific PCR and immunohistochemistry, respectively. These genetic and epigenetic alterations, including the loss of protein expression, were correlated with clinicopathological data. Of 94 cases, 58 (61.7%) showed LOH in at least one locus. Fine mapping at 9p21-pter showed a distinctive region of common loss, a region between D9S286 and D9S1752. Methylation frequency was 40.2% for  $p14^{ARF}$ , 48.9% for  $p15^{INK4b}$ , and 28.3% for  $p16^{INK4a}$ . Protein expression loss of  $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4b}$ , and  $p16^{INK4a}$  was 30.9%, 58%, and 81.5%, respectively. Both  $p14^{ARF}$  methylation and LOH at 9p21 were associated with a loss of  $p14^{ARF}$  protein expression. Patients who lost  $p16^{INK4a}$  expression significantly showed a poor prognosis. The  $p15^{INK4b}$  expression was inversely correlated with  $p16^{INK4a}$  protein expression suggesting a compensated function of  $p15^{INK4b}$  for  $p16^{INK4a}$ . In conclusion, mechanisms of inactivation of  $p14^{ARF}$ ,  $p15^{INK4b}$ , and  $p16^{INK4a}$  in liver fluke-related CCA are preferentially different by which an epigenetic event is the main mechanism of  $p14^{ARF}$  inactivation, whereas  $p16^{INK4a}$  is inactivated by a genetic event, while  $p15^{INK4b}$  is affected by both events. Loss of  $p16^{INK4a}$  expression is a frequent event in liver fluke-related CCA and is significantly associated with a poor chance of survival. However, its role in CCA is not well characterized. We thus attempted to investigate the role of *Ad-p16* in cholangiocarcinogenesis. The undergoing apoptosis in KKV-100 and senescence in M055 and M139 following an infection with *Ad-p16* were observed. Moreover, we demonstrated that M055 and M139 infected with *Ad-p16* exhibited an increase apoptosis by Rb knock down using siRNA. These results suggest that *Ad-p16* is capable of mediating apoptosis in CCA cell lines through a down-regulation of Rb. Inactivation of the  $p16^{INK4a}$  is a common alteration in CCA, making it an ideal target for gene replacement. Therefore, restoring the normal function of  $p16^{INK4a}$  by adenovirus gene therapy is an attractive goal in the treatment of CCA.

KEY WORDS: CHOLANGIOCARCINOMA / CHROMOSOME 9p21 / LOSS OF HETEROZYGOSITY / METHYLATION / ADENOVIRUS / APOPTOSIS

202 pp.